



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Evaluación de la captación de GFAP en  
astrocitos en un modelo de Lesión  
Traumática de Médula Espinal en rata,  
mediante técnicas de Imagen Molecular.**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Químico Farmacéutico Biólogo**

**PRESENTA:**

**Peña Merino Nadia**

**DIRECTOR DE TESIS**

**M. en C. Bertha Vanessa Izquierdo Sánchez**

**ASESOR DE TESIS**

**Dra. Leticia Cruz Antonio**



Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



### **Agradecimientos Institucionales**

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para la realización de dicho proyecto de tesis.
- Al Centro de Investigación Proyecto Camina A.C. en especial al Dr. Gabriel Guízar Sahagún y Dr. Pablo Zambrano Rodríguez por las atenciones, enseñanzas y apoyo para la realización experimental de dicho proyecto.
- Al Instituto Nacional de Cancerología (INCan) perteneciente a la Secretaría de Salud por el espacio y facilidades otorgadas para realizar dicho proyecto.
- Al Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular  $\mu$ PET/SPECT/CT. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM, Instituto Nacional de Cancerología bajo el mando del Dr. Luis Alberto Medina Velázquez, a quien agradezco sinceramente por su paciencia, apoyo y aporte científico al proyecto.
- Un agradecimiento especial a mi directora de tesis la M. en C. Bertha Vanessa Izquierdo Sánchez por todo el apoyo, enseñanzas, tiempo y pláticas brindadas para poder realizar el proyecto experimental y teórico.
- A mi asesora de tesis la Dra. Leticia Cruz Antonio, por la oportunidad, enseñanzas y calidad humana dadas a lo largo de este proyecto.
- Al laboratorio de Oncología Experimental, en especial a la Dra. Saé Muñiz Hernández y demás integrantes por la paciencia y ayuda en el desarrollo experimental sin el cual no se hubiera logrado el término de este trabajo.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza” (FES-Z) por haberme acogido durante más de 5 años en la más grande “*alma mater*” del país.
- A Pavel, Poncho, Roberto, Ángel, Sirio, Efrén, Itzel, Edgar Omar, Omarcito y demás compañeros del Laboratorio 10 por sus consejos, risas, burlas y demás momentos compartidos a lo largo de esta tesis.
- A mis amigos Mitzi, Cinthia, Fabiola, Alejandra, Aída, Monse, Caro, Rodo, Oscar, Tere, Ari, Mau, Jorge, Manu, Rubie y demás que me ayudaron en todo momento, sin ustedes esta etapa universitaria no hubiera sido la misma, gracias por su apoyo y amor incondicional.
- A la Q.F.B. Josefina Rojas por su cariño y apoyo incondicional, no sabes cuan estoy agradecida contigo, gracias por nunca dejarme decaer ante las circunstancias.

Con infinito amor y cariño para mi familia.

Olga, eres mi sol y mi motivación.

Itzel, eres mi luna y mi perseverancia.

Pavel, eres mi mar y mi fuerza.

“We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this must be attained.”

Marie Curie

“Debemos tener perseverancia y sobre todo confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe lograrse”.

Marie Curie

<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
<b>1. Lesión Traumática en Médula Espinal</b>	<b>5</b>
1.1 Etiología	5
1.2 Epidemiología	6
1.3 Diagnóstico y Tratamiento	6
<b>2. Médula Espinal</b>	<b>7</b>
2.1 Anatomía	8
2.2 Células gliales o neuroglia	9
2.2.1 Astrocitos	10
2.2.1.1 Clasificación	10
2.2.1.2 Estructura	11
2.2.1.3 Función	11
2.2.1.4 Astrogliosis	12
<b>3. Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP)</b>	<b>13</b>
<b>4. Radiofármacos</b>	<b>13</b>
4.1 Estructura de un radiofármaco	14
4.1.1 Anticuerpos monoclonales	14
4.1.1.1 Características Generales Anticuerpo GFAP	15
4.1.2 Radionúclidos	15
4.1.2.1 Características del Tecnecio 99 metaestable	15
4.1.2.2 Pertecnetato sódico de <sup>99m</sup> Tecnecio	16
<b>5. Técnica de radiomarcado</b>	<b>17</b>
5.1 Método directo	18
5.2 Control de calidad	18

5.2.1 Eficiencia Radioquímica	19
5.2.2 Pureza Radioquímica	19
5.2.3 Estabilidad Radioquímica	20
<b>6. Imagen Molecular</b>	<b>20</b>
6.1 Tomografía Computarizada (CT)	21
6.2 Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único (SPECT)	22
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>22</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>VI. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>VII. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>24</b>
<b>VIII. METODOLOGÍA</b>	<b>25</b>
<b>IX. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS</b>	<b>49</b>
<b>XII. REFERENCIAS</b>	<b>50</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	56
ÍNDICE DE TABLAS	58



## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

°C: grados Celsius

2-βME: 2- β Mercaptoetanol

<sup>99m</sup>Tc: Tecnecio 99 metaestable

μCi: microcuries

ASIA: American Spinal Injury Association (Asociación Americana de Lesiones Medulares)

AcMo: Anticuerpo Monoclonal

BFCA: Bifunctional Chelating Agent (Agente Quelante Bifuncional)

BHE: Barrera Hematoencefálica

cbp: cuanto baste para

cpm: cuentas por minuto

CT: Computed Tomography (Tomografía Computarizada)

d: día (s)

DE: Desviación Estándar

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

FI: Filamentos Intermedios

FOV: Field of View (Campo de visión)

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida

HV: High-Voltage (Alto Voltaje)

HD: High-Dose (Alta Dosis)

IgG: Inmunoglobulina G

IHQ: Inmunohistoquímica

iTLC-SG: Instant Thin Layer Chromatography-Sílica Gel (Cromatografía Instantánea en Capa Fina en Sílica-Gel)

kDa: KiloDalton

keV: Kilo electrón-Volt

LTME: Lesión Traumática en Médula Espinal

MDP: Metilendifosfonato

ME: Médula Espinal

MEC: Metiletilcetona

mCi: milicurios

OMS: Organización Mundial de la Salud

RIC: Radioinmunoconjugado

rpm: revoluciones por minuto

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico) SH: Suero Humano

SNC: Sistema Nervioso Central

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography (Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único)

SSI: Solución Salina Isotónica

t: tiempo

THR: Threshold (Umbral de energía)

WIN: Window (Ventana de energía)

## RESUMEN

La Lesión Traumática en Médula Espinal (LTME) hace referencia a los daños sufridos en la Médula Espinal por algún traumatismo o patología, afecta principalmente a la edad laboralmente activa, las repercusiones en cuanto a diagnóstico y tratamiento están dadas por la zona de lesión, gravedad y su evaluación al momento de presentarse.<sup>4</sup>

La finalidad de este trabajo fue evaluar la captación de la Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) presente en astrocitos reactivos en un modelo murino con Lesión Traumática en Médula Espinal (LTME) en ratas Long Evans para obtener una herramienta de análisis *“in vivo”* de dicha proteína por Imagenología Molecular.

En primera instancia se optimizó un método de radiomarcado para la obtención del radioinmunoconjugado (AcMo GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc), seguido de su caracterización mediante el Control de Calidad (Eficiencia Radioquímica, Pureza Radioquímica, Estabilidad Radioquímica) usando la técnica de Cromatografía Instantánea en Capa Fina en Sílica Gel (iTLC-SG). Posteriormente se evaluó la afinidad *“in vitro”* mediante Radioinmunoquímica en cortes murinos a diferentes tiempos post-LTME de 1, 20 y 35 días respectivamente mediante la cuantificación de la radiación con un contador de centelleo tipo pozo. Las imágenes *“in vivo”* se obtuvieron después de 15-20 días post-laminectomía haciendo uso de técnicas de Imagen Molecular (SPECT-CT) con el equipo Trimodal  $\mu$ SPECT-CT Albira Ars de Oncovision España, tras la administración *“in situ”* del radiofármaco en ratas Long Evans con LTME y sin LTME a diferentes tiempos 0 h (basal), 1 h y 3 h observándose así una sobreexpresión de dicha proteína en astrocitos reactivos dependiente del tiempo post-lesión en ratas lesionadas en comparación con ratas no lesionadas.

## I. INTRODUCCIÓN

La Lesión Traumática en Médula Espinal es un problema de salud pública que afecta a la población en edad económicamente activa generando profundos efectos físicos, económicos, sociales y emocionales, que generalmente conducen a un déficit neurológico, sensorial y motriz<sup>1-6</sup> Aunque no existen estimaciones fiables de la prevalencia de las LTME la Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que la incidencia mundial oscila entre 40 y 80 casos por millón de habitantes<sup>1</sup>, su incidencia aunada a los elevados costos a nivel de diagnóstico y tratamiento permiten considerar esta enfermedad como un problema social.<sup>4</sup>

Debido a los problemas multifactoriales que conlleva una LTME y su repercusión, es necesario contar con técnicas o herramientas de análisis, identificación, diagnóstico así como con tratamientos rápidos y oportunos; por lo cual este proyecto tuvo como finalidad la evaluación de la captación de GFAP, empleando vectores de diagnóstico como los anticuerpos monoclonales radiomarcados. Se realizó la optimización del método de radiomarcado del AcMo anti-GFAP para la obtención del radiofármaco (GFAP/MDP/Tc), dicho radiofármaco se dirige selectivamente hacia una célula que expresa su receptor, en este caso la Proteína Glial Fibrilar Ácida, facilitando de este modo la identificación de astrocitos reactivos ante una LTME en un modelo murino. Aunado el radiofármaco a la implementación de la Imagenología Molecular en correlación con datos histopatológicos es posible brindar un diagnóstico rápido y acertado. La implementación de nuevas herramientas por Imagen Molecular empleando técnicas de radiomarcado optimizaría el tiempo requerido para la evaluación de procesos moleculares como lo es la sobreexpresión de la proteína GFAP convirtiéndolas en un futuro en una técnica de uso común a nivel médico.

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. Lesión Traumática en Médula Espinal

Se denomina Lesión Traumática en Médula Espinal se denomina al resultado de una alteración o daño en las vértebras, ligamentos o discos de la columna vertebral o en la Médula Espinal, ocasionado por un golpe, caída o choque traumático. Puede conllevar a una fractura, dislocación o compresión de una o más vértebras con o sin presencia de hemorragia, provocando un déficit en movimiento, sensibilidad, función autónoma o daño irreversible (Figura 1).<sup>1-6</sup> El segmento de la Médula Espinal que es lesionado y la gravedad de la lesión, determinará qué funciones del cuerpo quedarán afectadas o se perderán.<sup>5-7</sup>

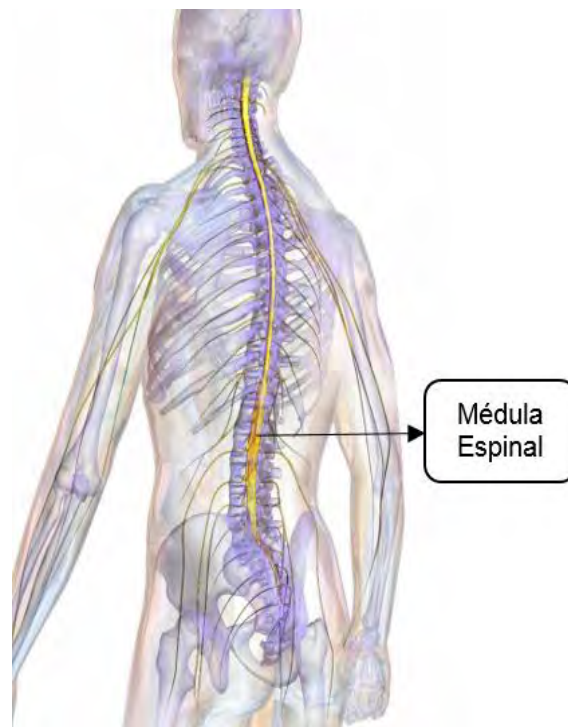


Figura 1. Médula Espinal protegida por la columna vertebral.

#### 1.1 Etiología

Entre las causas principales por las que se puede presentar una Lesión Traumática, están las provocadas mayoritariamente por accidentes automovilísticos, por aplaste o compresión de las vértebras, caídas catastróficas u otras lesiones que penetran directamente en la médula espinal, como heridas de bala o lesiones con cuchillo y las no traumáticas que incluyen las causadas por infecciones, tumores o enfermedades neurodegenerativas.<sup>1-3,6-8</sup>

Una LTME puede dañar pocos o muchos axones dependiendo del grado del trauma, provocando así una cadena de reacciones a nivel fisiológico y anatómico. Las consecuencias de cualquier lesión en la médula espinal dependen del número de axones que hayan sobrevivido, por lo tanto, entre mayor sea el

número de axones que funcionen normalmente, menor será el grado de la discapacidad presentada.<sup>5-7</sup>

## 1.2 Epidemiología

Aunque no existen estimaciones fiables de la prevalencia de las LTME la Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que la incidencia mundial oscila entre 40 y 80 casos por millón de habitantes<sup>1</sup>, mientras que para la Ciudad de México reporta una incidencia de aproximadamente 20 casos por cada millón de habitantes<sup>4</sup>, afectando principalmente a la población económicamente activa en su mayoría varones de entre 25 y 35 años respectivamente y pese a que la cifra no es de gran impacto, los altos costes de su tratamiento rehabilitador y el bajo progreso de la supervivencia de los afectados le confiere importancia a nivel socio-económico y sanitario.<sup>1-4, 8-9</sup>

## 1.3 Diagnóstico y Tratamiento

Gracias al uso generalizado de antisépticos y esterilización de los procedimientos quirúrgicos, la cirugía de columna puede a la fecha ser realizada con mucho menor riesgo de infección que hace algunas décadas. El uso de las radiografías les dio a los cirujanos un medio para localizar la lesión en forma precisa y realizar diagnósticos sobre la evolución de las lesiones. Tiempo después, se estableció un método estándar para el tratamiento de las lesiones de la médula, caracterizado por la reposición de la columna, la sujeción en su lugar y la rehabilitación de las discapacidades mediante el ejercicio.<sup>2-6</sup>

Cuando ocurre una LTME, las personas son generalmente transportadas en posición decúbito (recostadas), con un collar rígido y un tablón que inmovilice la columna vertebral, la realineación de la columna se hace para estabilizar la columna y prevenir daño adicional, aunado a la administración de diversos medicamentos esteroides como Metilprednisolona, el cual se convirtió en el tratamiento estándar, ya que administrado durante las posteriores 8 horas ante

una lesión reduce el daño a las células nerviosas y disminuye la inflamación cerca del sitio de la lesión al causar la supresión de la actividad de las células inmunes.

