



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS (FÍSICA MÉDICA)
UNIDAD DE RADIOFARMACIA CICLOTRÓN, FACULTAD DE MEDICINA

TRASTUZUMAB RADIOMARCADO CON ^{64}Cu PARA LA EVALUACIÓN Y
SEGUIMIENTO DE TUMORES HER2 POSITIVOS MEDIANTE IMAGEN
MOLECULAR PET.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS FÍSICAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:
ARMANDO SEBASTIÁN ORDOÑEZ CANUL

TUTOR PRINCIPAL:
DR. MIGUEL ÁNGEL ÁVILA RODRÍGUEZ
UNIDAD DE RADIOFARMACIA-CICLOTRÓN, FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:
DR. HÉCTOR ALVA SÁNCHEZ
INSTITUTO DE FÍSICA
DRA. ANA LEONOR RIVERA LÓPEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Posgrado en Ciencias Físicas (Física Médica) de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAE) proyecto PAPIIT IT202518, por el apoyo para la obtención de los materiales necesarios.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAE) proyecto PAPIIT IT200221, por la beca otorgada para terminar la escritura de la tesis.

A la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón de la División de Investigación, Facultad de Medicina de la UNAM, por facilitar sus instalaciones para la producción del radiofármaco.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), que proporcionó el modelo animal para realizar los estudios preclínicos.

Al Laboratorio de Investigación Preclínica microPET de la Facultad de Medicina de la UNAM, por la realización de los estudios microPET.

Al Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (LANIDER-ININ), por el desarrollo de la molécula precursora.

Agradecimientos

Al Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez por su enseñanza y el tiempo dedicado para la elaboración de este proyecto.

A los miembros del comité tutor, el Dr. Héctor Álva Sánchez y la Dra. Ana Leonor Rivera López por sus comentarios y aportaciones para la realización de este proyecto.

Al M. en C. Adolfo Zárate Morales y al Fís. Armando Flores Moreno por la irradiación de los blancos en el ciclotrón.

A la Dra. Martha Pedraza López del INCMNSZ quien inoculó las células para el crecimiento de los tumores.

A la Médico Veterinario Dafne Fabiola Garduño Torres y al Dr. Arturo Avendaño Estrada por su apoyo en la realización de los estudios preclínicos con el equipo microPET.

A los sinodales la Dra. Isabel Gamboa, la Dra. Mercedes Rodríguez, el M. en C. Stevan Herrera y la M. en C. Sarahí Rosas por la revisión de la tesis y sus comentarios que enriquecieron el contenido de esta.

Al M. en C. Benito Góngora Servín por su tiempo y enseñanzas en el módulo de separación radioquímica.

A mis profesoras y profesores de la maestría que aportaron mucho en mi aprendizaje y formación incluso durante la pandemia de COVID-19.

A mis compañeros de maestría por el apoyo mutuo y motivación durante los cursos, la residencia hospitalaria y la elaboración de este escrito.

A mi familia, mi madre Maribel Canul Almaraz, mi padre Armando Ordoñez Meneses y pareja Iris Serrano por siempre apoyarme al iniciar con un nuevo proyecto y en alcanzar mis metas.

Índice

Glosario.....	7
Capítulo 1. Introducción	11
1.1. Cáncer de mama	11
1.1.1. Estructura de la mama, evolución y estadio del cáncer de mama.....	11
1.1.2. Cáncer de mama HER2+.....	14
1.2. Anticuerpos monoclonales.....	15
1.2.1. Trastuzumab.....	17
1.2.2. Resistencia al trastuzumab	18
1.2.3. Tratamiento con trastuzumab.....	19
1.3. Radionúclidos	20
1.3.1. Decaimiento radiactivo	20
1.3.2. ^{64}Cu	22
1.4. Radiofármacos	23
1.5. Agentes quelantes bifuncionales.....	24
1.6. Tomografía por Emisión de Positrones (PET).....	25
1.6.1. Principio físico de funcionamiento.....	25
1.6.2. Aplicaciones clínicas de la imagen molecular PET	29
1.7. Objetivos.....	30
1.7.1. Objetivo general	30
1.7.2. Objetivos específicos.....	30
1.8. Antecedentes.....	30
1.8.1. Trastuzumab.....	30
1.8.2. Radiofármacos con ^{64}Cu	32
Capítulo 2. Producción y control de calidad.....	34
2.1. Producción del radionúclido	34
2.1.1. Selección del material blanco.....	34
2.1.2. Preparación e Irradiación del blanco para la producción de radionúclidos	39
2.1.3. Separación radioquímica y obtención del radionúclido.....	42
2.1.4. Molécula precursora y síntesis radioquímica	45

2.2. Control de calidad	46
2.2.1. Inspección visual	46
2.2.2. Determinación del pH.....	46
2.2.3. Pureza Radionuclídica	47
2.2.4. Pureza radioquímica.....	47
2.2.5. Pureza química	47
2.2.6. Esterilidad	47
2.2.7. Endotoxinas bacterianas	48
Capítulo 3. Farmacocinética y biodistribución de radiofármacos en estudios PET ..	49
3.1. Transporte al objetivo molecular	50
3.2. Biodistribución preclínica	55
3.2.1. Obtención de la biodistribución	56
3.2.2. Disección.....	56
3.2.3. Imágenes preclínicas microPET	58
3.2.4. Escalamiento de la biodistribución en un modelo animal a un humano. ..	59
3.3. Biodistribución clínica	61
3.3.1. Obtención de la biodistribución mediante imagen molecular PET	62
3.3.2. Determinación de la cantidad de estudios y los intervalos temporales entre cada uno	62
3.3.3. Imágenes PET obtenidas	63
3.4. Metabolización y excreción.	64
Capítulo 4. Dosimetría interna.	65
4.1. Magnitudes en dosimetría interna	65
4.1.1. Dosis absorbida.....	65
4.1.2. Dosis equivalente.....	66
4.1.2. Dosis efectiva.....	67
4.2. Cálculo de la dosis absorbida.....	68
4.2.1. Actividad acumulada.....	70
4.2.2. Determinación de la concentración de actividad	71
4.2.3. Fracción absorbida.....	72
4.2.4. Dosis absorbida.....	73
Capítulo 5. Materiales y métodos.....	74
5.1 Electrodeposición	74

5.2 Recuperación y reciclado de ^{64}Ni	75
5.3 Bombardeo	76
5.4 Separación radioquímica.....	77
5.4.1 Módulo de separación radioquímica.....	77
5.4.2 Espectrometría gamma del radiofármaco	80
5.5 Radiomarcado	81
5.5.1 Incubación.....	82
5.5.2 Purificación vía cromatografía por exclusión de tamaño.....	83
5.6 Estudios preclínicos	84
5.6.1 Cuantificación	86
5.6.2 Dosimetría interna.....	87
Capítulo 6. Resultados.....	89
6.1 Electrodeposición	89
6.2 Recuperación y reciclado de ^{64}Ni	90
6.3 Bombardeo.....	91
6.4 Separación radioquímica.....	91
6.4.1 Espectrometría gamma del radiofármaco	93
6.5 Radiomarcado	94
6.5.1 Purificación vía cromatografía por exclusión de tamaño.....	94
6.6 Estudios preclínicos	96
6.6.1 Biodistribución.....	96
6.6.2 Cuantificación	100
6.6.3 Dosimetría interna.....	105
Conclusiones.....	113
Bibliografía.....	116

Glosario

AAPM: American Association of Physicists in Medicine (Asociación americana de físicos en medicina).