Aproximadamente al tercer día después de la lesión, los médicos realizan un examen neurológico completo en los pacientes para diagnosticar la gravedad de la lesión y predecir el probable alcance que tendrá la recuperación, esta evaluación se lleva a cabo bajo las directrices de American Spinal Injury



Association (ASIA), basadas en una exploración sistematizada de las funciones motoras y sensitivas, por medio de la Imagenología como radiografías, Tomografía Computarizada (Figura 2) y Resonancia Magnética Nuclear en correlación con datos histopatológicos las cuales brindan información esencial para el diagnóstico, el tratamiento en pacientes.<sup>50</sup>

El nivel, la extensión y la fase evolutiva de la lesión permiten conocer el impacto funcional y plantear los objetivos rehabilitadores y el empleo de alternativas como el tratamiento quirúrgico, injerto del nervio, enfoques farmacológicos, terapia génica o celular.<sup>2, 5-9</sup>

Figura 2. Dislocación espinal visualizada por Tomografía Computarizada (CT).

## **2. Médula Espinal**

La Médula Espinal (ME) es una estructura suave y delicada que actúa como el principal conducto de información entre el cerebro y el resto del cuerpo. Dicha estructura emerge en la base del cráneo, está protegida por la columna vertebral compuesta por 33 huesos llamados vértebras que son estructuras óseas, separadas por discos. A pesar de que las vértebras son estructuras de gran

dureza que protegen a la ME a través de discos de cartílago semirrígido, esta última es susceptible a presentar lesiones directas a través de golpes, contusiones o compresiones que traen consigo consecuencias funcionales graves dependiendo del nivel anatómico en el que se presente la lesión (Figura 3).<sup>1, 3,5-11</sup>

## 2.1 Anatomía

La ME tiene una región central de tejido que está compuesto de neuronas, sus células de apoyo llamadas “glías” y vasos sanguíneos, rodeada por conductos largos

de fibras nerviosas compuestas de axones, estas se extienden por médula espinal, transmitiendo señales hacia y desde el cerebro. Las neuronas y las dendritas (prolongaciones ramificadas que ayudan a las neuronas a comunicarse unas con otras) habitan en una región en forma de H llamada “sustancia gris”.

La sustancia gris en forma de H de la ME contiene las neuronas motoras que controlan el movimiento, las inter-neuronas de menor tamaño que manejan la comunicación al interior y entre los segmentos de la médula espinal, y las células que reciben las señales sensitivas y luego envían la información a los centros del cerebro.

Rodeando a la sustancia que contiene las neuronas se encuentra la sustancia blanca. La mayoría de los axones están envueltos en una sustancia aislante llamada mielina, la cual permite que las señales eléctricas se muevan libre y rápidamente. La mielina tiene una apariencia blanquecina, razón por la cual se le llama a esta sección externa la “sustancia blanca” (Figura 4).<sup>8, 9-14</sup>

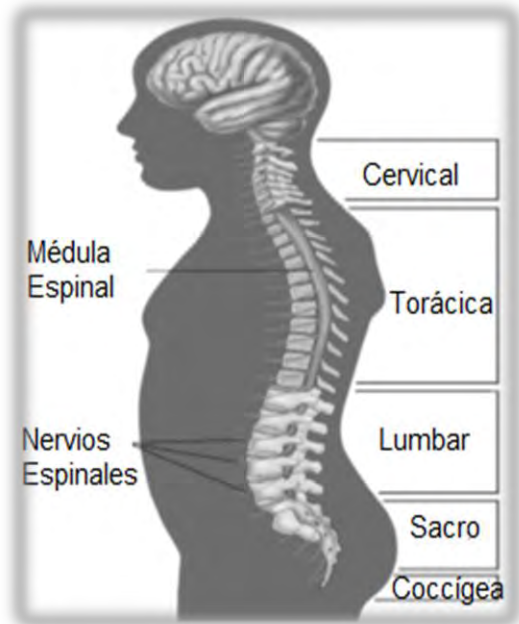


Figura 3. Nivel anatómico de la Médula Espinal.



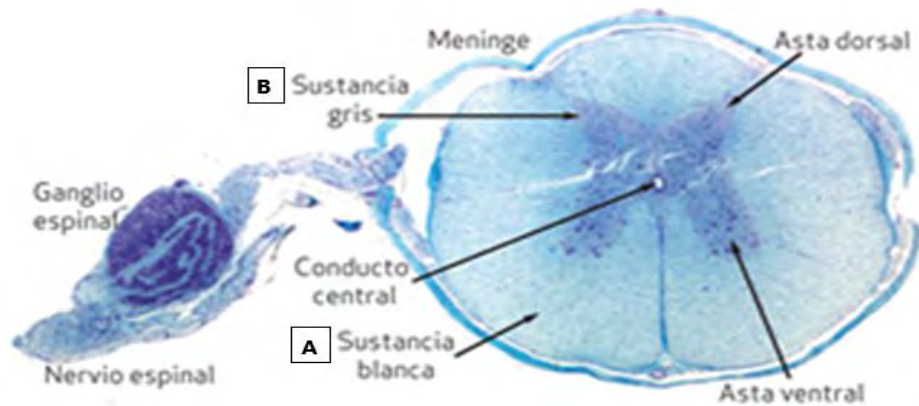


Figura 4. Estructura interna de la Médula Espinal. A: Sustancia Blanca B: Sustancia gris.

La dimensión promedio de la médula espinal varía en su circunferencia a lo largo de la misma y puede ser desde el ancho de un pulgar hasta el ancho de uno de los dedos pequeños. La médula espinal se extiende hacia abajo a través de los dos tercios superiores del conducto vertebral, desde la base del cerebro hasta la parte inferior de la espalda y tiene generalmente una longitud media de 38 a 43 cm, dependiendo de la altura de la persona.<sup>8-9</sup>

## 2.2. Células gliales o neuroglia

En el SNC existen principalmente dos tipos celulares, las células nerviosas o neuronas y las células de la glía o neuroglia que son mucho más abundantes. Las células gliales se clasifican en macroglía, que a su vez se dividen en astrocitos, oligodendrocitos y microglía cuyas funciones son la de soporte, aislamiento, protección y nutrición (Figura 5).<sup>12-13</sup>

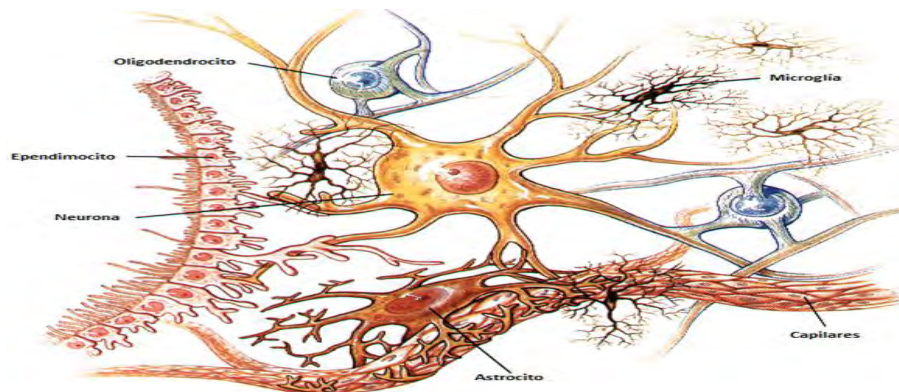


Figura 5. Tipos de células gliales.

El cerebro y la médula espinal se encuentran resguardados por la BHE, en condiciones normales ésta controla el paso de células del sistema inmunológico y moléculas entre el sistema nervioso y el resto del organismo, cuando se rompe como efecto de una LTME, las células del sistema inmune que regularmente circulan en la sangre, pueden invadir los tejidos alrededor de la lesión y desencadenar una respuesta inflamatoria. Esta respuesta es altamente compleja y se caracteriza por la acumulación de fluidos, así como por la llegada de células inmunes como neutrófilos, células T, macrófagos y monocitos a la zona de daño y también por la presencia de algunas células gliales como los astrocitos.<sup>10</sup>

### 2.2.1 Astrocitos

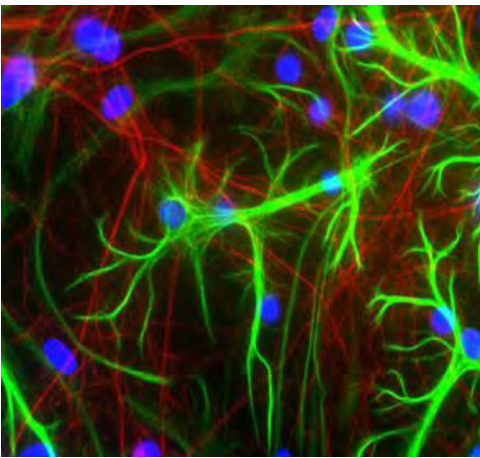


Figura 6. Morfología de un Astrocito.

Los astrocitos o astrogía, pertenecen a las células gliales, las cuales se encuentran localizadas en el sistema nervioso central: encéfalo y médula espinal, estos representan el 80% del volumen cerebral y se encuentran dispuestos entre las neuronas. Mantienen una morfología estrellada con un soma circunscrito al núcleo, del cual parten una serie de prolongaciones en sentido más o menos radial (Figura 6).<sup>13-15</sup>

#### 2.2.1.1 Clasificación

Dentro de los astrocitos podemos encontrar dos tipos:

- Glía Fibrosa o estrellada, las cuales se encuentran en la sustancia blanca, mantienen prolongaciones largas, delgadas y poco ramificadas, están implicados en la reparación del tejido dañado (especialmente en la médula espinal), un proceso que resulta en la formación de cicatrices.<sup>13,15-16</sup>
- Glía protoplasmática, se encuentra en la materia gris, las cuales son células de numerosas prolongaciones cortas y ramificadas en todas direcciones y se encuentran en menor proporción que las anteriores.<sup>13,15-16</sup>

### 2.2.1.2. Estructura

Los astrocitos presentan Filamentos Intermedios (FI) también llamados “Gliofilamentos” que conforman un grupo heterogéneo de estructuras, llamados así debido a que su diámetro (10 nm) se encuentra entre los diámetros de los microtúbulos (25 nm) y el de los microfilamentos (7 nm). Dichas estructuras son los elementos citoesqueléticos más estables cuya función fundamental es aportar soporte mecánico a la célula. Se conforman por una Proteína llamada GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida) que se extiende desde el soma hasta las prolongaciones y actúa como marcador de los astrocitos maduros. Los astrocitos suelen tener entre cinco y ocho prolongaciones principales con ramificaciones más delgadas uniformemente distribuidas. Tanto el soma como las prolongaciones principales están enriquecidas en la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), mientras que las ramificaciones más finas son GFAP negativas. <sup>16,19, 20,24</sup>

### 2.2.1.3. Función

Dentro de las funciones principales de los astrocitos están la de ser soporte energético de las neuronas, eliminación de sustancias tóxicas y de neurotransmisores, síntesis de precursores de neurotransmisores, modulación de la actividad sináptica, mantenimiento de la homeostasis del pH e iones, integridad de la BHE, presencia de interacciones con las neuronas por medio de canales proteicos de uniones estrechas (GAP), ubicados en los pies perivasculares al final de sus prolongaciones citoplasmáticas, producción de factores neurotróficos (factor de crecimiento neural [NGF], factor neurotrófico derivado de cerebro [BDNF], factor neurotrófico derivado de la línea celular glial [GDNF]), contribuir tanto en la inmunidad innata como adaptativa y en formación de cicatriz glial cuando hay pérdida neuronal, funciones claves en la regulación del microambiente neuronal (como metabolismo y supervivencia). <sup>17-20</sup>

#### 2.2.1.4. Astrogliosis

En respuesta a condiciones patológicas como isquemias, infecciones, inflamaciones, traumas o enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos sufren una serie de cambios comunes como hipertrofia o hiperplasia, transformándose en un fenotipo reactivo (Figura 7).<sup>10, 18-23</sup>

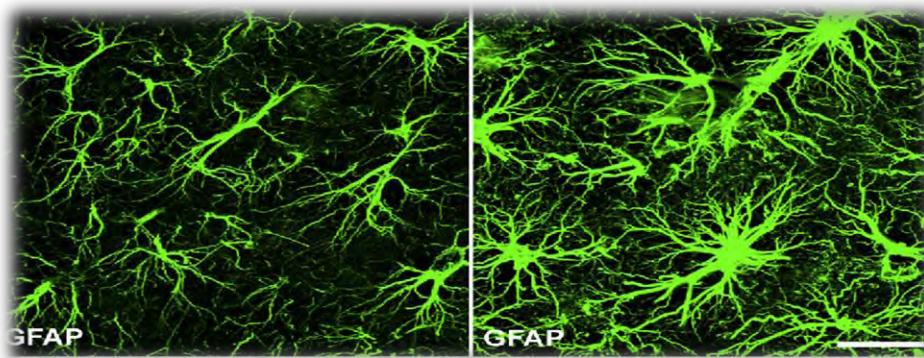


Figura 7. Fenotipo reactivo de un astrocito ante una Lesión Traumática en Médula Espinal.

Los cambios experimentados comprenden edema, acortamiento de sus procesos, incremento en la producción de filamentos intermedios, proliferación celular, los cuales ocurren debido a hiperactividad de sus mecanismos de amortiguación por alteraciones del espacio extracelular. Este fenómeno conocido como “Astrogliosis”, “Glía activada” o “Gliosis Reactiva”, permite limitar el daño causado, proteger las neuronas y evitar su muerte por eventos de excitotoxicidad (Figura 8).<sup>19-23</sup>.



Figura 8. Proceso de la cicatriz glial o Astrogliosis.

### 3. Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP)

La Proteína Fibrilar Ácida Glial es la principal proteína estructural de los filamentos dentro del citoesqueleto de los astrocitos y actúa como marcador de astrocitos maduros. La sobrerregulación de GFAP, es un indicador significativo de gliosis como respuesta a daños en el Sistema Nervioso Central (SNC). En situaciones donde la “*astrogliosis*” se hace persistente por la progresión del daño, se presentan procesos neurodegenerativos como lo es la formación de “*cicatriz glial*” al interior de la ME, la cual se compone principalmente de astrocitos reactivos y proteoglicanos, esta cicatriz aísla el tejido, los procesos de neurotransmisión y regeneración de axones lesionados.<sup>1, 4-8,10-12,19-24</sup>

Debido a lo anteriormente mencionado, se considera de importancia determinar la localización “*in vivo*” de algunas células gliales como los astrocitos por medio de radiofármacos a fin de identificar rápidamente la respuesta del organismo ante una LTME (Figura 9).

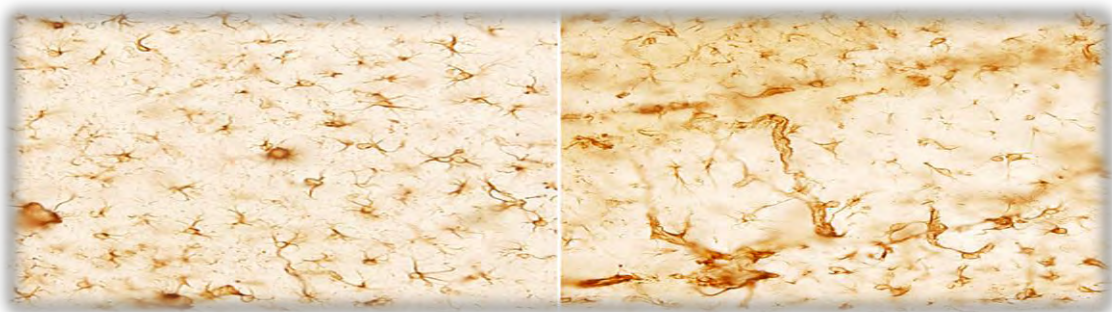


Figura 9. Imágenes de astrocitos en las áreas corticales del cerebro de una rata, teñidos mediante inmunocitoquímica con anticuerpos anti-GFAP.