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AJCC: American Joint Committee on Cancer (Comité colectivo americano sobre el cáncer).

Akt: Protein Kinase B (Proteína kinasa B).

ALARA: As Low As Reasonably Achievable (Tan bajo como sea razonablemente posible).

BFCA: Bifunctional Chelating Agent (Agente quelante bifuncional).

CDIS: Carcinoma Ductal In Situ.

CDI: Carcinoma Ductal Invasivo.

CE: Captura Electrónica.

CISH: Chromogenic In Situ Hybridization (Hibridación in situ cromogénica).

CLI: Carcinoma Lobular Invasivo.

CLIS: Carcinoma Lobular In Situ.

CT: Computed Tomography (Tomografía computarizada).

DE: Desviación Estándar.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del factor de crecimiento epidérmico).

FcRn: Neonatal Fc Receptor (Receptor neonatal de Fc).

FDA: Food and Drug Administration (Administración de medicamentos y alimentos).

FDG: Fluorodeoxyglucose (Fluorodesoxiglucosa).

FISH: Fluorescence in situ hybridization (Hibridación fluorescente in situ).

FOV: Field Of View (Campo de vision).

HD: Hiperplasia Ductal.

HDA: Hiperplasia Ductal Atípica.

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2).

HLA: Hiperplasia Lobular Atípica.

HPLC: High Performance Liquid Cromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia).

IAEA: International Atomic Energy Agency (Organismo internacional de energía atómica).

ICRP: International Commission on Radiation Protection (Comisión internacional de protección radiológica).

ICRU: International Commission on Radiation Units (Comisión internacional en unidades de radiación).

Ig: Inmunoglobulina.

IGF1R: Insulin-like Growth Factor I Receptor (Receptor del factor de crecimiento de tipo Insulina I).

IHC: Immunohistochemistry (Inmunohistoquímica).

ISH: In Situ Hybridization (Hibridación in situ).

LANIDER: Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos.

LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction (Fracción de eyección ventricular izquierda).

mAb: Monoclonal Antibody (Anticuerpo monoclonal).

MAPK: Ras-mitogen-activated protein kinases (Proteínas quinasas activadas por mitógeno Ras).

MOSFET: Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor (Transistor de efecto de campo metal-óxido semiconductor).

MRI: Magnetic Resonance Imaging (Imagen por resonancia magnética).

mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin (Objetivo mamífero de rapamicina).

OLINDA/EXM: Organ Level INternal Dose Assessment / Exponential Modeling (Evaluación de dosis interna a nivel de órganos / modelado exponencial).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OS: Overall Survival (Sobrevivencia promedio).

OSEM2D: Ordered Subset Expectation Maximization 2D (Maximización de expectativas de subconjuntos ordenados 2D).

PBS: Phosphate Buffered Saline (Búfer fosfato salino).

PET: Positron Emission Tomography (Tomografía por emisión de positrones).

PFS: Progression Free Survival (Sobrevivencia libre de progresión).

p.i.: post Inyección.

PI3K: Phosphatidylinositol 3`-kinase (Quinasa 3 fosfatidilinositol).

PTFE: Politetrafluoroetileno.

PRQ: Pureza Radioquímica.

ROI: Region Of Interest (Región de interés).

ROS: Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno).

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography (Tomografía computarizada por emisión de fotón único).

TKR: Tyrosine Kinase Receptor (Receptor de la tirosina quinasa).

TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografía en capa fina).

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor (Factor de crecimiento vascular endotelial).

VOI: Volume Of Interest (Volumen de interés).

ppm: partes por millón.

Capítulo 1. Introducción

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la mujer, se presenta generalmente entre los 35 y 80 años, siendo de mayor riesgo entre los 45 y 65 años. En México es la principal neoplasia que presentan las mujeres mayores de 20 años con el 30.9% del total de tumores malignos diagnosticados, teniendo una tasa de mortalidad de 15 en cada 100,000 habitantes.[1]

La incidencia en el país (casos nuevos por cada 100,000 habitantes) para el 2013 fue de 26.2 casos nuevos presentando un incremento respecto al 2007 con 22.09. El grupo de edad con mayor incidencia en 2013 fue el de 60 a 64 años con una tasa de incidencia de 67. En cuanto a la tasa de mortalidad por grupo de edad se presenta una tendencia de aumento conforme aumenta la edad, siendo el grupo de 80 años y más el de mayor vulnerabilidad con 64 fallecimientos por cada 100,000 habitantes, esto debido al incremento en la presencia de enfermedades crónico-degenerativas que dificultan la respuesta a terapia.

1.1.1. Estructura de la mama, evolución y estadio del cáncer de mama

La mama está conformada principalmente por tejido adiposo, teniendo entre 12 y 20 lóbulos conformados por lobulillos en los cuales es producida la leche materna durante la lactancia, la cual fluye por ductos lobulares hasta el pezón, siendo estas dos estructuras las principales en las cuales se desarrollan las células cancerosas [2]. La mama igualmente presenta una serie de ductos y ganglios linfáticos los cuales son una de las principales vías en las cuales el cáncer de mama hace metástasis.

La evolución del cáncer depende del origen del tumor. Teniendo su origen en los ductos comienza por una hiperplasia ductal (HD) progresando a una hiperplasia ductal atípica (HDA), carcinoma ductal in situ (CDIS) y finalmente un carcinoma ductal invasivo (CDI). Cuando el origen son los lóbulos mamarios empieza como una hiperplasia lobular atípica (HLA), pasando por un carcinoma lobular in situ (CLIS) y finalmente un carcinoma lobular invasivo (CLI).[3]

En cuanto al estadio clínico la tabla 1.1 resume las principales definiciones de la clasificación TNM designada por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) la cual toma en cuenta el tamaño del tumor, estados del ganglio linfático, niveles de los receptores de progesterona y estrógeno en el tejido tumoral, presencia del HER2, grado del tumor, estadio de la menopausia y estado general de salud de la paciente.[4]

Tabla 1.1. Definiciones clínicas y patológicas de la clasificación TNM por la AJCC.[4]