### 4. Radiofármacos

La FEUM define un radiofármaco como “toda sustancia conteniendo un radionúclido dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación se administra en seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos”.<sup>26</sup> Dicha sustancia resulta de un proceso de radiomarcado.

## 4.1 Estructura de un radiofármaco

Un radiofármaco contiene un radionúclido o isótopo radioactivo, además de una molécula o biomolécula (que puede ser un fármaco o anticuerpo) y un agente quelante bifuncional.<sup>27-28,30</sup>

Las moléculas marcadas son los acarreadores de los radionúclidos al sitio receptor y pueden ser macromoléculas como anticuerpos o pequeñas moléculas orgánicas como péptidos entre otros, el conector o ligando es usado para la unión con el radionúclido o isótopo radioactivo que actúa como el agente que libera energía en forma de radiación.<sup>28</sup>

Los radiofármacos pueden emplearse con fines terapéuticos para liberar pequeñas dosis de radiación ionizante a ciertos tejidos u órganos en el cuerpo o para fines diagnósticos donde se radiomarca una molécula que es afín a otra sobreexpresada en algún tejido blanco, en este caso el radiofármaco interactúa con un blanco molecular pero no ejerce efecto farmacológico y tras su fijación temporal en el tejido u órgano blanco se elimina rápidamente.<sup>29,30,51</sup> Tal es el caso del radiomarcado de anticuerpos monoclonales como el anti-GFAP que al unirse a un isótopo radioactivo permite la identificación de astrocitos reactivos en un sistema vivo.

### 4.1.1. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) reconocen específicamente una parte del antígeno, es decir un epítipo concreto y son producidos por una clona de linfocitos B. Debido a su alta especificidad y versatilidad se unen de manera altamente selectiva a su receptor específico facilitando la identificación de su receptor o ejerciendo una acción terapéutica; se utilizan de manera extensiva en la investigación biomédica, en el diagnóstico de diferentes patologías y en el tratamiento de las mismas.<sup>31</sup>

Dichos anticuerpos o Inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas formadas por dos cadenas polipeptídicas pesadas "H" y dos cadenas ligeras "L" unidas entre sí mediante enlaces débiles.<sup>31</sup> Funcionalmente podemos distinguir dos porciones,

una de ellas implicada en el reconocimiento y unión específica al antígeno denominada región Fab (antigen binding Fragment) y otra implicada en la funcionalidad, llamada región Fc (crystallizable Fragment).<sup>31</sup>

Dentro de sus múltiples funciones están la de eliminar agentes extraños al organismo, mediante el reconocimiento específico de los antígenos, provocando la respuesta inmune y el reclutamiento de diferentes células y moléculas del organismo que serán capaces de destruir y eliminar al agente extraño.<sup>31, 33</sup>

#### 4.1.1.1. Características Generales del Anticuerpo GFAP (GA-5): sc-58766

La proteína GFAP es usada como molécula marcadora para enfermedades cerebrales, se localiza específicamente dentro los FI tipo III de los astrocitos, cuando hay presencia de Astrogliosis debido a algún trauma o patología esta viene acompañada de la sobreexpresión de dicha proteína.

El anticuerpo monoclonal GFAP es de origen murino, isotipo IgG<sub>1</sub> y con un peso molecular de 50 kDa, en cuanto a su especificidad, éste reacciona con la proteína GFAP permitiendo así la identificación de astrocitos y otras células gliales en estudios inmunohistoquímicos.<sup>32</sup>

#### 4.1.2. Radionúclidos

Según la FEUM un radionúclido o isotopo radioactivo, es un átomo que se caracteriza por su número de masa, su número atómico y su estado energético nuclear y que presenta la propiedad de radioactividad. Esta característica la poseen ciertos nucleídos y les confiere la capacidad de emitir radiaciones cuando sus núcleos se transforman espontáneamente en otros nucleídos de tal manera que la duración media de tal estado sea lo suficientemente larga para que pueda ser observada.<sup>26</sup>

La elección del radionúclido para el marcado de anticuerpos depende de diversos factores, destacan el uso que se le dará al radiofármaco ya sea diagnóstico o terapia, el tiempo de vida media del radionúclido para determinar la Biodistribución o farmacocinética del anticuerpo en un organismo. El tipo de

emisión de radionúclidos usados en la mayoría de los métodos de imagenología deben ser en forma de fotones que emitan energía en un rango de 120-200 KeV, los radionúclidos típicos usados para radioterapia sistémica emiten partículas  $\alpha$  y  $\beta$ . La selección de un radionúclido depende de la simplicidad del método químico utilizado para el radiomarcado del anticuerpo, vida media del radioisótopo, disponibilidad de fotones gamma para su detección mediante Imagen Molecular. El radionúclido más utilizado en Medicina Nuclear para imágenes SPECT es el Tecnecio 99 metaestable ( $^{99m}\text{Tc}$ ).<sup>27- 30,34</sup>

#### 4.1.2.1. Características del Tecnecio 99 metaestable.

El Tecnecio es un metal perteneciente del grupo VIIB, número atómico 43, peso molecular de 98.906 UMA y números de oxidación del 7-4. Su isómero nuclear es el Tecnecio 99 metaestable ( $^{99m}\text{Tc}$ ), el cual se obtiene como residuo de las barras de combustible que se utilizan en las plantas de energía nuclear por decaimiento, dicho isotopo radioactivo decae mediante emisión de radiación gamma con una energía media de 140 KeV y tiene un periodo de semidesintegración de 6,02 horas de vida media ( $t_{1/2}$ ).<sup>26-27,34.-37</sup> De acuerdo con su Biodistribución esta no atraviesa de forma selectiva la Barrera Hematoencefálica intacta.<sup>27</sup>

Dentro de las ventajas de utilizar el  $^{99m}\text{Tc}$  en Medicina Nuclear podemos citar su disponibilidad, bajo costo, una vida física y biológica media de 6.0056 h y una emisión de rayos gamma de 140 KeV.<sup>28</sup>

#### 4.1.2.2. Pertecnetato sódico de $^{99m}\text{Tc}$

El Pertecnetato sódico de  $^{99m}\text{Tc}$  o ( $\text{TcO}_4^-$ ) es una solución estéril, obtenida a través de un generador de molibdato ( $^{99}\text{Mo}$ ) de sodio adsorbido por una columna de alúmina el cual decae a un estado metaestable de Tc, debido a que el  $^{99}\text{Mo}$  es un producto de fisión del  $^{235}\text{U}$ , se puede separar de los otros productos de la fisión, y usarse para generar  $^{99m}\text{Tc}$ . Para fines médicos, el  $^{99m}\text{Tc}$  se usa en la forma de Pertecnetato,  $\text{TcO}_4$ .<sup>33</sup>



Tras su administración intravenosa, el Pertecnetato se distribuye por todo el sistema vascular y se elimina por vía urinaria y excreción fecal. No se dispone de información sobre toxicidad aguda, subaguda o crónica por la administración de dosis única o administración continua. La cantidad de Pertecnetato sódico de  $^{99m}\text{Tc}$  administrada durante los procedimientos de diagnóstico clínico es muy baja y aparte de reacciones alérgicas, no se han notificado otras reacciones adversas.<sup>26</sup> Cuando se emplea  $^{99m}\text{Tc}$ , se observa un mayor acúmulo de la radiactividad en hígado (formación de coloide), tiroides, estómago e intestino.<sup>33</sup>

Algunos de los radiofármacos para diagnóstico más empleados en la actualidad son los que contienen radionúclidos de tecnecio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) como es el caso de  $^{99m}\text{Tc}$ -Citrato,  $^{99m}\text{Tc}$ -Gluceptato y  $^{99m}\text{Tc}$ -Gluconato, entre otros, ya que presentan propiedades nucleares favorables para la toma de imágenes y se utilizan para marcar diferentes moléculas como anticuerpos, ácidos grasos, péptidos, esteroides, adenovirus y fármacos como tamoxifeno.<sup>26-27, 39-40</sup>

## 5. Técnica de radiomarcado

Una de las técnicas empleadas actualmente para determinar la localización de una proteína o anticuerpo es el proceso denominado radio marcado, que consta de la unión de un isótopo radiactivo (sin afectar la región de reconocimiento) a una de las porciones del anticuerpo que actúa como molécula dando lugar a un “radiofármaco”, aunque existen diversos métodos de radiomarcado en el presente trabajo se usó el método directo.<sup>42-44</sup>

### 5.1 *Método directo*

Los métodos directos requieren de agentes reductores como el *2-mercaptoetanol* (*2-ME*) o el Estaño ( $\text{Sn}^{2+}$ ).

La reducción con *2-ME* se conoce también como el método de Schwarz, permite convertir los enlaces disulfuros del anticuerpo en grupos tioles libres que enlazan el  $^{99m}\text{Tc}$  por intercambio de ligando bajo la adición de un complejo débil como el  $^{99m}\text{Tc}$ -pirofosfato o  $^{99m}\text{Tc}$ -difosfonato.

Dicho marcaje se produce cuando el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  es reducido, por la acción de los iones  $\text{Sn}^{2+}$  u otro agente, a especies tales como:  $\text{TcO}^+$ ,  $\text{TcO}^{+2}$  o  $\text{TcO}^{3+}$ . En estos estados de oxidación, el tecnecio es capaz de formar enlaces de coordinación con los grupos sulfhídricos de la proteína. (Figura 10).<sup>20, 42,-44</sup>

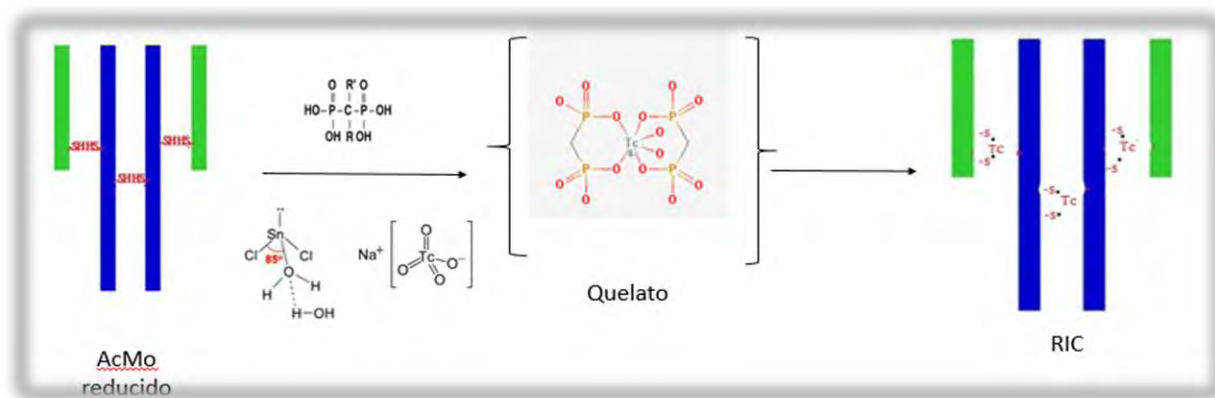


Figura 10 Radiomarcado del GFAP con  $^{99m}\text{Tc}$  por método de Schwarz.

Por otra parte, pueden ocurrir los llamados enlaces de baja afinidad con otras zonas de la molécula, además de existir la competencia de otras reacciones como: reoxidación a Pertecnetato, hidrólisis de los iones de tecnecio y el intercambio del tecnecio con otras especies presentes en el medio.<sup>33</sup> Todos estos inconvenientes deben tenerse en cuenta a la hora de obtener una información apropiada para el marcaje con  $^{99m}\text{Tc}$ .

## 5.2 Control de calidad

Los radiofármacos no poseen acción farmacológica, pero su administración en humanos requiere que se cumplan los requisitos exigidos a los productos farmacéuticos convencionales, además de los específicos por tratarse de sustancias radiactivas. Luego de la preparación de un radiofármaco y previo a su utilización en pacientes, es necesario verificar la calidad del mismo, para lo cual deben ser sometidos a una serie de controles de calidad como eficiencia, pureza o estabilidad.<sup>26</sup>

### 5.2.1. Eficiencia Radioquímica

Es el rendimiento total al final de la reacción partiendo de una actividad inicial considerada como un 100% este valor debe ajustarse con un factor de decaimiento, donde se considera el tiempo de vida media o periodo de semidesintegración (tiempo en el cual la radiactividad decrece hasta la mitad de su valor), la velocidad de la desintegración es constante y característica para cada radionúclido. La curva de desintegración se expresa matemáticamente mediante la siguiente ecuación diferencial (Figura 11).<sup>27-29</sup>

$$A(t) = A_0 e^{-\lambda(t)}$$

Figura 11. Ecuación del factor de decaimiento.

Donde:

$A(t)$  = Número de átomos que quedan al cabo del tiempo  $t$ .

$A_0$  = Número de átomos en el momento inicial  $t=0$ .

$\lambda(t)$  = Constante de desintegración característica de cada radionúclido en particular al cabo de un determinado tiempo.

$e$  = Exponencial.

Una elevada eficiencia determina el porcentaje de radiofármaco correctamente marcado con la mínima presencia de coloides o tecnecio libre o hidrolizado.