Definición del tumor primario (T) clínica y patológicamente	
T0	Sin evidencia de tumor primario
T1	Tumor de diámetro $\leq 20\text{ mm}$
T2	Tumor $> 20\text{mm}$ y $\leq 50\text{ mm}$
T3	Tumor $> 50\text{mm}$
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión a la pared torácica y/o piel.
Definición clínica de los ganglios linfáticos regionales (cN)	
cN0	Sin metástasis a ganglios linfáticos
cN1	Metástasis a los ganglios linfáticos axilares móviles del nivel I, II.
cN2	Metástasis en ganglios linfáticos axilares de nivel I, II que están clínicamente fijados o mezclados.
cN3	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares (nivel III) con o sin metástasis en nivel I y II; o metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares con o sin ganglios axilares o mamaros internos involucrados.
Definiciones patológicas de ganglios linfáticos regionales (pN)	
pN0	Sin metástasis a ganglios linfáticos regionales
pN1	Micro metástasis; o metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares.
pN2	Metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares; o ganglios linfáticos mamaros internos positivos
pN3	Metástasis en más de 10 ganglios linfáticos axilares
Definición por metástasis distante (M)	
M0	Sin evidencia clínica o radiográfica de metástasis distante.
cM1	Metástasis distante detectada por medios clínicos y radiográficos.
pM1	Cualquier prueba histológica de metástasis distante.

1.1.2. Cáncer de mama HER2+

Una de cada cinco pacientes con cáncer de mama presenta una sobre expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano tipo 2 (HER2+), el cual ayuda a controlar el metabolismo de la glándula mamaria [5]. Esta sobre expresión causa la replicación y división de las células mamarias de una manera descontrolada lo cual vuelve a los tumores HER2+ más agresivos y metastásicos.

El cáncer de mama envuelve diferentes etapas previas y orígenes del tumor primario por lo tanto se requerirán diferentes métodos de tratamiento en función del origen y su histología. Una de las características más importantes que se distingue entre los tipos de cáncer de mama es la sobre expresión del HER2. La sobreexpresión del receptor viene mediada por el gen HER/neu el cual pertenece a la familia de genes que codifican factores de crecimiento transmembrana, como los receptores EGFR, HER3 y HER4. Para obtener una sobreexpresión de HER2 el oncogén HER2/neu, localizado en el cromosoma 17, debe presentar una amplificación que provoca la expresión de hasta 100 veces el valor normal del receptor en las células tumorales [6], [7].

Una de las características principales del HER2 viene de ser transmembrana, donde la parte extracelular del receptor tiene la facilidad de formar homodímeros y heterodímeros con los demás receptores de la familia HER, con lo cual facilitan la iniciación y transducción de señales hacia el núcleo celular. El HER2 puede dimerizarse con los demás receptores sin necesidad de un ligando y no se tiene identificado alguno para este receptor.

La parte intracelular del receptor tiene actividad de la tirosina quinasa, regulando así factores fisiológicos, de crecimiento y de diferenciación celular, cumpliendo un papel importante en la aceleración de la tumorigenesis.

La expresión de HER2 ocurre en la etapa in situ del desarrollo tumoral y está asociado con tumores de alto grado pobremente diferenciados, ocasionando una alta proliferación celular, invasión a ganglios linfáticos y una resistencia a ciertos fármacos de quimioterapia. Molecularmente la sobreexpresión genética del HER2 viene acompañado de cambios extensos en los patrones de expresión genética de

las células cancerosas provocando una variabilidad en la expresión heterogénea de HER2 en el tumor primario o metástasis. Esto último podría indicar que un tumor sea HER2+ mientras que su metástasis no (o viceversa), o que el tumor sea heterogéneo a HER2, lo que provoca una resistencia a los fármacos dirigidos al receptor y una peor prognosis [8], [9], [10].

Para indicar que un tumor es HER2+ se tienen diferentes técnicas para su evaluación, entre las principales se encuentran las siguientes [11]:

- Análisis inmunohistoquímico (IHC): Su principal indicador es la proteína HER2 en las células cancerosas y si se encuentra en grandes cantidades sobre la membrana celular. Los resultados de la técnica pueden ser 0 (negativo), 1+ (negativo), 2+ (ambiguo y requiere más pruebas) y 3+ (positivo a la sobreexpresión de HER2).
- Análisis por hibridación fluorescente in situ (FISH): Va enfocado al análisis de las copias del gen HER2/neu en las células cancerosas mediante un fragmento de ADN marcado fluorescentemente que hibrida con el oncogén. Los resultados son positivos o negativos a la amplificación del gen.
- Análisis de Her2 mediante hibridación cromogénica in situ (CISH): Al igual que el anterior mide las copias del gen HER2/neu dando un resultado positivo o negativo, la diferencia con la técnica FISH es la emisión de luz visible y no por fluorescencia.

1.2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son glucoproteínas especializadas que forman parte del sistema inmune con la capacidad de reconocer células específicas (antígenos) y ligarse a ciertos receptores celulares. Son monoclonales ya que su selección va enfocada a un solo clon activado de células B produciendo un anticuerpo para un solo antígeno. Estos tienen un potencial uso clínico como herramientas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inmunológicas y neoplásicas [12].

Su estructura tiene una forma de Y (figura 1.1), en la cual las puntas presentan las uniones a los antígenos. Están conformados por cadenas ligeras y pesadas. Cada cadena ligera tiene una porción constante (CL) y una variable (VL) que nos da la especificidad a antígenos. Las cadenas pesadas igualmente contienen entre 3 y 4 porciones constantes (CH) que nos indican si es IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y dependiendo de cada clase o subclase serán sus propiedades, y una porción variable (VH). Las porciones variables de las cadenas ligeras y pesadas sirven de uniones a los antígenos y al ser variables nos dan una posibilidad muy amplia de reconocimiento antígeno. Entre las porciones constantes 1 y 2 de la cadena pesada se encuentra una bisagra que le proporciona flexibilidad y acoplamiento espacial adaptable al mAb. También, los mAb's se dividen en dos fracciones, de reconocimiento antigénico Fab y cristalizable Fc que media funciones como citotoxicidad y el tipo de unión con los receptores de membrana, esto en conjunto con el extremo carboxiterminal (COOH).[13]