### 5.2.2. Pureza Radioquímica

La pureza radioquímica puede ser definida como el porcentaje de la radiactividad total en la forma química declarada en el radiofármaco. Esta puede cambiar a través del tiempo, principalmente por descomposición radiactiva, sin embargo las impurezas presentes pueden ser causadas por descomposición del radiofármaco, por acción de la temperatura, luz, radiólisis o marcación de una

impureza química con el mismo radionúclido, como por ejemplo la presencia de  $^{99m}\text{Tc}$  reducido hidrolizado. Las impurezas pueden alterar la Biodistribución de los radiofármacos, dando como resultado fracasos terapéuticos o de diagnóstico utilizando el radiofármaco. <sup>49-50</sup>

En el ámbito hospitalario, la pureza radioquímica de los radiofármacos se determina mejor por cromatografía en capa fina. El procedimiento requiere que la muestra se aplique a un medio estacionario (papel) y que este absorba una fase líquida (fase móvil) adecuada. Actualmente la técnica en uso es la Cromatografía Instantánea en Capa Fina – Sílica Gel (ITLC-SG). (Figura 13)<sup>49</sup>

Un radiofármaco debe cumplir con una pureza mayor al 90%, dicha cifra se determina mediante las siguientes fórmulas (Tabla 1):

Tabla 1. Fórmulas para la determinación de Pureza Radioquímica.
$\% \text{ TOP} = (T/T+B) * 100$
$\% \text{ BOTTOM} = (B/T+B) * 100$

Donde:

T: Top (cpm)

B: Bottom (cpm)

### 5.2.3. Estabilidad Radioquímica

Está definida como la capacidad de un producto farmacéutico para conservar sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas dentro de límites especificados, a lo largo de su tiempo de conservación. Con respecto a los radiofármacos estos deben presentar una estabilidad que garantice la integridad del radiofármaco el tiempo suficiente para realizar la administración a pacientes y ejercer su efecto de diagnóstico o terapéutico.<sup>26, 34,49</sup>

## 6. Imagen molecular

La Imagen Molecular surge como la disciplina que engloba las técnicas de imagen que permiten visualizar un radiotrazador en organismos vivos sin

perturbarlos. Se emplean determinadas sondas (biomarcadores) para visualizar determinadas áreas de interés o caminos moleculares. Los biomarcadores interaccionan químicamente con su entorno permitiendo la identificación de cambios a nivel molecular (expresión o inhibición proteica) que ocurren dentro de una región de interés. Además, la imagen molecular permite la cuantificación de la radiactividad captada por una región, imprimiendo mayor objetividad a las investigaciones biomédicas. Dentro de la Imagen Molecular se incluyen una variedad de modalidades de imagen como el PET, SPECT y la imagen óptica o ecografías que requieren de luz y sonido para obtener una imagen.<sup>51</sup>

La imagen molecular es uno de los métodos más eficaces para la localización de un fármaco o molécula radiomarcada (radiofármaco), las imágenes se obtienen posteriores a la administración del radiofármaco, este se incorpora a las rutas metabólicas del organismo, se distribuye y posteriormente se elimina. Las emisiones energéticas del átomo radiactivo que se une al fármaco pueden detectarse desde el exterior del sujeto de estudios mediante detectores de radiación, una vez detectadas, el equipo convierte estas señales en datos que al ser procesadas permiten la formación de la imagen.<sup>51</sup>

### 6.1. Tomografía Computarizada (CT)

La Tomografía Computarizada se usa rutinariamente como la modalidad diagnóstica de primer paso en neuro-imagen, con el fin de detectar o excluir una hemorragia intracraneal, ya sea traumática o no traumática y para detectar causas de enfermedades neurológicas, como tumores cerebrales, hematomas o trastornos neurodegenerativos.<sup>50</sup> Los métodos más eficaces para la localización de un radiofármaco es a través de imágenes en 2D o 3D, en las que se representa la distribución espacio-temporal de cierta actividad en órganos y tejidos. Cuando el radionúclido es emisor de un solo fotón (i.e.  $^{99m}\text{Tc}$ ), el detector empleado es una cámara gamma acoplada a un escáner para CT que puede formar imágenes fusionadas de gammagrafías (SPECT) con imágenes tomográficas (CT) permitiendo así el estudio de procesos metabólicos o funcionales a partir de la Biodistribución que sigue el radiofármaco.<sup>50-52</sup>

## 6.2. Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único (SPECT).

La Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único o "Single-Photon Emission Computed Tomography" (SPECT) está basada en la formación de la imagen mediante la detección de rayos gamma proporcionando una imagen tridimensional de la distribución del radiotrazador en la región a estudiar. Para ello, se utiliza una gamma-cámara rotatoria, que obtiene imágenes de una zona en concreto desde diferentes ángulos, lo que permite su posterior reconstrucción en 3D.<sup>51-52</sup>

Los procedimientos en medicina nuclear para la identificación de sobreexpresión de GFAP requieren el uso de radiotrazadores que permitan la rápida ubicación de la zona de LTME localizada, ante lo cual se hace necesario el uso de nuevas alternativas como es el caso de los anticuerpos radiomarcados con radioisótopos, para permitir la identificación "*in vivo*" por Imagenología con el fin de facilitar el diagnóstico y/o terapia.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Lesión Traumática en Médula Espinal es una patología con una alta repercusión a nivel físico, social y económico.<sup>1-10</sup> A nivel fisiológico implica la presencia de "astrogliosis" que conlleva a la sobreexpresión de GFAP.<sup>20-22</sup> Actualmente no se cuenta con ninguna estrategia de diagnóstico o de identificación selectiva "*in vivo*" de GFAP presentes en astrocitos reactivos ante una LTME en modelos murinos mediante Imagenología Molecular, por lo cual se propone el uso de anticuerpos monoclonales radiomarcados con el fin de obtener una herramienta útil para el diagnóstico rápido y eficiente de su sobreexpresión y así seleccionar el tratamiento óptimo al estadio de la enfermedad.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Este proyecto tiene como finalidad la rápida identificación de la sobreexpresión de la proteína GFAP en astrocitos en un modelo murino de Lesión Traumática tardía inducida en Médula Espinal implementando un método de radiomarcado de un AcMo GFAP bioconjugado con el isótopo  $^{99m}\text{Tc}$  y haciendo uso de la Imagenología Molecular a fin de dar un método alternativo de identificación aunado a los ya conocidos para dar un diagnóstico y tratamiento óptimos para tal patología.

#### **V. HIPÓTESIS**

El radiomarcado del AcMo GFAP con el Pertecnetato sódico de  $^{99m}\text{Tc}$  permitirá la identificación mediante Imagen Molecular de astrocitos que sobreexpresen GFAP en un modelo murino de Lesión Traumática de Médula Espinal.

#### **VI. OBJETIVOS**

Objetivo General

- Evaluar la captación de GFAP en los astrocitos tras una Lesión Traumática en Médula Espinal de rata por medio del radiomarcado del AcMo GFAP con  $^{99m}\text{Tc}$ .

Objetivos específicos:

- 1.- Estandarizar y caracterizar el radiomarcado del GFAP con Pertecnetato sódico de  $^{99m}\text{Tc}$ .
- 2.- Evaluar la afinidad "*in vitro*" del radioinmunoconjugado GFAP- MDP- $^{99m}\text{Tc}$  en cortes histológicos de tejido medular de ratas con lesión traumática en médula espinal.
- 3.- Determinación de la captación "*in vivo*" del radiofármaco GFAP-MDP- $^{99m}\text{Tc}$  en lesión traumática en médula espinal en rata mediante técnica de imagen molecular  $\mu\text{SPECT/CT}$ .

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

### Universo de estudio (población o muestra)

- Ratas Long Evans

### Clasificación del protocolo

- Estudio experimental, aleatorio, longitudinal y controlado.

### ***Variables:***

#### *Independientes:*

- Lesión Traumática de Médula Espinal.
- Tiempos post-administración (0, 1 y 3h).

#### *Dependientes:*

- Sobreexpresión de la proteína GFAP.
- Biodistribución del radiofármaco.
- Biodistribución del <sup>99m</sup>Tc libre.
- Captación del Radioinmunoconjugado.



## VIII. METODOLOGÍA

### Obtención del Radioinmunoconjugado (GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc)

Para la obtención del radiofármaco o radioinmunoconjugado (RIC) se implementó la técnica de radiomarcado por Método Directo (Método de Schwarz) en el cual se humectó un filtro Amicon ultracel (30K) de Millipore (Darmstadt, Alemania) con 400  $\mu$ L de Solución Salina Isotónica (SSI) desgasificada con Nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) durante todo el procedimiento, en el cual se concentraron 50 $\mu$ g/250  $\mu$ L de AcMo GFAP, adquirido por Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Mouse Monoclonal GFAP (GA-5) sc- 58766 (Dallas, TX. USA), adicionando 100  $\mu$ L de SSI, éste cuidadosamente se homogeneizó y centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min, se invirtió el filtro adicionando otros 100  $\mu$ L de SSI al filtro Amicon y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min (Figura 12). Después de obtener al GFAP concentrado se agregó 1  $\mu$ L de 2- $\beta$ Merceptoetanol (2- $\beta$ ME) Sigma Aldrich Co. Grado Reactivo (St. Louis, MO, USA) y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente. Se reconstituyó el kit de Metilendifosfonato (MDP) MDP Jeubilant Draximage, Inc. (Kirkland, Québec, Canadá) con 5 mL de SSI se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Se humectó otro filtro Amicon 30K, se agregó dentro de este el AcMo GFAP/2- $\beta$ ME, adicionando 100  $\mu$ L de SSI, se homogeneizó y centrifugo a 12 000 rpm durante 5 min para eliminar el 2- $\beta$ ME, se invirtió el filtro agregando 100  $\mu$ L de SSI al AcMo GFAP reducido se centrifugo a 10 000 rpm durante 7 min para recuperar el anticuerpo reducido. Se agregaron 40  $\mu$ L del MDP reconstituido al vial con el AcMo reducido y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente, se cuantificó la actividad (mCi) y volumen ( $\mu$ L) del Pertecnetato de sodio de <sup>99m</sup>Tc, adquirido de una

radiofarmacia, Medidores Industriales y Médicos S.A. de C.V. (MYMSA, Ciudad de México, México) y de este se gotearon 5 mCi de este en el vial con AcMo GFAP/MDP y se homogeneizó. Se cuantificó la actividad en mCi y se tomó la hora inicial de la reacción inmediatamente después de haber agregado el radionúclido al inmunoc conjugado. Dicha actividad será considerada como la actividad inicial y equivale al 100% de la actividad. Se dejó incubar el RIC durante 1 h a temperatura ambiente y se purificó dos veces el RIC empleando Amicon 30K.

Se prosigió con la evaluación de Control de Calidad del RIC.

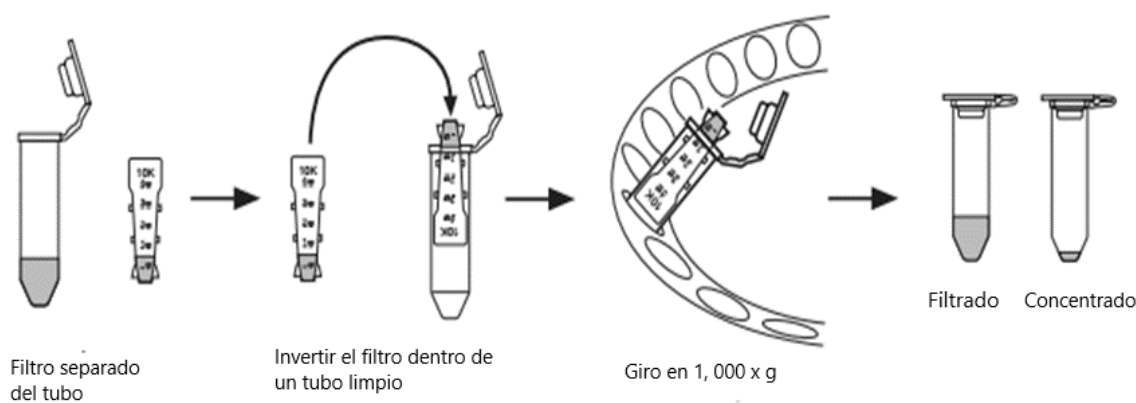


Figura 12: Implementación de filtros Amicon para el proceso de radiomarcado del AcMo GFAP.

- Nota: Es importante desgasificar la Solución Salina (SSI) con Nitrógeno NF Grado Medicinal (The Harris Products Group) durante todo el proceso de radiomarcado, previo a su uso. Para trabajar bajo condiciones asépticas se sugiere esterilizar la zona de trabajo con luz UV durante 15 minutos. La humectación del filtro Amicon sigue los siguientes parámetros: 12 000 rpm durante 5 minutos.

## Control de Calidad del RIC (GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc)

### A. Eficiencia Radioquímica

#### Metodología:

Se cuantificaron las actividades inicial y final del RIC (GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc) en un activímetro (Activímetro o calibrador de dosis, CRC 55t-PET CAPINTEC Serie 570094 Folio: 1259) al finalizar la incubación, dichas actividades obtenidas se ajustaron por el factor de decaimiento tomando en consideración el tiempo transcurrido desde la adición del radionúclido hasta el momento de término de incubación bajo la siguiente fórmula:

$$e^{(-\lambda \text{ } ^{99m}\text{Tc}(t))}$$

$$A(t) = A_i e^{-\lambda(t)}$$

Donde:

A (t) = Actividad a un determinado tiempo.

$A_i$  = Actividad Inicial a t=0.

$\lambda(t)$  = Constante de desintegración característica de un radionúclido en particular al cabo de un determinado tiempo. En este caso para <sup>99m</sup>Tc es  $1.8938 \times 10^{-3}$

e= Exponencial.

Para el cálculo de la eficiencia de reacción se relaciona tomando en consideración la actividad inicial de la técnica de radiomarcado.

Actividad Inicial mCi (al tiempo 0)  $\longrightarrow$  ---100%

Actividad final en mCi (ajustada por decaimiento)  $\longleftarrow$  ----- X

## B. Pureza Radioquímica

**Metodología:** (Triplicado por cada fase móvil)

Para la determinación de Pureza Radioquímica se empleó la técnica Cromatografía Instantánea en Capa Fina – Sílica Gel (iTLC-SG), en la cual se cortaron y secaron tiras de iTLC-SG, Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA) en una estufa BOV-VF Series, México) a una temperatura de 50°C por un lapso de 3 h aproximadamente. Se agregó 1 mL de cada fase móvil a evaluar Solución Salina Isotónica (SSI) y Metiletilcetona (MEC) de Sigma Aldrich Co, Grado Reactivo (St. Louis, MO, USA) respectivamente a los tubos de ensayo correspondientes. Con una micropipeta se aplicó 1 µL del RIC doblemente purificado a 1 cm de la base de cada tira, ésta se introdujo cuidadosamente en los tubos con las fases móviles para obtener la separación del RIC del  $^{99m}\text{Tc}$  libre y del hidrolizado por medio de capilaridad, se retiraron de los tubos al término de la separación y secaron a temperatura ambiente. Cada tira se cortó por la mitad para diferenciar entre el Top y el Bottom y los fragmentos se colocaron en tubos de ensayo de plástico para su cuantificación. Se encendió el contador de centelleo de pozo (Ludlum Measurements Inc., Sweetwater, TX, USA), este se ajustó con los parámetros correspondientes al radionúclido usado (HV: 2.74, THR: 1.2 y WIN: 0.4) y en unidades de cuentas por minuto (cpm) se tomó por triplicado el ruido de fondo para descontarlo de la actividad de la muestra y se prosiguió a la lectura del top y el bottom respectivamente para finalizar con la determinación de la pureza radioquímica con las formulas de la Tabla 1.

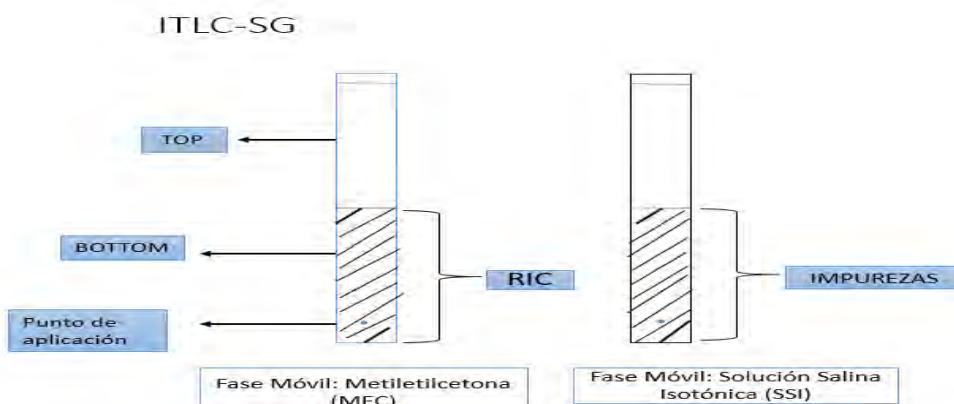


Figura 13. Representación de la Técnica por Cromatografía Instantánea en Capa Fina – Sílica Gel (iTLC-SG).

## C. Estabilidad Radioquímica

### Metodología:

Para la prueba de Estabilidad Radioquímica, se requirió de Suero Humano (SH), para la cual se realizó una flebotomía a un individuo de preferencia en ayuno, extrayéndole un volumen aproximado de 5 mL de sangre, la muestra se dejó en reposo hasta que presentó la coagulación y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos.

Para la determinación de dicho control, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del RIC (GFAP/MDP/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) con una micropipeta y se agregaron al microtubo con 200  $\mu\text{L}$  del SH obtenido, se homogeneizó cuidadosamente y al término se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h. Se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla RIC/SH a los tiempos correspondientes 1, 2, 3, 6, 12 y 24 h implementándose la técnica de Cromatografía Instantánea en Capa Fina – Sílica Gel (iTLC.SG) anteriormente descrita (Figura 13). Se determinó la estabilidad y se graficó el porcentaje de actividad localizada en el Bottom (donde debe mantenerse la proporción más elevada del RIC) mediante la fórmula siguiente:

$$B = ((T+B)/T) * 100$$

Donde:

T: Top (cpm)

B: Bottom (cpm)

Nota: Durante todo el Control de Calidad de monitorea la energía emitida del radionúclido por medio del Detector de Radiación Ionizante (Geiger Muller Marca Ludlum Modelo 2241)

#### D. Prueba de Integridad del radiofármaco (GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc)

**Técnica:** Electroforesis.

**Método:** PAGE-SDS (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de sodio) al 10%.

**Especificaciones:** Relación: 1:1 (muestra: buffer de carga)

GFAP [2µg]

Marcador de peso molecular: Thermo Scientific Spectra Multicolor #26613

Voltaje: 90 volts

Revelador: Nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>)

**Fundamento:** Consta de la separación de proteínas por tamaño y carga de la materia según su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz porosa.

#### **Metodología:**

Para la prueba de integridad se sanitizó el área de trabajo y de los aditamentos de la Cámara de Electroforesis Vertical para Proteínas (Bio-Rad., Ciudad de México, México) se pesaron y prepararon las soluciones reactivas correspondientes a la sección del gel separador y concentrador, se insertaron los vidrios entre los separadores estos se ajustaron y se colocaron en sus respectivos soportes de la cámara formando un sándwich con los separadores. Se pesó en una Balanza analítica (Sartorius, modelo BL 210S ) el Persulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y se preparó antes de su uso; se vertió la mezcla del “Gel separador” hasta 1.5 cm antes del límite superior agregando 1 mL de alcohol isopropílico para que se favoreciera la formación del límite superior del “Gel separador” se dejó gelificar por aproximadamente 20 minutos, para agregar sobre este la mezcla del gel concentrador hasta el borde superior de los vidrios, sobre este se colocó el peine y se dejó solidificar a temperatura ambiente (el peine se retiró al término de la gelificación).

Se agregó la Solución Reguladora de Corrimiento 1X en el tanque de la cámara de electroforesis, adicionando a los pozos del gel las muestras colectadas durante el proceso de radiomarcado para realizar el seguimiento de la integridad del anticuerpo, las muestras se cargaron bajo las siguientes condiciones:

Volumen total (10  $\mu$ L) Relación 1:1 (Muestra: buffer de carga)

Tabla 2. Secuencia de cargado de muestras en PAGE-SDS al 10%	
Número de pozo	Muestra
A	Marcador PM CAT #26618 --6 $\mu$ L (cargar al final)
B	GFAP <sup>B</sup>
C	Filtrado <sup>B</sup>
D	GFAP reducido <sup>B</sup>
E	GFAP/MDP
F	GFAP/MDP/ <sup>99m</sup> Tc <sup>B</sup>
G	Purificación I <sup>B</sup>
H	Purificación II <sup>B</sup>
I	MDP (SSI) <sup>B</sup>
J	GFAP Condiciones Semireductoras <sup>A</sup>
K	GFAP Condiciones Reductoras <sup>A</sup> (con 5 min $\Delta$ 100° C)

A= Buffer de carga con  $\beta$ -ME

B= Buffer de carga sin  $\beta$ -ME

El equipo se conectó a la fuente de poder y se ajustó a 90 volts, se esperó la separación por tamaño y peso molecular del anticuerpo a analizar, los geles se retiraron con cuidado y se prosiguió a teñir con la técnica de nitrato de plata hasta que se observó el peso molecular de cada carril.

## **E. Prueba de Especificidad del radiofármaco (GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc).**

**Técnica:** Método de Western Blot.

**Método:** Inmunotransferencia (WB).

**Fundamento:** Método de identificación de proteínas en una mezcla compleja, las proteínas se separan mediante PAGE-SDS al 10% debido a las diferencias de peso molecular. Las proteínas separadas en el medio gelificado se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o PVDF para su análisis mediante anticuerpos específicos (Figura 14).

**Especificaciones:**

AcMo: GFAP [2µg]

Dilución GFAP: 1:500 en Solución Reguladora de Transferencia (TBS)

**Metodología:**

- **Separación por tamaño (Electroforesis)**

Se retiraron cuidadosamente los geles de los vidrios de la cámara electroforética obtenidos en la prueba de electroforesis, esto se lavaron a fin de eliminar todo resto de solución reguladora de corrida. Al finalizar estos fueron introducidos en Solución Reguladora de Transferencia (TBS) pH 8.3 por aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente.

- **Transferencia a un soporte sólido.**

Se limpió y montó el equipo de Electrotransferencia Bio-Rad (Cámara de Inmunotransferencia Trans-Blot® SD), se cortaron membranas de papel de nitrocelulosa, correspondientes al tamaño del gel (6.5cm x 8.5 cm). Las membranas y los filtros se humectaron con agua Mili-Q para dar soporte a la membrana y al gel.



Se impregnó el gel sobre la membrana que fue cubierta por otro filtro, evitándose las burbujas ya que estas provocan una mala transferencia de las proteínas al papel, se cerró la cámara y se inició la transferencia con voltaje de 300 W (1.3 A) durante 30 min. Se quitaron los filtros y el gel cuidadosamente, se extrajo la membrana seguido de sus dos lavados con PBS y se mantuvo en agitación durante 5 min, este se guardó en refrigeración.

### Visualización mediante la marcación de la proteína con el uso de anticuerpos primario.

Se realizó una dilución 1:500 del AcMo GFAP (AcMo Primario) con Solución Reguladora de Transferencia (TBS), seguido de la preparación de la solución de leche, la cual se vertió sobre la membrana junto con el AcMo primario y se dejó reposar durante 2 horas, al finalizar se incorporó el anticuerpo secundario (anti-mouse) sobre la membrana, con el fin de evaluar la especificidad del anticuerpo GFAP.

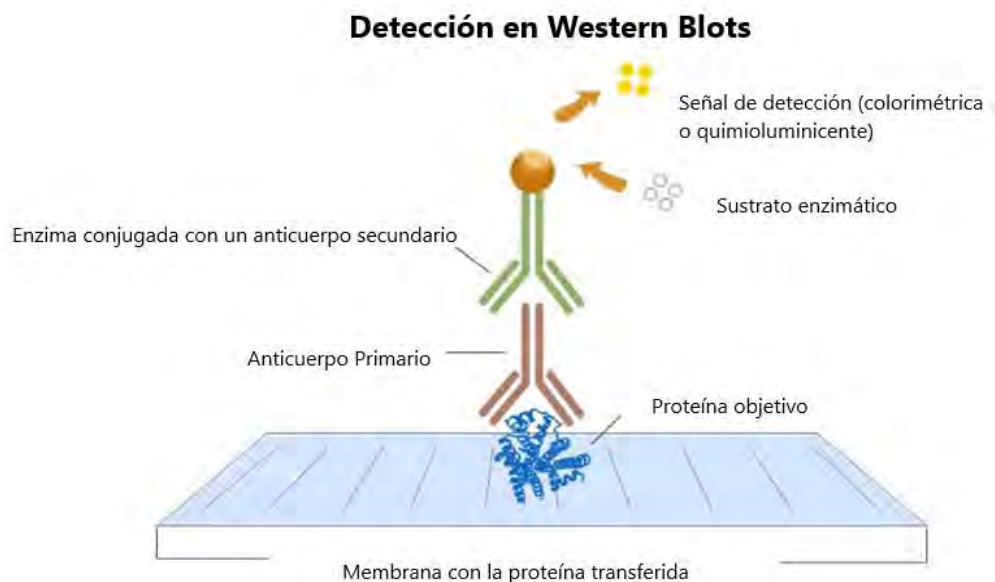


Figura 14. Mecanismo de la técnica de Western Blot.

## Técnica del modelo de Lesión Traumática en Médula Espinal.

Al término de la evaluación del proceso de radiomarcado el siguiente objetivo establece el empleo del modelo con LTME en ratas Long Evans. Para el desarrollo de éste se realizó la técnica de Laminectomía a nivel de Torácica 9 (T9), la cual se describirá a continuación, cabe destacar que dicha técnica fue realizada por un grupo de expertos en el área de lesiones traumáticas en la Fundación CAMINA bajo el mando del Dr. Horacio Reyes Alva y del Dr. Pablo Zambrano.

### Especificaciones:

Modelo en Ratas Long Evans.

Lesiones severas de 15 a 20 días de recuperación.

Eutanasia: Sobredosis de Pentobarbital sódico (80mg/Kg) Vía Intraperitoneal.

Norma: NOM-062-ZOO-1999.

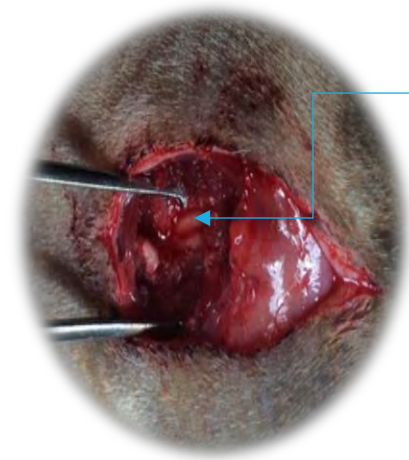


Figura 15. Laminectomía a nivel de torácica 9 (T9) en rata Long-Evans.

### Metodología

Dicha técnica se realizó bajo condiciones asépticas en ratas de la cepa Long Evans, estas fueron anestesiadas con Sevoflurano 1.4% (Anestésico Inhalatorio Lisorane Isoflurano frasco de 100 mL), se realizó una incisión a nivel de Torácica 9 (T9) para la extirpación completa de la lámina de la vértebra, preservando la integridad de las meninges. Se fijó un impactador del cual caerá un pistón de 10 gramos a una altura de 50 mm sobre la ME para ocasionar una lesión severa (Figura 15).

Al término de las lesiones, las ratas se mantuvieron en recuperación por un lapso de 15 días post-lesión, para la evaluación de la expresión de la proteína GFAP al término de este tiempo.

## **Evaluación de la afinidad “*in vitro*” del radioinmunoconjugado GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc por radioinmunoquímicas.**

**Técnica:** Inmunoquímica (IHC)

**Método:** Radioinmunoquímicas.

Seguido de las laminectomias realizadas en nuestros modelos murinos, éstas se dejaron en recuperación por 15 días, tras el tiempo concluido se toman cortes histológicos de la ME en parafina, las cuales estarán en laminillas de 9mm de ancho x 5cm de largo con un espesor de 5-6 micras.

### **Controles:**

1. Corte histológico sin LTME con el Radioinmunoconjugado (GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc)
2. Corte histológico con LTME con el Radioinmunoconjugado (GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc)

### **Cortes histológicos de Médula Espinal a diferentes tiempos post-lesión:**

- N: Normal sin LTME (control o niveles basales de astrocitos)
- 1 d: 1 día post-LTME
- 20 d: 20 días post-LTME
- 35 d: 35 días post- LTME

### **Muestras control**

- <sup>99m</sup>Tc
- GFAP/<sup>99m</sup>Tc (RIC)

### **Metodología:**

Se atemperaron los cortes histológicos por 30 minutos, se precalentó la estufa a 60°C por 30 min (Previamente estandarizado) y se colocaron los cortes histológicos

de manera inclinada sobre papel absorbente para evitar que la parafina cayera de forma vertical al momento del punto de fusión.

Los cortes se retiraron 15 minutos antes del término del proceso de desparafinado, estos se sometieron a una cadena de reactivos Sigma Aldrich Co. Grado Reactivo (St. Louis, MO, USA) por 30 segundos en el orden siguiente:

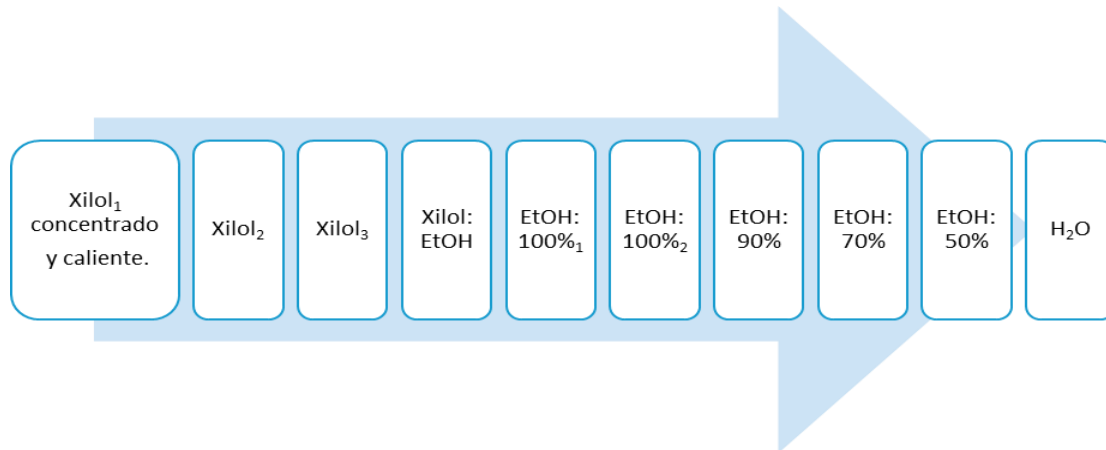


Figura 16. Secuencia de reactivos para el proceso de desparafinado de cortes histológicos.