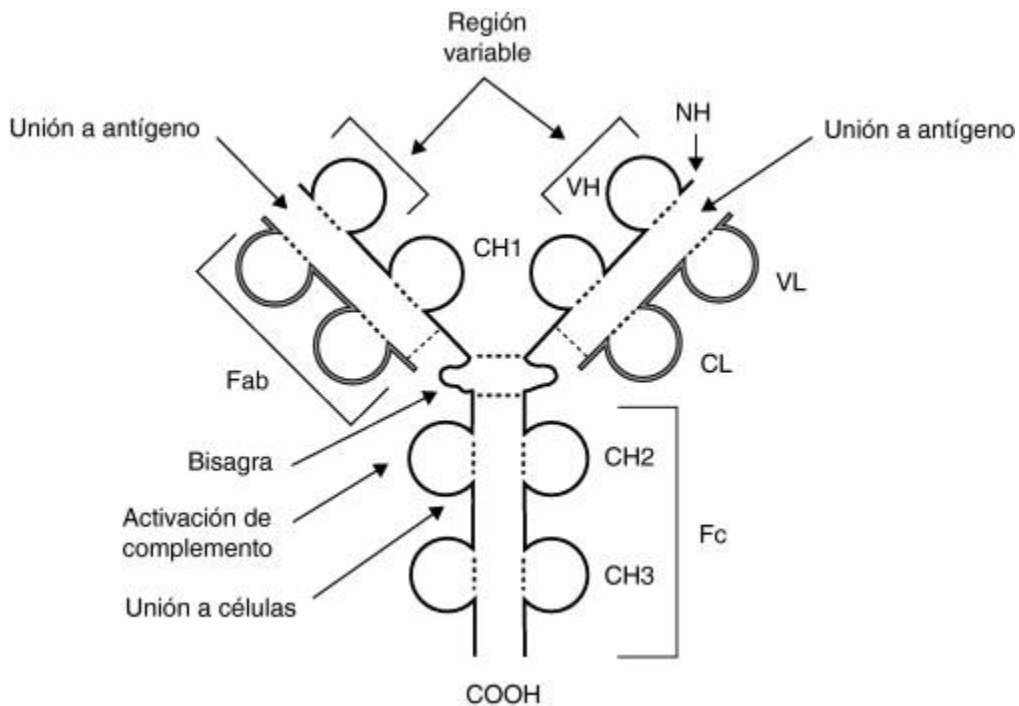


Figura 1.1. Estructura de un anticuerpo monoclonal. Las cadenas pesadas aparecen en negro y las ligeras en gris.[13]

Entre las aplicaciones de los mAb se encuentran las siguientes:

- Detectar y cuantificar expresión genómica.
- Localizar la expresión de genes a nivel celular y de tejidos.
- Identificación de marcadores fenotípicos unidos a un tipo de célula particular.
- Diagnóstico de enfermedades infecciosas y sistémicas al detectar antígenos y anticuerpos específicos como en la artritis reumatoide.
- Diagnóstico y tratamiento de tumores que presenten una sobreexpresión de ciertas moléculas en la superficie celular o intracelular al adherirse a ellas y estimular o inhibir funciones celulares.
- Desarrollo de vacunas.
- Tratamiento en la intoxicación por fármacos

1.2.1. Trastuzumab

El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 que se une de manera selectiva y eficiente al dominio IV del receptor de HER2. Sus mecanismos de acción son variados, entre ellos se encuentran la citotoxicidad mediada por anticuerpos ya que activa linfocitos B que reconocen al anticuerpo y atacan a las células cancerosas, inhibe el anclaje del dominio extracelular del HER2, revoca la señalización oncogénica, disminuye la angiogénesis, los caminos de reparación del ADN y no permite la homodimerización y heterodimerización con los demás miembros de la familia HER [14].

Este anticuerpo monoclonal ha demostrado su eficacia como tratamiento ya sea independiente o en conjunto con quimioterapia, terapia endocrina u otros anticuerpos monoclonales anti HER2 [15].

El tratamiento con trastuzumab presenta varios efectos adversos, siendo el más severo la cardiotoxicidad. La cardiotoxicidad provocada por trastuzumab es reversible ya que no ocasiona un daño estructural al miocardio. Los aspectos moleculares del daño no se conocen en su totalidad sin embargo se tiene una idea de a qué se deba. Una de las causas puede ser que las células del miocardio expresan HER2 y al unirse la proteína Neurogulina-1 (NRG-1) desencadena una cascada de eventos que promueven la estabilidad de sarcómeros y relaja el estrés

oxidativo lo cual previene la apoptosis. Al administrar trastuzumab la cascada de señalización es interrumpida al bloquearse los receptores en la célula, se suprime la autofagia en los cardiomiocitos, se inhibe la capacidad de reciclar sustratos tóxicos de la célula provocando una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) finalmente ocasionando daño a los cardiomiocitos. Esto lleva a cambios en la estructura terciaria del aparato contráctil cardiaco sin muerte celular y sin cambios de la ultraestructura, por lo tanto, si se interrumpe la terapia se observa una mejora en la condición cardiaca del paciente desinhibiendo la señalización del NRG-1 [7], [16].

Esta cardiotoxicidad se vuelve irreversible si se presenta cuando la terapia se administra en conjunto con quimioterapia de antraciclinas, la cual involucra un daño directo a los cardiomiocitos. El daño ocasionado lleva a una disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) y finalmente a fallo cardiaco congestivo hasta en un 27% de los casos [17]. Por lo cual no se recomienda la administración de trastuzumab con antraciclinas concomitantemente o si después de la terapia de antraciclinas se tienen valores de LVEF entre 50-54%. Otros factores de riesgo incluyen la edad (> 50 años) e hipertensión [18].

Otros efectos adversos del trastuzumab son la fatiga, diarrea, náusea, vómito, tos, nasofaringitis, entre otros.

1.2.2. Resistencia al trastuzumab

El cáncer de mama HER2+ puede presentar resistencia al trastuzumab por diversos factores. Esta resistencia puede ser intrínseca, si no se obtiene una respuesta positiva a terapia, o una respuesta adquirida si la enfermedad progresa después de una respuesta clínica beneficiosa inicial. Entre los diversos factores que involucran la resistencia se resumen los siguientes [19]:

- Expresión de otros miembros de la familia HER: La expresión de EGFR y HER3 en el cáncer de mama HER2+ se ha asociado con una resistencia al trastuzumab ya que pueden producir dimerizaciones alternativas al bloquearse los HER2. Las células tumorales de la mama pueden producir los ligandos del HER3 (heregulina/neuregulina β 1) y su secreción autocrina o

paracrina promueve la formación de heterodímeros HER2/HER3 donde el HER2 este parcialmente bloqueado.

- Expresión del receptor del factor de crecimiento del tipo insulina I (IGF1R): Este receptor también desencadena una serie de señalizaciones similar a la familia HER promoviendo el desarrollo tumoral, siendo reclutado en complejos de señalización con los HER2 y HER3 para activar la vía PI3K, lo cual se asocia con una resistencia al trastuzumab.
- Met y EphA2 TKR's: Met TKR en conjunto con su ligando, el factor de crecimiento hepatocito, tienen una sobreexpresión en algunos tumores HER2+ asociándose con una resistencia al trastuzumab mediante una activación sostenida de la vía Akt. El tratamiento con trastuzumab parece promover la fosforilación de la EphA2 tras activar la Src kinasa, la cual incrementa la señalización por las vías Pi3K/Akt/MAPK llevando a una resistencia al trastuzumab.
- Expresión del receptor de estrógeno (ER): La presencia de ER y HER2 en tumores se ha visto asociada a una disminución de la respuesta patológica completa en pacientes recibiendo quimioterapia y medicamentos anti-HER2. Las observaciones apuntan a que la presencia del ER sirve como vía de escape al bloqueo del HER2 para mantener el crecimiento tumoral por dicha vía de señalización. El ER regula la expresión de diferentes genes como el IGF1R, VEGFR y HER.
- Expresión del fragmento p95HER2: Este es un subtipo de HER2 el cual carece del dominio extracelular, lo que imposibilita el acoplamiento del trastuzumab y por ende la inhibición de las señalizaciones intracelulares.

1.2.3. Tratamiento con trastuzumab

La administración del trastuzumab se realiza comúnmente con una dosis inicial de 4 mg/kg y 2 mg/kg de manera semanal después de la primera dosis. La vida media de eliminación es de alrededor de 30 días, incrementándose al aumentar la dosis [20].

El trastuzumab busca ser el tratamiento de primera línea para el cáncer de mama HER2+ [5].

1.3. Radionúclidos

Existen una diversidad de elementos en la naturaleza y creados artificialmente caracterizados por su número atómico Z . Entre cada elemento existen isótopos con un mismo Z , pero diferente número másico A , algunos de ellos se les conoce como radioisótopos o radionúclidos ya que tienen un núcleo inestable o se encuentran en un estado excitado.

1.3.1. Decaimiento radiactivo

Los núcleos se vuelven inestables por la presencia en exceso ya sea de protones o de neutrones, lo que lleva al núcleo a pasar por un decaimiento radiactivo. El decaimiento radiactivo es un proceso en el cual un núcleo inestable se transforma en otro tras liberar energía y emitir ya sean partículas, fotones o ambos. El núcleo al que decae puede ser inestable, repitiéndose el proceso de decaimiento radiactivo hasta llegar a uno estable. Es un proceso nuclear, sin embargo, los electrones orbitales se pueden ver involucrados ya que las partículas emitidas en el decaimiento pueden interaccionar con ellos. El núcleo resultante del decaimiento radiactivo podría encontrarse en un estado estable o inestable, repitiendo el proceso hasta decaer a un núcleo estable. Este es un proceso instantáneo y no es afectado por cualquier tipo de evento que ocurra fuera del núcleo o por condiciones a las que sea sometido (presión, temperatura, campo electromagnético, campo gravitacional, etc.). También, el decaimiento radiactivo es un proceso cuántico y aleatorio, por lo que solamente podemos aproximar la cantidad de decaimientos que ocurrirán en un periodo de tiempo, mas no saber cuándo exactamente se llevará a cabo el proceso en un solo núcleo. Cada radionúclido tiene un conjunto de características que lo diferencian de los demás, como los tipos de decaimiento, el tiempo promedio entre decaimientos y la energía de transición [21].

Los diferentes tipos de decaimiento se resumen en la tabla 1.2. Donde A_ZX es el núcleo padre y ${}^A_{Z+1}Y$ en núcleo hijo al cual decae.

Tabla 1.2. Tipos de decaimiento y sus características principales.

Tipo de decaimiento	Radiación emitida	Notación nuclear	Descripción
Decaimiento β^-	$e^- + \nu^-$	${}^A_ZX \xrightarrow{\beta^-} {}^A_{Z+1}Y$	El neutrón de un núcleo es transformado a un protón y un electrón emitiendo un electrón y un antineutrino.
Decaimiento β^+	$e^+ + \nu$	${}^A_ZX \xrightarrow{\beta^+} {}^A_{Z-1}Y$	El protón de un núcleo es transformado en un neutrón y un positrón emitiendo un positrón y un neutrino.
Transición isomérica*	γ	${}^A_m_ZX \xrightarrow{\gamma} {}^A_ZY$	Un núcleo metaestable de vida media relativamente larga decae emitiendo un rayo gamma manteniendo constante A y Z.
Captura electrónica	Rayos X característicos y e^- Auger.	${}^A_ZX \xrightarrow{EC} {}^A_{Z-1}Y$	Un e^- orbital es capturado por el núcleo y se combina con un protón para formar un neutrón.
α	4_2He	${}^A_ZX \xrightarrow{\alpha} {}^{A-4}_{Z-2}Y$	Se da en núcleos pesados al emitir una o varias partículas alfa (núcleo de 4He) monoenergéticas.

* Puede ocurrir que en lugar de emitir una gamma la energía sea transferida a un e^- orbital y ser eyectado, proceso denominado conversión interna.

En medicina nuclear, específicamente imagen molecular, los radionúclidos han sido de gran importancia ya que la emisión de radiación electromagnética permite formar imágenes en conjunto con una serie de detectores especializados para detectar esta radiación. Los métodos de decaimiento que son de interés para la imagen molecular corresponden principalmente al decaimiento β^+ y la transición isomérica.

Los radionúclidos han sido utilizados como biomarcadores en medicina nuclear desde hace varios años al unirse con un fármaco o biomolécula específica. El mejor ejemplo es el uso de fluorodesoxiglucosa (FDG), que viene radiomarcada con ^{18}F que es un emisor de positrones. Con el FDG se obtienen imágenes PET con lo que se cuantifican los estados metabólicos tisulares para poder diagnosticar neoplasias y otras patologías [22].

Los principales radionúclidos utilizados en medicina nuclear y su aplicación se resumen en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Ejemplos de radionúclidos comúnmente utilizados en medicina nuclear y su aplicación [21].

Radionúclido	$T_{1/2}$	Emisión utilizada	Energía (keV)	Aplicación
^{18}F	$T_{1/2} = 109 \text{ min}$	β^+	$\bar{E} = 250$	Imagen molecular PET.
^{11}C	$T_{1/2} = 20.4 \text{ min}$	β^+	$\bar{E} = 385$	Imagen molecular PET.
^{177}Lu	$T_{1/2} = 6.65 \text{ d}$	β^-	$\bar{E} = 130$	Terapia.
^{131}I	$T_{1/2} = 8 \text{ d}$	γ	$E = 364$	Terapia y diagnóstico.
^{99m}Tc	$T_{1/2} = 6 \text{ h}$	γ	$E = 140$	Imagen molecular SPECT.

1.3.2. ^{64}Cu

El ^{64}Cu es un radioisótopo del Cu el cual tiene varias vías de decaimiento: 17.6% como β^+ ($\bar{E} = 278 \text{ keV}$), 39% como β^- ($\bar{E} = 190 \text{ keV}$) y 43.6% por captura electrónica, con una vida media de 12.7 h [23].

Para la producción del radionúclido se tienen dos posibles vías, mediante la reacción nuclear $^{64}\text{Ni}(\text{p},\text{n})^{64}\text{Cu}$ y mediante la producción simultánea de ^{67}Ga y ^{64}Cu

mediante las reacciones nucleares $^{68}\text{Zn}(p,n)^{67}\text{Ga}$ y $^{68}\text{Zn}(p,\alpha)^{64}\text{Cu}$ con un rango de energías de los positrones entre 14-25 MeV, siendo la primera vía la de mejor eficiencia y la segunda más económica [24].