Se vertió citrato/PBS en un frasco de 10 mL y se calentó en baño maría a 95 °C, cada laminilla se introdujo en este durante 5-10 minutos, se retiraron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Los cortes se introdujeron a un vial con MetOH: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1) para realizar los correspondientes lavados, seguido se introdujeron a un vial con MetOH: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2) durante 8 min por 2 veces, realizándose dos lavados con PBS por 5 minutos cada uno en agitación. Se realizó el proceso de radiomarcado de GFAP/MDP/ <sup>99m</sup>Tc (Figura 10). Se preparó el AcMo Primario GFAP Dilución 1:20 (1µL GFAP + 19 µL H<sub>2</sub>O). Las laminillas se acomodaron sobre la cámara húmeda y se adicionó el anticuerpo primario no más de 10 µL sobre cada una, estas se dejaron en reposar en agitación de 1-2 h. al término de la incubación del anticuerpo se realizaron 5 lavados de PBS por 5 min en agitación.

Se determinó el número de cuentas por minuto (cpm) de cada lámina en el contador de centelleo tipo pozo y se contrastaron los cortes histológicos bajo el fundamento de detección en WB (Figura 14).

## Obtención de imágenes en $\mu$ SPECT- CT en modelos murinos (Long-Evans) con $^{99m}\text{Tc}$ libre, LTME y sin LTME.

**Técnica:** Imagen Molecular.

**Método:** Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único ( $\mu$ SPECT).  
Tomografía Computarizada (CT)

### **Metodología:**

La biodistribución de  $^{99m}\text{Tc}$  libre se realizó en un modelo murino sin lesión, esta recibió aproximadamente (40  $\mu\text{Ci}$ ). La radioactividad se midió en un contador gamma protegido del tipo de pozo.

Para la evaluación de la captación de la proteína GFAP por imagen molecular, primero se realizó el proceso de radiomarcado por método directo del RIC GFAP/MDP/  $^{99m}\text{Tc}$  (Figura 10). Se dividió el volumen obtenido de RIC en dos jeringas de insulina, una para la rata lesionada y otra para la rata sin lesión, en cada una se agregó agua inyectable cbp para llegar a un volumen final de 180  $\mu\text{L}$ .

Se anestesiaron los modelos murinos con Isoflurano en un evaporador de uso veterinario (Midmark Marca Matrx), manteniendo condiciones de oxígeno y anestesia adecuadas, acto seguido se administró el radioinmunoconjugado sobre la lesión "*in situ*" con ayuda del dosificador, anotándose la hora de inyección y la actividad administrada ( $\mu\text{Ci}$ ) junto con la actividad remanente en la jeringa, se esperó un aproximado de 40 minutos a fin de que el RIC se distribuyera en toda la ME en el modelo murino.

Se encendió el sistema microPET / SPECT / CT (Albira ARS, Oncovision, Valencia, España), se establecieron los parámetros de adquisición en el equipo, se tomó el offset (Initial Horizontal Position (mm) para SPECT y CT los cuales fueron:

SPECT FOV 80 mm PH 60 s

CT GOOD HD-HV

Se tomaron las imágenes en los siguientes tiempos 0 h, 1 h y 3 h post administración y se realizaron sus respectivas reconstrucciones mediante el

software Amide, seguido se cuantificó la captación mediante el programa PMOD (Versión 3.9 PMOD Technologies, Ltd., ZH-CH, 2017) para la visualización de las imágenes se empleó el programa ParaView Python (Versión 3.0, National Technology & Engineering Solutions of Sandia, Kitware Inc. New México PO, USA, 2005-2017)

Nota: Para este objetivo se emplearon ratas sin lesión como control negativo para evaluar la Biodistribución del RIC sin la presencia de LTME. Se monitoreo la energía emitida mediante el Detector de Radiación Ionizante (Geiger Muller Marca Ludlum Modelo 2241)



Figura 17 Imagen del modelo murino Long-Evans lesionada y canulada para la obtención de imágenes por  $\mu$ SPECT-CT para la evaluación de la captación del radioinmuconjugado caracterizado.

## IX. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### **Radiomarcado de GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc por método directo.**

Se estandarizó el procedimiento para la obtención del radioinmunoconjugado GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc bajo el método de “Radiomarcado Directo o de Schwarz”. Se empleó como agente reductor el 2-βMercaptoetanol (2-βME) manteniendo estricto control en el tiempo de incubación y volumen empleado para evitar la fragmentación del anticuerpo por sobreexposición a este agente, quedando estandarizado la adición de 1 μL 2-βME y un tiempo de 30 minutos de incubación. También se identificaron otros puntos críticos en el proceso de radiomarcado como el tiempo de desgasificación con Nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) durante toda la caracterización, este punto es indispensable para mantener las condiciones óptimas para el radiomarcado, ya que la función del nitrógeno es desplazar el oxígeno en nuestra preparación y así evitar reacciones redox y la presencia de radicales libres, así mismo se probaron diversos tiempos de incubación y concentraciones de agente intercambiador y radionúclido, quedando establecido un volumen de 40 μL de Draximage-MDP y tiempo de incubación del de 1 h post-adición de <sup>99m</sup>Tc al AcMo GFAP/MDP a fin de obtener un radiofármaco con una buena eficiencia, pureza, estabilidad y afinidad.

Los puntos críticos a considerar durante el procedimiento de radiomarcado son los siguientes:

**Tabla 3. Puntos críticos del método de radiomarcado.**

<b>I. Tiempo de incubación</b>
<b>II. Concentraciones de agente reductor/ligando intercambiador/radionúclido</b>
<b>III. Desgasificación</b>

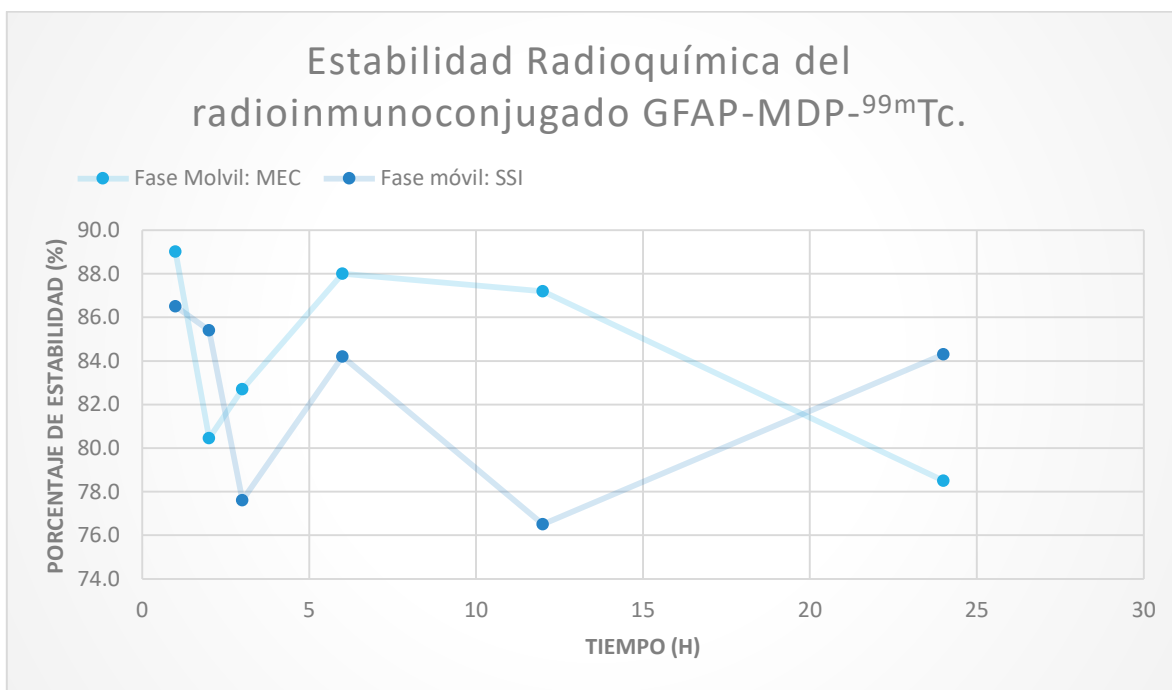
Seguido de la obtención del radioinmunoconjugado se realizó el control de calidad bajo los lineamientos de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, la cual indica que para que un radiofármaco sea administrado este debe cumplir ciertas especificaciones dentro del control de calidad. Dentro de las pruebas requeridas citamos las siguientes, Eficiencia Radioquímica, Pureza Radioquímica, Estabilidad Radioquímica, aunado a pruebas de Integridad y Especificidad del anticuerpo que emplearemos para la evaluación de la captación de la proteína a diversos tiempos post administración del radioinmunoconjugado.

Tabla 4. Resultados del Control de Calidad del RIC (GFAP/MDP/ <sup>99m</sup> Tc) n=4		
Radiomarcado de AcMo GFAP-MDP- <sup>99m</sup> Tc	Promedio	D.E.
Eficiencia Radioquímica	87.3 %	2.17
Pureza Radioquímica	86.3 %	2.17
Estabilidad Radioquímica	88.0 %	0.71

En la Tabla 4 podemos observar el porcentaje obtenido en los controles de calidad del radiofármaco caracterizado bajo una n= 4 radiomarcados efectuados, la eficiencia radioquímica obtenida fue de 87.3%, pureza radioquímica de 86.3% y una estabilidad del radiofármaco de 88.0%, dichos controles se encuentran muy cercanas a los considerados por la FEUM, la cual especifica que se debe cumplir con un 90% de eficiencia y pureza, esto con el fin de obtener un complejo que nos permita obtener una identificación óptima de la sobreexpresión de la proteína por medio de imagen molecular. Los datos obtenidos, pueden mejorarse con la adición de agentes como el ácido ascórbico, ácido gentísico y ascorbato de sodio a fin de mantener la estabilidad y reducir la presencia de impurezas que pueden ser causadas por descomposición del radiofármaco, acción de luz, temperatura, radiolisis o de la marcación de una impureza química con el radionúclido, aunado a



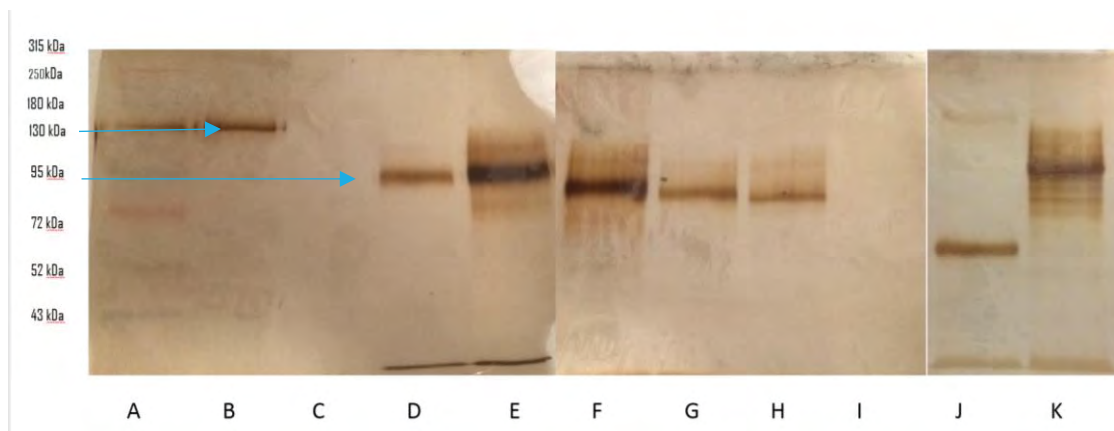
un incremento en las revoluciones por minuto y tiempo de centrifugado empleando los filtros Amicon 30K. (Figura 12).



**Figura 18.** Estabilidad Radioquímica del radioinmunoconjugado GFAP-MDP-<sup>99m</sup>Tc evaluado a 24 h en dos fases móviles.

En la Figura 18 podemos observar el comportamiento de nuestro radioinmunoconjugado en suero humano a través del tiempo (1, 2, 3, 6, 12 y 24 h), en el cual podemos observar que en el lapso de 1-2 h este sufre una baja en el porcentaje de estabilidad, debido a la alta presencia de proteínas plasmáticas presentes en el suero o a la sensibilidad que presenta nuestro RIC ante la presencia del aire, pero seguido de las 3 h esta permanece constante, dichos resultados de estabilidad pueden optimizarse con la adición de sustancias anteriormente mencionadas a fin de inhibir la transquelación de nuestro RIC.

## PAGE-SDS (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida) al 10%.



**Figura 19.** Evaluación de la integridad del RIC GFAP/<sup>99m</sup>Tc a través del proceso de radiomarcado por PAGE al 10%.

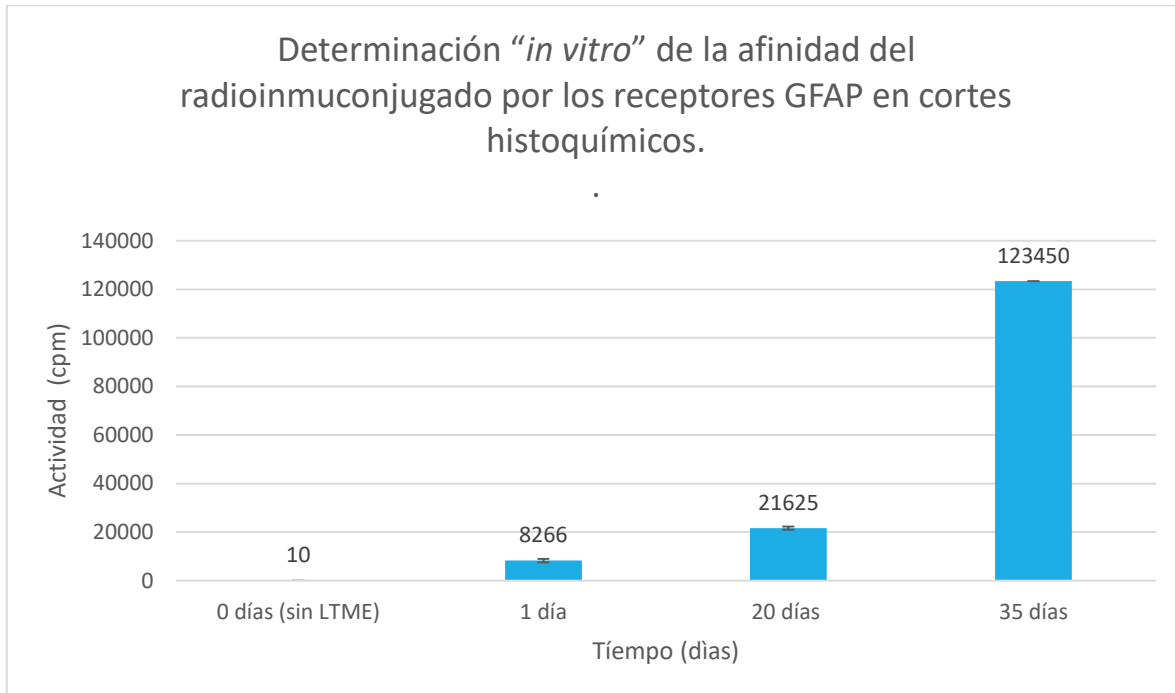
- A:** Marcador Molecular
- B:** [GFAP]
- C:** Filtrado
- D:** GFAP reducido
- E:** GFAP/MDP
- F:** Radioinmunoconjugado (RIC)
- G:** RIC (Purificación I)
- H:** RIC (Purificación II)
- I:** Draximage-MDP (MDP)
- J:** Condiciones reductoras
- K:** Condiciones semireductoras