La bien establecida coordinación química del ^{64}Cu permite su unión a una variedad de agentes quelantes que pueden ser ligados a otras biomoléculas, anticuerpos, proteínas y nanopartículas. Su vida media relativamente larga permite obtener imágenes utilizando moléculas tanto pequeñas y grandes junto con proteínas de lenta metabolización. Para usos prácticos esto permite el envío del radiofármaco para realizar estudios PET a lugares remotos del sitio de producción sin perder una cantidad considerable de actividad por decaimiento [25]. Otro uso práctico que permite su vida media es el realizar estudios PET varias horas después de la administración y estudiar la farmacocinética de los radiofármacos que se producen con este radionúclido.

1.4. Radiofármacos

Los radiofármacos se generan con la unión de un radionúclido y una biomolécula, proceso denominado radiomarcado. Estos interactúan con el organismo y tienen como objetivo estudiar procesos metabólicos u ocasionar efectos terapéuticos. Deben cumplir ciertas características que se mencionarán en la sección 2.2 para poder administrarse en pacientes de manera segura.

La biomolécula determina la ruta metabólica en el organismo y por lo tanto su biodistribución, mientras que el radionúclido permite su detección externa.

Los radiofármacos con radionúclidos emisores de e^- y partículas α son utilizados para terapia mientras que los emisores de e^+ y rayos γ sirven para imagen molecular.

El radiomarcado se realiza de distintas maneras y debe permanecer unido mientras circula en sangre hasta llegar al sitio de interés. Para el caso de radionúclidos metálicos se utilizan agentes quelantes bifuncionales que facilitan su unión a la biomolécula.

1.5. Agentes quelantes bifuncionales

Los agentes quelantes bifuncionales (BFCA) funcionan como un puente de unión entre un radionúclido metálico y una biomolécula. Han sido desarrollados para marcar biomoléculas para aplicaciones de diagnóstico y terapia. Es una parte importante del radiofármaco ya que se encuentra unido covalentemente a la biomolécula acarreadora [26].

Usualmente se emplean dos técnicas para el radiomarcado, el premarcado que consiste en la unión del radionúclido al BFCA y luego a la biomolécula. La segunda técnica consiste en un post marcado en la cual primero se une la biomolécula con el BFCA y posteriormente el radionúclido, con lo cual se conserva una mayor actividad del radionúclido.

La elección del BFCA depende de la naturaleza y estado de oxidación del radionúclido metálico y de la farmacocinética de la biomolécula a marcar, ya que de esto dependerá el tiempo de circulación en sangre del radiofármaco. En el caso de anticuerpos su vida media en sangre es alta, por lo que el BFCA debe tener una alta estabilidad termodinámica y una cinética adecuada para soportar la competencia con los iones metálicos y quelatos nativos en la sangre, esto para evitar la disociación *in vivo* del radionúclido. Otros aspectos importantes a considerar en aplicaciones clínicas es la conservación de la afinidad al receptor específico de la biomolécula tras su unión al BFCA, tolerancia hacia la radiólisis y alta hidrofiliidad que facilita la excreción renal [27].

Los BFCA pueden unirse a la molécula marcadora mediante un acoplador que puede modificar las propiedades farmacocinéticas del radiofármaco y su biodistribución si así se desea. El diagrama esquemático de la figura 1.2 muestra un ejemplo de lo anterior.

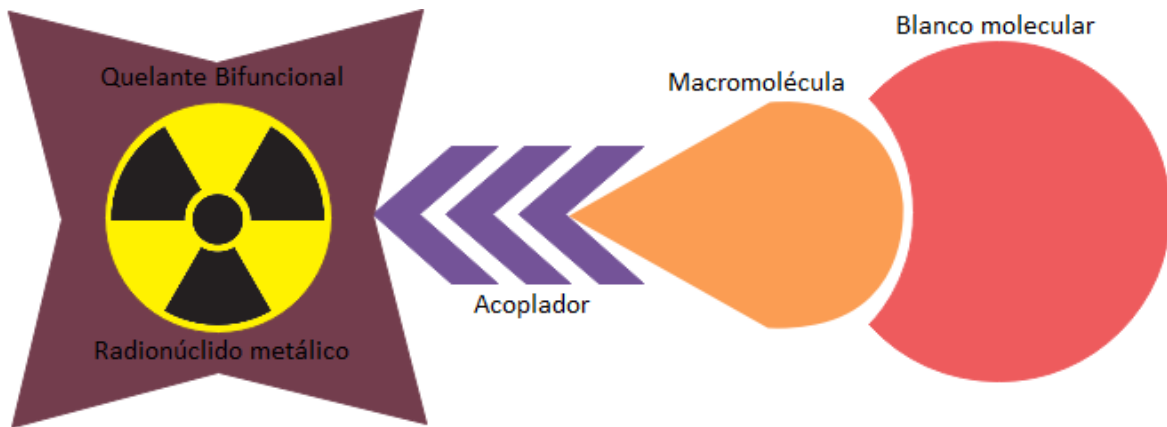


Figura 1.2. Diagrama esquemático general de un radionúclido unido a un BFCA y una macromolécula.

1.6. Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

El PET, como su nombre indica utiliza radionúclidos emisores de positrones. Las biomoléculas o radiofármacos son radiomarcados con el radionúclido y administrados al paciente, normalmente vía intravenosa, para su biodistribución en el cuerpo y su captación en el sitio de interés.

1.6.1. Principio físico de funcionamiento

Los estudios PET están basados en la detección de los fotones de aniquilación, los cuales son producidos cuando el positrón emitido por el radionúclido es aniquilado junto con un electrón. En este proceso la masa en reposo del positrón y el electrón se convierte en dos rayos gama de 511 keV emitidos en direcciones opuestas (180° , cuando el positrón se aniquila en reposo). Estos rayos gamma son detectados por los detectores del escáner PET (figura 1.3) mediante un circuito de detección en coincidencia, teniendo una ventana electrónica temporal y de energía para determinar que dos eventos provienen de una misma aniquilación, por lo que no requieren de colimadores físicos para discriminar fotones dispersos provenientes del paciente. La ventana temporal de coincidencia es típicamente programada para ser de 6 a 12 ns, y se usa una ventana de energía típica de $511 \text{ keV} \pm 15\%$ (figura 1.4). Gracias a ello los escáneres PET tienen una eficiencia de detección mucho mayor respecto al SPECT ya que no hay pérdida de eventos por el uso de colimadores.

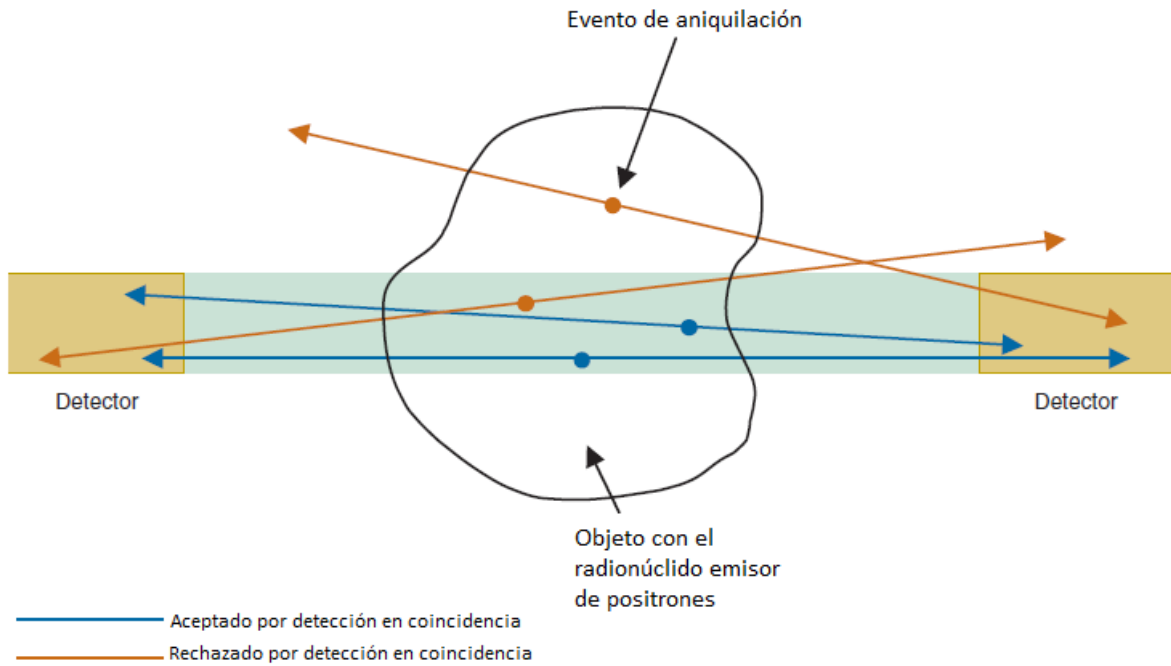


Figura 1.3. Detección en coincidencia de los fotones de aniquilación en los detectores del equipo PET [21].

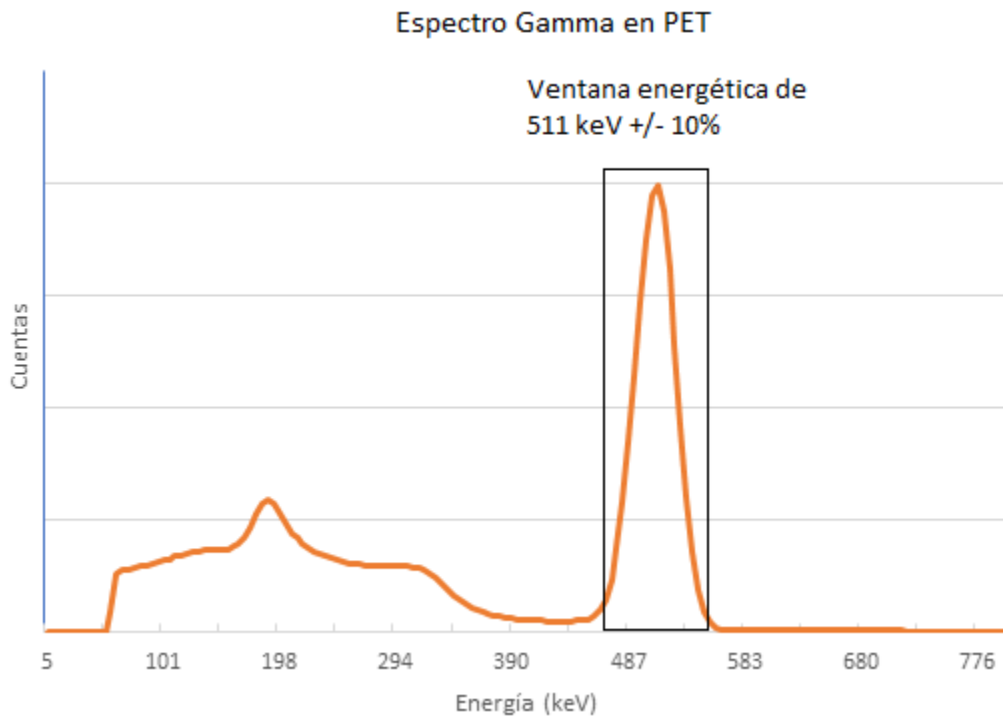


Figura 1.4. Ejemplo de una ventana de energía utilizada en equipos PET.

La ventana temporal y en general la resolución temporal la define la electrónica y las características físicas del detector, lo cual puede influir en diferentes aspectos en el proceso de reconstrucción de la imagen. Por ejemplo, existe la posibilidad de aproximar el origen de la aniquilación mediante el tiempo de vuelo (TOF), que con un cálculo sencillo se puede aproximar la ubicación de la aniquilación y entre mejor resolución temporal tenga el equipo la localización será más precisa. Una desventaja de una ventana temporal amplia es que permite la detección indeseable en coincidencia de eventos aleatorios que no provengan de la misma aniquilación o incluso la detección de múltiples eventos. Debido a esto se utilizan centelladores que emiten una gran cantidad de luz con tiempos de decaimiento cortos y una electrónica rápida para mejorar la resolución temporal del equipo.

Los arreglos de detectores se pueden posicionar de diferentes maneras, como pueden ser dos arreglos en cada lado o un arreglo de detectores en forma de anillo, variando en cada caso la eficiencia de detección. El arreglo de anillo es el más usado debido a su mayor eficiencia de detección y la posibilidad de obtener diferentes ángulos de proyección sin necesidad de mover los detectores (figura 1.5). Para mejorar la eficiencia de detección los detectores en arreglo de anillo trabajan en coincidencia con más de un detector, lo que permite la obtención de varias proyecciones y la formación de imágenes tomográficas en un menor tiempo.