En la figura 19 podemos observar la integridad del radioinmunoconjugado (GFAP/MDP/<sup>99m</sup>Tc) a través del proceso de radiomarcado; en el carril B encontramos el AcMo GFAP tomado directamente de vial mostrando un peso molecular de 123 kDa, lo cual no es conforme a lo indicado en la ficha técnica, ya que dicho anticuerpo tiene un peso molecular de 50 kDa, este resultado evidencia un proceso de dimerización, el cual es provocado por alguna alteración en su conformación debido a la exposición de variables como la temperatura o agentes reductores, los heterodímeros que puede presentar el GFAP son el alfa y Épsilon<sup>[22]</sup>. En el carril C se encuentra el filtrado de nuestro AcMo GFAP en el cual no hay presencia de algún bandeo debido a que hay nula presencia de proteína, lo cual indica que cuando concentramos el GFAP en el Amicon 30k a un determinado número de rpm y tiempo este queda totalmente en el filtro y en

el filtrado solo queda el agente conservador, dentro de los carriles D-H podemos observar que el peso molecular se mantiene en un aproximado de 95 kDa durante todo el proceso de radiomarcado que incluye la reducción de los puentes disulfuro, la adición del ligando intercambiador y de la adición del radioisótopo, en el carril I no hay presencia de algún bandeo esto debido a que el Draximage-MDP que actúa como un ligando intercambiador y en este tampoco hay presencia de proteína, en los últimos dos carriles correspondientes a J-K son las condiciones reductoras y semireductoras respectivamente, en las cuales podemos ver una gran dimerización visualizada por un bandeo que pondera en un aproximado de 72 kDa ya que fue sometida a un agente reductor y calor, lo cual implica una desnaturalización de la proteína, ante los resultados observados se hizo necesario realizar la prueba de especificidad por medio de una electrotransferencia.<sup>23</sup>

Tras los pesos moleculares observados anteriormente (mayores a lo esperado) se hizo necesario evaluar la especificidad del radiofármaco caracterizado, con el fin de determinar si las regiones de reconocimiento del anticuerpo monoclonal se mantuvieron en condiciones óptimas tras la presencia de agentes reductores por lo cual se efectuó una prueba de inmunotransferencia en la cual se demostró que existe especificidad por nuestro receptor primario el anti-GFAP. Determinando que nuestro anticuerpo monoclonal radiomarcado se considera óptimo, aceptable y confiable para la evaluación de la captación a diferentes tiempos.

## Determinación “*in vitro*” de la afinidad del radioinmuconjugado por los receptores GFAP en cortes histológicos.



**Figura 20.** Determinación “*in vitro*” de la afinidad del radioinmuconjugado por los receptores GFAP en cortes histológicos a diferentes tiempos post-laminectomía.

Para la determinación “*in vitro*” de la afinidad del radioinmuconjugado por los receptores GFAP en cortes de tejido medular murino, se emplearon cortes histológicos de diferentes días post-lesión, se sabe que la expresión de GFAP varía con respecto al estadio de la LTME, existen reportes que muestran que a menor tiempo post-lesión, menor expresión de GFAP. En la exposición de los cortes histológicos al RIC se observa una mayor actividad (cuantificada en cpm) mientras mayor es el tiempo post-lesión, esto debido a que la sobreexpresión de GFAP es proporcional a la cantidad de astrocitos reactivos presentes, la expresión de la proteína se eleva mientras mayor tiempo transcurre después de la lesión, este resultado permite confirmar que el proceso de radiomarcado del anti-GFAP no afecta a las regiones de reconocimiento del anticuerpo. <sup>13, 17, 24</sup>

Los controles evaluados (cortes de rata sin LTME) permiten establecer que el GFAP radiomarcado no se une inespecíficamente a tejidos que no poseen expresión de la proteína de interés.

**Evaluación de la Biodistribución de Pertecnetato sódico de  $^{99m}\text{Tc}$  libre en rata sin LTME y captación de la proteína GFAP en ratas con LTME y sin LTME.**

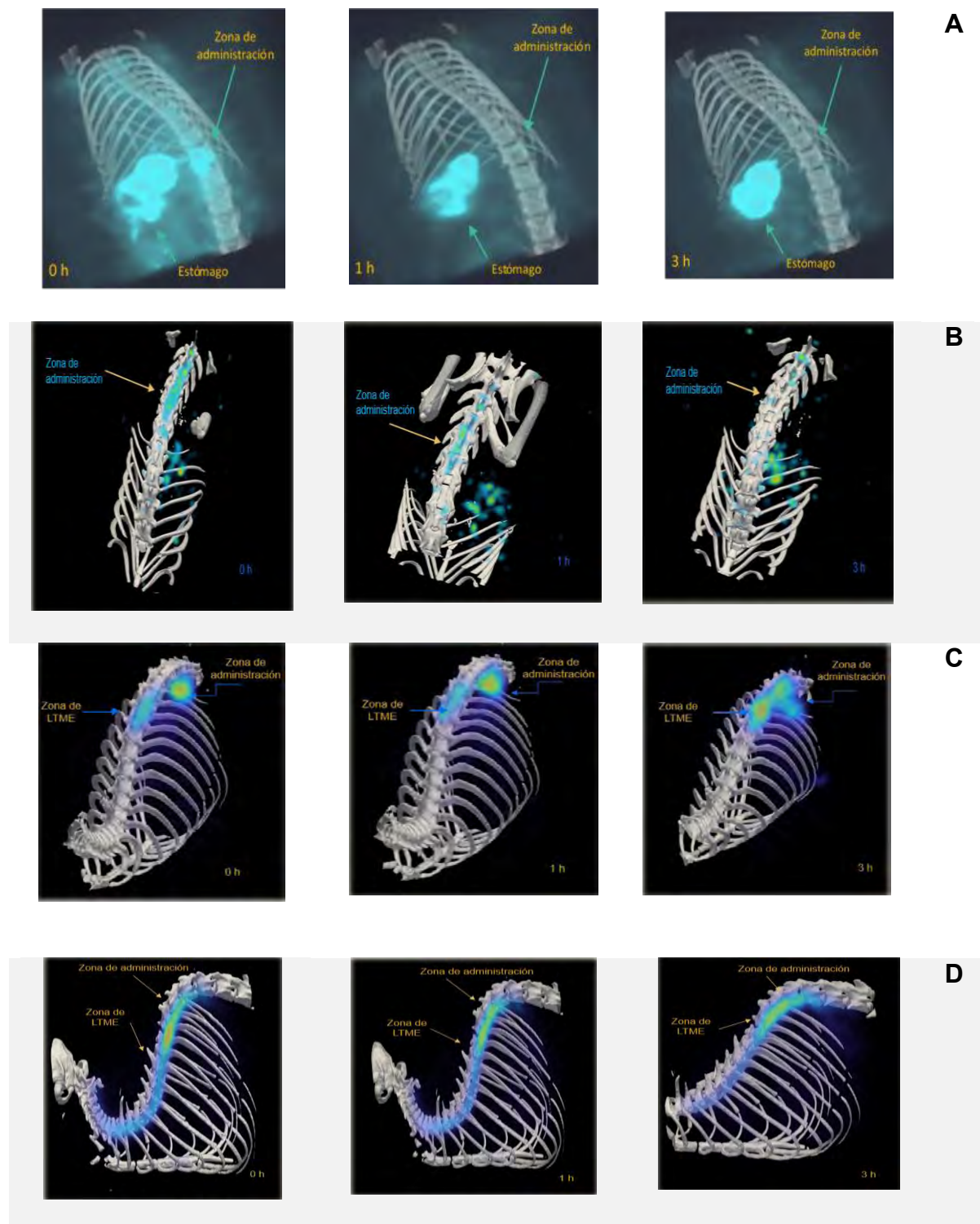


Figura 21. Evaluación de la Biodistribución de Pertecnetato sódico de  $^{99m}\text{Tc}$  libre en rata sin LTME (A) y captación de la proteína GFAP en rata no lesionada (B) y rata lesionada (C y D) a 0, 1 y 3 h post-administración del RIC.

Las imágenes anteriores muestran la distribución del  $^{99m}\text{Tc}$  libre y del complejo GFAP/MDP/ $^{99m}\text{Tc}$  en modelos murinos de la cepa Long-Evans con LTME y sin LTME a diferentes tiempos post-administración. La elección del modelo a utilizar en este caso Ratas Long-Evans con Laminectomía a nivel de Torácica 9 (T9) nos permite asemejar lo más posible a una situación clínica de lesiones traumáticas en seres humanos haciendo de este la elección más idónea para la evaluación de la sobreexpresión de la proteína GFAP.

Tras la administración "*in situ*" del radioisótopo de  $^{99m}\text{Tc}$  libre (269  $\mu\text{Ci}$ ) en un modelo murino sin LTME (625 g) previamente canulada a nivel de torácica 12 tomada como grupo control, se evaluó la Biodistribución total de  $^{99m}\text{Tc}$  libre a fin de determinar el tiempo requerido para su total distribución en el organismo, además de tomar los tiempos idóneos para la evaluación de la captación de la proteína GFAP post-administración "*in situ*" del RIC tomando en consideración las características del radionúclido seleccionado como la de poseer una excelente energía gamma de 140 keV y una vida media corta (6 h) para nuestro propósito, haciendo del Tc nuestro radionúclido deseable y adecuado para los estudios de diagnóstico y Biodistribución por Imagen molecular.

En la Figura 21 A podemos observar la Biodistribución secuencial del  $^{99m}\text{Tc}$  libre a través de diferentes tiempos (0, 1 y 3 h) post-administración, en la cual se observa que a las 3 h, la captación se concentra en la zona abdominal, dicho resultado concuerda con lo reportado en la literatura que nos indica que el tecnecio libre tiene afinidad primordialmente en órganos como estómago, vejiga e intestinos.<sup>34</sup>

En la figura 21 B se observa la distribución del complejo GFAP-MDP- $^{99m}\text{Tc}$  en un modelo murino sin LTME a lo largo de la Médula Espinal, al tiempo 0 h (basal) el RIC queda concentrado en la zona de administración, sin embargo se observa la difusión del mismo a través del tiempo, mostrando a las 3 h post-administración nula captación preferencial por alguna zona medular debido a que ante la ausencia de un traumatismo en la medula espinal, en esta no hay sobreexpresión de astrocitos reactivos; aunque en dicha secuencia si se evidencia la difusión a sistema sanguíneo con acumulación del RIC en hígado e intestinos lo cual es debido a la

presencia de coloides en nuestro radioinmunoconjugado que tienen afinidad a dichos órganos.

En la Figura 21 (C-D) se observa la administración "*in situ*" del RIC (0.2-0.5 mCi) en modelos murinos con LTME (n=4) con pesos oscilantes entre los 200-300 g en la cual se observa al término de 3 h post- administración gran captación de la proteína GFAP en astrocitos reactivos en contraste con los modelos murinos sin LTME debido a la presencia del traumatismo en zona medular.

El uso de radiofármacos en la medicina nuclear diagnóstica nos brinda información relevante acerca de procesos moleculares, metabólicos y fisiológicos del organismo o modelo empleado. Ante los resultados mostrados anteriormente podemos decir que la evaluación de la proteína GFAP por Imagen Molecular bajo la modalidad microPET/SPECT/CT sirve como una herramienta alternativa ante las ya conocidas para su diagnóstico e identificación y que serviría como base para posteriores evaluaciones de otras moléculas de interés médico y biológico.

## X. CONCLUSIONES

- Los estudios de captación del Radioinmunoconjugado indican que hay mayor captación en la zona de lesión, por lo tanto, el radiomarcado puede ser una herramienta de diagnóstico.
- Se caracterizó el método de radiomarcado de AcMo GFAP, estableciendo condiciones de desgasificado durante todo el proceso de radiomarcado, un volumen de agente reductor de 1  $\mu$ L y de ligando intercambiador de 40  $\mu$ L.
- El método de radiomarcado mostro una Eficiencia Radioquímica del 88.2 %, una Pureza del 87.4 %y una Estabilidad Radioquímica del 88.7 %, los cuales salen de los especificado en la FEUM, pero son considerables aceptables para la obtención de imágenes moleculares.
- La dimerización obtenida en la prueba de integridad no interfiere con la especificidad de sus receptores evaluados con la técnica de Western Blot.
- Las Inmunohisquímicas (IHC) muestran una tendencia en cpm con respecto a los días de lesión traumática correspondientes a la presencia de astrocitos reactivos durante la etapa aguda a crónica. .
- La Biodistribución del  $^{99m}\text{Tc}$  libre indica que a las 3 horas hay captación en la zona abdominal, lo cual concuerda con la literatura que indica que hay un mayor acúmulo de la radiactividad en hígado (formación de coloide), tiroides, estómago, intestino y vejiga ( $^{99m}\text{Tc}$  libre).



## **XI. PERSPECTIVAS**

- Evaluar la captación del AcMo OX-42 en modelo murino de Lesión Traumática en Médula Espinal en fase aguda (1 día).
- Optimizar los resultados de Control de Calidad adicionando sustancias que mejoren la pureza y estabilidad de complejos radiomarcados.
- Implementar técnica de tratamiento de uso selectivo y dirigido para evaluar mecanismos farmacológicos haciendo uso de anticuerpos monoclonales.
- Implementar el uso de diversos isotopos radiactivos emisores de positrones a fin de obtener una variedad de herramientas por Imagenología Molecular implementando la modalidad PET.

## XII. REFERENCIAS

1. OMS | Lesiones medulares [Internet]. Who.int. 2018 [cited 25 February 2018]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs384/es/>
2. Una visión general de la ingeniería de tejidos enfoques para el manejo de lesiones de la médula espinal [Internet]. Viaclinica.com. 2017 [cited 28 August 2017]. Available from: [http://viaclinica.com/article.php?pmc\\_id=1876804](http://viaclinica.com/article.php?pmc_id=1876804)
3. Spinal Cord Injury Information Page | National Institute of Neurological Disorders and Stroke [Internet]. Ninds.nih.gov. 2018 [cited 28 August 2017]. Available from: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Spinal-Cord-Injury-Information-Page>
4. Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de la médula espinal, Araceli Díaz Ruiz, Gabriel Guízar Sahagún, Camilo Ríos Castañeda, Rev. Méd. IMSS 2002; 40 (5): 437-455, Recibido: 10 de diciembre de 2001 Aceptado: 23 de mayo de 2002. Medigraphic Artemisa en línea [Internet]. 2017 [cited 23 August 2017]; Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2002/im025l.pdf>
5. LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL Datos y Cifras a la Vista [Internet]. Birmingham, Alabama: Centro de Estadísticas Nacionales de Lesiones de Médula Espinal; 2013 [cited 24 February 2018]. Available from: <http://www.uab.edu/nscisc>
6. Lesión de la médula espinal: Esperanza en la investigación: National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) [Internet]. Espanol.ninds.nih.gov. 2018 [cited 25 February 2018]. Available from: [https://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/lesion\\_de\\_la\\_medula\\_espinal.htm](https://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/lesion_de_la_medula_espinal.htm)
7. Harkey H, White E, Tibbs R, Haines D. A clinician's view of spinal cord injury. The Anatomical Record. 2003; 271B (1):41-48.
8. Ruiz, A. (2010). *Lesión medular*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
9. Rodríguez, M. (2004). *Lesión medular: atención socio-sanitaria* / María Isabel Rodríguez Fernández [coordinadora] Datos de publicación. Alcalá la Real, Jaen: Formación Alcalá, depósito legal 2004 Descr. Física 252 páginas: ilustraciones

10. Ballesteros Plaza V, Marré Pacheco B, Martínez Aguilar C, Fleiderman Valenzuela J, Zamorano Pérez J. Lesión de la médula espinal: actualización bibliográfica: fisiopatología y tratamiento inicial [Internet]. <http://www.scielo.br/pdf/coluna/v11n1/14.pdf>. 2012 [cited 25 February 2018]. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-18512012000100014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-18512012000100014)
11. 50 Aspectos epidemiológicos de la lesión medular de la población del Centro Nacional de Rehabilitación Dr. Ramiro Pérez,\* Dra. Susana Martín del Campo,\*\* Dr. Saúl Renán,\*\*\* Dr. Sergio Durán Ortiz\*\*\*\* ARTICULO Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación 2008; 20: 74-82
12. Histología y biología celular, Teresa I Fortoul van der Goes., 3a. ed. Distrito Federal, 2017. McGraw-Hill Interamericana [cited: 23 May 2018]
13. Ramadan W, Abdel-Hamid G, Al-Karim S, Abbas A. Histological, immunohistochemical and ultrastructural study of secondary compressed spinal cord injury in a rat model. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2017; 55(1):11-20.
14. Pérez Capote K. Respuesta de las células gliales al daño neuronal in vitro. [Doctorado]. Universidad de Barcelona; 2006.
15. Tipos celulares. El astrocito. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Mmegias.webs.uvigo.es. 2015 [cited 25 February 2018]. Available from: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/astrocito.php>
16. Liddel S, Barres B. SnapShot: Astrocytes in Health and Disease. *Cell*. 2015; 162(5):1170-1170.e1.
17. BALDWIN S, BRODERICK R, BLADES D, SCHEFF S. Alterations in Temporal/Spatial Distribution of GFAP- and Vimentin-Positive Astrocytes After Spinal Cord Contusion With the New York University Spinal Cord Injury Device. *Journal of Neurotrauma*. 1998; 15(12):1015-1026.
18. Sánchez S. Caracterización Inmunotoxicológica en un modelo murino de Neurotoxicidad Encefálica Inducida por Clorpirifós. [LICENCIATURA]. Universidad del Tolima; 2012.

19. Gutiérrez Carrasquero L. Cascadas de Señalización Activadas por Nucleótidos en astrocitos de cerebelo de rata: Receptores P2x Y Psy implicados en memoria [Doctorado]. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria Departamento de Bioquímica y Biología Molecular; 2017.
20. Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000)\*. *Neurochemical Research* [Internet]. 2017 [cited 28 August 2017]; (Vol. 25, Nos. 9/10, 2000): pp. 1439–1451. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1007677003387>
21. Eng L. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*. 1985; 8:203-214.
22. Hajós F. Changes in Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Immunoreactivity Reflect Neuronal States. *Neurochemical Research*. 2008; 33(8):1643-1650.
23. Nielsen A, Jorgensen A. Self-assembly of the Cytoskeletal Glial Fibrillary Acidic Protein Is Inhibited by an Isoform-specific C Terminus. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(40):41537-41545.
24. Herpers M, Ramaekers F, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathologica* [Internet]. 1986 [cited 19 February 2018]; 70(3-4):333-339. Available from: <https://sci-hub.tw/10.1074/jbc.m406601200>
25. Revisión sobre filamentos intermedios, con especial referencia a las citoqueratinas. Review of intermediate filaments, with special reference to cytokeratins. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* [Internet]. 2017 [cited 28 August 2017]; 1-11. Available from: <http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>
26. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11 va ed. Vol. II. México: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 2009.
27. IAEA. Technetium-99m Radiopharmaceuticals. International Atomic Energy Agency; 2010

28. Ferro Flores, G. *Radiofármacos: nanopartículas como sistemas multifuncionales para la obtención in vivo de imágenes moleculares*. (2010).
29. Coursey B, Nath R. Radionuclide Therapy. *Physics Today* [Internet]. 2000 [cited 19 February 2018]; 53(4):25-30. Available from: <https://doi.org/10.1063/1.883033>
30. Cherry S, Sorenson J, Phelps M. *Physics in nuclear medicine*. Philadelphia, Pa.: Saunders; 2012.
31. Genoma España. Anticuerpos monoclonales terapéuticos [Internet]. Madrid, España: Cintia Refojo (Genoma España); 2007 p. 9-28. Available from: [https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2007-anticuerpos\\_monoclonales\\_terapeuticos-pub\\_77\\_d.pdf](https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2007-anticuerpos_monoclonales_terapeuticos-pub_77_d.pdf)
32. <https://datasheets.scbt.com/sc-58766.pdf> [Internet]. Datasheets.scbt.com. 2016 [cited 8 August 2016]. Available from: <https://datasheets.scbt.com/sc-58766.pdf>
33. Roitt, I., Brostoff, J and Male, D., *Inmunología*. 5 ed.2000: Harcourt.
34. RADIOFÁRMACOS TERAPÉUTICOS [Internet]. E. Silvia Verdera – Silvia Gómez de Castiglia; 2018 [cited 24 February 2018]. Available from: [http://www.alasbimn.net/comites/rf/material/radiofarmacos\\_terapeuticos.pdf](http://www.alasbimn.net/comites/rf/material/radiofarmacos_terapeuticos.pdf)
35. *Las radiaciones: Reto y Realidades*, Richards Campbell, Jorge, segunda Edición, La ciencia para todos, México, 1997, 177p.
36. <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/radioisotopos.pdf>
37. Tecnecio <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/nuclear/technetium.html>
- 38.. Abram U, Alberto R. Technetium and rhenium: coordination chemistry and nuclear medical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [Internet]. 2006 [cited 12 September 2016]; 17(8):1486-1500. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jlcr.3531/full>
39. Rodríguez M. Física Médica. In: Rodríguez M, ed. by. *Fronteras de la Física en el Siglo XXI* [Internet]. México, D.F.: Octavio Miramontes y Karen Volke; 2017 [cited 28 August 2017]. Available from: <http://scifunam.fisica.unam.mx/mir/copit/TS0011ES/TS0011ES.html>
40. Técnicas isotópicas [Internet]. Biomodel.uah.es. 2017 [cited 1 August 2017]. Available from: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/isotopos/inicio.htm>

41. International commission on radiological protection: summary of the current ICRP. Principles for Protection of the Patient in Nuclear Medicine. Pergamon Press 1993.
42. Morales A, Crespo F, Gandolff G, Escobar N, Pérez N, Hernández J. Technetium-99m direct radiolabeling of monoclonal antibody ior egf/r3. Nuclear Medicine and Biology. 1998; 25(1):25-30.
43. Calderón Sánchez O, Zayas Crespo F, Leyva Montaña R, Beckford Vera D, Gómez J. Marcaje directo e indirecto con 99mTc de un anticuerpo monoclonal antireceptor del factor de crecimiento epidérmico. Revista Española de Medicina Nuclear. 2005; 24 (1):38-44.
44. Radiolabeling of Antibodies for Therapy and Diagnosis. Janina Baranowska-Kortylewicz, Glenn V. Dalrymple, Syed M. Quadri, and Katherine A. Harrison. Chapter 30
45. OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS. Péptidos marcados con tecnecio-99m para formar imágenes de inflamación. España; 2 135 585, 2017.
46. Fritzberg A, Abrams P, Beaumier P, Kasina S, Morgan A, Rao T et al. Specific and stable labeling of antibodies with technetium-99m with a diamide dithiolate chelating agent. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1988; 85(11):4025-4029.
47. 99mTc-Labeled Antihuman Epidermal Growth Factor Receptor Antibody in Patients with Tumors of Epithelial Origin: Part III. Clinical Trials Safety and Diagnostic Efficacy Mayra Ramos-Suzarte, Nelson Rodriguez, Juan P. Oliva, Normando Iznaga-Escobar, Alejandro Perera, Alejo Morales, Niurka Gonzalez, Maria Cordero, Leonel Torres, Gilmara Pimentel, Mercedes Borrón, Joaquín Gonzalez, Olga Torres, Teresita Rodriguez and Rolando Pérez *Center of Molecular Immunology, Center for Medical-Surgical Research, National Institute of Oncology and Radiobiology and Center of Clinical Researches, Havana, Cuba.*
48. Karube Y, Katsuno K, Ito S, Matsunaga K, Takata J, Kuroki M et al. Tumor scintigraphy by the method for subtracting the initial image with technetium-99m labeled antibody. Annals of Nuclear Medicine. 1999;13(6):407-413

49. Control de calidad de radiofármacos e. silva verdea- Silvia Gómez de comité de radio farmacia
50. Pureza de Radiofármacos para Medicina Nuclear. Verificada por Cromatografía en Capa Fina. Dr. Mark Moskovitz y Gary Witman, MD (Internet)(05/Septiembre/2016 18:25pm)  
<http://www.dynamicadsorbents.com/spanishweb/thinlayerchromatography2.htm>
51. Saba u. imaging in neurodegenerative disorders. [S.l.: s.n.]; 2015.
52. Welch, M. J. & Eckelman, W. C. *Targeted molecular imaging*. 39–40 (2012).
53. F. Zayas Crespo, R. Leyva Montaña<sup>c</sup>, D. Beckford Vera, JA. Gómez, Enero 2005. Medicina, Buenos Aires. JAMA. 1964; 190(6):209.

## ÍNDICE DE FIGURAS

PÁG.

<b>Figura 1.</b> Médula Espinal protegida por la columna vertebral. [Disponible en: <a href="http://medulaespinal.org/lesion/">http://medulaespinal.org/lesion/</a> ] [Modificada].....	5
<b>Figura 2.</b> Dislocación espinal visualizada por Tomografía Computarizada (CT). [Disponible en: Saba u. Imaging in neurodegenerative disorders. [S.l.: s.n.]; 2015.] [Modificada].....	7
<b>Figura 3.</b> Nivel anatómico de la Médula Espinal. [Disponible en: <a href="https://www.nscisc.uab.edu/PublicDocuments/fact_figures_docs/Facts%202013%20Spanish.pdf">https://www.nscisc.uab.edu/PublicDocuments/fact_figures_docs/Facts%202013%20Spanish.pdf</a> ] [Modificada].....	8
<b>Figura 4.</b> Estructura interna de la Médula Espinal. A: Sustancia Blanca B: Sustancia gris. [Disponible en: <a href="https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1995&amp;sectionid=150300743">https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1995&amp;sectionid=150300743</a> ] [Modificada].....	9
<b>Figura 5.</b> Tipos de células gliales. Disponible en: [ <a href="https://es.123rf.com/photo_34221006_las-neuronas-y-las-c%C3%A9lulas-neurogliales-las-c%C3%A9lulas-gliales-son-c%C3%A9lulas-no-neuronales-en-el-cerebro-hay-di.html">https://es.123rf.com/photo_34221006_las-neuronas-y-las-c%C3%A9lulas-neurogliales-las-c%C3%A9lulas-gliales-son-c%C3%A9lulas-no-neuronales-en-el-cerebro-hay-di.html</a> ] [Modificada].....	9
<b>Figura 6.</b> Morfología de un astrocito. [Disponible en: <a href="http://www.abcam.com/gfap-antibody-2a5-ab4648.html#description_images_2">http://www.abcam.com/gfap-antibody-2a5-ab4648.html#description_images_2</a> ].....	10
<b>Figura 7.</b> Fenotipo reactivo de un astrocito. [Disponible en: <a href="https://www.semanticscholar.org/paper/The-dual-role-of-astrocyte-activation-and-reactive-Pekny-Wilhelmsson/5d5ac76b54b4f9d7150f6841991248e65cf59f09">https://www.semanticscholar.org/paper/The-dual-role-of-astrocyte-activation-and-reactive-Pekny-Wilhelmsson/5d5ac76b54b4f9d7150f6841991248e65cf59f09</a> ] [Modificada]....	12
<b>Figura 8:</b> Proceso de la cicatriz glial o Astrogliosis. [Modificada].....	12
<b>Figura 9.</b> Astrocitos en las áreas corticales del cerebro de una rata con anticuerpos anti-GFAP. [Disponible en: <a href="http://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/astrocito.php">http://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/astrocito.php</a> ] [Modificada].....	13
<b>Figura 10.</b> Radiomarcado del Anticuerpo Monoclonal GFAP con el radionúclido <sup>99m</sup> Tc por método directo (Schwarz).....	18
<b>Figura 11.</b> Ecuación del factor de decaimiento.....	19
<b>Figura 12.</b> Implementación de filtros Amicon para el proceso de radiomarcado del AcMo GFAP.....	26
<b>Figura 13.</b> Cromatografía Instantánea en Capa Fina – Sílica Gel (iTLC-SG) usada para el Control de Calidad.....	28



<b>Figura 14.</b> Mecanismo de la técnica de Western Blot. [Disponible en: <a href="https://www.elabscience.com/western_blotintroduction_and_principles_of_western_blot-306.html">https://www.elabscience.com/western_blotintroduction_and_principles_of_western_blot-306.html</a> ] [Modificada].....	33
<b>Figura 15.</b> Laminectomía a nivel de torácica 9 (T9) en rata Long-Evans.....	34
<b>Figura 16.</b> Secuencia de reactivos para el proceso de desparafinado de cortes histológicos .....	36
<b>Figura 17.</b> Imagen del modelo murino Long-Evans lesionada y canulada para la obtención de imágenes por $\mu$ SPECT-CT para la evaluación de la captación del radioinmuconjugado caracterizado .....	38
<b>Figura 18.</b> Estabilidad Radioquímica del radioinmunoconjugado GFAP-MDP- $^{99m}\text{Tc}$ evaluado a 24 h en dos fases móviles.....	41
<b>Figura 19.</b> Determinación de la integridad del RIC GFAP/ $^{99m}\text{Tc}$ a través del proceso de radiomarcado mediante Electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% .....	42
<b>Figura 20.</b> Determinación “in vitro” de la afinidad del radioinmuconjugado por los receptores GFAP en cortes histoquímicos a diferentes tiempos post-laminectomía.....	44
<b>Figura 21.</b> Evaluación de la Biodistribución de Pertecnetato sódico de $^{99m}\text{Tc}$ libre en rata sin LTME y captación de la proteína GFAP en rata lesionada y no lesionada a 0, 1 y 3 h post-administración.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Fórmulas para la determinación de Pureza Radioquímica.....	20
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de cargado de muestras en PAGE-SDS al 10%.....	31
<b>Tabla 3.</b> Puntos críticos del método de radiomarcado.....	39
<b>Tabla 4.</b> Resultados del Control de Calidad del RIC (GFAP/MDP/ <sup>99m</sup> Tc).....	40