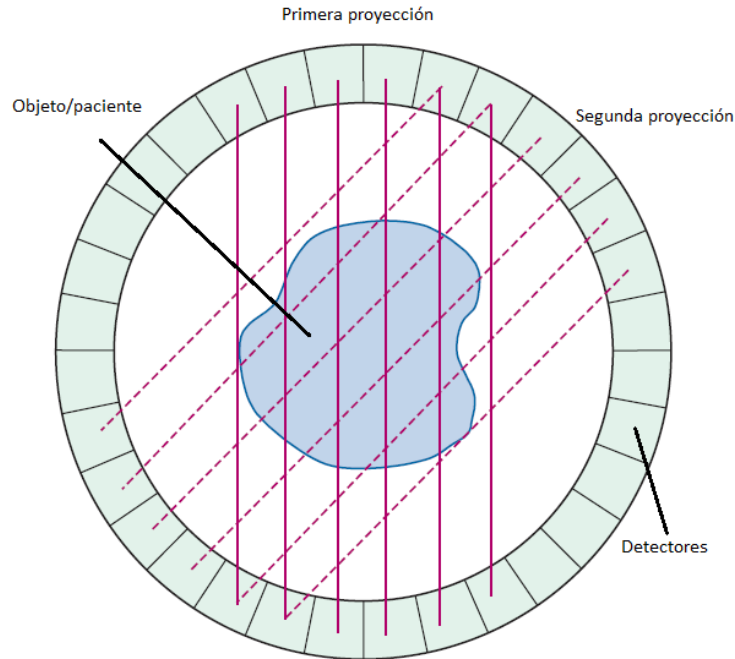


Figura 1.5. Arreglo de detectores en forma de anillo para la detección en coincidencia múltiple por detector obteniendo proyecciones simultáneas en varios ángulos [21].

La resolución espacial de un escáner PET depende de diversos factores entre los que se resumen los siguientes [21]:

- El tamaño del detector: el tamaño del detector y la posición de origen del evento entre un detector y su opuesto producen una función de respuesta distinta, teniendo un triángulo para eventos de origen justo en medio de ambos detectores. La resolución debido al tamaño detector viene dada como la mitad del tamaño del detector.
- Alcance de los positrones: Lo que se busca detectar es el origen de la emisión de los positrones, sin embargo, la aniquilación ocurre en un lugar distinto y alejado del origen del decaimiento nuclear. En un estudio PET se quiere obtener la localización del radiofármaco en el cuerpo del paciente por lo que el alcance efectivo de los positrones afectará la resolución espacial de las imágenes. A mayor energía de emisión o alcance de los positrones peor resolución espacial.

- No colinealidad de los fotones de aniquilación: Los positrones no siempre se aniquilan en reposo, lo que provoca la emisión de fotones de aniquilación no colineales, es decir, en ángulos diferentes a 180° , que para el ^{18}F tiene una distribución gaussiana con un FWHM de aproximadamente 0.3° . La resolución espacial R_{180° por este efecto se deteriora en función del diámetro del gantry de detectores d siguiendo la relación: $R_{180^\circ} = 0.0022d$
- Profundidad de interacción en el centellador: Debido a que los detectores requieren de un cierto espesor para mejorar la eficiencia de detección, los rayos gamma pueden interactuar en diferentes profundidades del centellador. Lo anterior provoca que el grosor aparente del detector aumente ya que el escáner no puede detectar la profundidad de la interacción, provocando una degradación de la resolución por el tamaño del detector.

1.6.2. Aplicaciones clínicas de la imagen molecular PET

La imagen molecular PET tiene una gran importancia en la oncología, neurología y en el estudio de enfermedades cardiovasculares, siendo el ^{18}F el radionúclido más usado en los estudios clínicos.

El FDG provee información fisiológica del metabolismo de la glucosa en los tejidos y ya que muchas condiciones patológicas presentan alteraciones de este metabolismo el FDG se vuelve imprescindible. También es usado en conjunto con el trazador de flujo sanguíneo $^{82}\text{RbCl}$ para diagnosticar y evaluar la viabilidad miocárdica de pacientes con enfermedades de la arteria coronaria [28], [29].

En neurología los estudios PET son usados para diagnosticar varias enfermedades neurodegenerativas como lo pueden ser la enfermedad de Alzheimer y otro tipo de demencia, la enfermedad de Parkinson y la epilepsia [30].

Otros radiomarcadores son utilizados como radioligandos para unirse a ciertos receptores específicos en el cerebro y para localizar moléculas en la superficie celular de algunos tumores como es el caso de este proyecto.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Visualizar y cuantificar la biodistribución del anticuerpo monoclonal trastuzumab radiomarcado con ^{64}Cu en tumores de cáncer de mama HER2+ mediante imagen molecular PET.

1.7.2. Objetivos específicos

Realizar la separación radioquímica del ^{64}Cu de manera automatizada y producir el ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab con un rendimiento de radiomarcado mayor al 90%.

Comprobar en estudios preclínicos con roedores la hipercaptación del trastuzumab radiomarcado con ^{64}Cu en tumores HER2+ mediante estudios microPET.

Introducir una herramienta clínica para el diagnóstico específico de cáncer de mama HER2+ mediante imagen molecular PET como herramienta no invasiva para seleccionar a las mejores candidatas para inmunoterapia con trastuzumab.

1.8. Antecedentes

1.8.1. Trastuzumab

Los resultados de tratamientos con trastuzumab en cáncer de mama HER2+ son bien conocidos y comúnmente es usado en conjunto con quimioterapia donde ha demostrado mejora de diferentes parámetros como la supervivencia libre de progresión (PFS) y supervivencia promedio (OS). Entre los distintos estudios se encuentran los siguientes reportes:

El primer estudio de fase III que evaluó la eficacia y la seguridad del trastuzumab como terapia concomitante con quimioterapia de antraciclinas como doxorubicina y ciclofosfamida fue realizado por Dennis J. Salmon y colaboradores [31]. En el estudio 234 pacientes con cáncer de mama HER2+ recibieron quimioterapia convencional y 235 quimioterapia junto con trastuzumab. Los resultados fueron positivos para las pacientes que recibieron quimioterapia con trastuzumab con un aumento en la PFS (media de 7.4 vs 4.6 meses; $P < 0.008$), una duración mayor de respuesta (media de 9.1 vs 6.1 meses; $P < 0.001$), una reducción de muertes al

primer año de tratamiento (22% vs 33%, $P=0.008$) y una supervivencia más larga (25.1 vs 20.3 meses; $P=0.046$). Entre los efectos adversos se presentó cardiotoxicidad siendo el síntoma más severo la disfunción cardíaca. Se reporta que los síntomas fueron controlados mediante tratamiento médico y en general mejoraron. Sin embargo, como se mencionó en la sección 1.2.1, la quimioterapia con antraciclinas produce daños a los cardiomiocitos permanentemente, lo cual no se había estudiado a profundidad al momento de este estudio.

Otro estudio fase III evaluó el tratamiento con quimioterapia de fármacos libres de antraciclinas con trastuzumab [32]. En él, 196 pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico recibieron aleatoriamente trastuzumab, paclitaxel con o sin carboplatino. La PFS fue de 10.7 vs 7.1 meses para el régimen con carboplatino (TPC) y sin carboplatino (TP) respectivamente, siendo más evidentes los resultados de pacientes con un estudio IHC de 3+ para HER2 (PFS de 13.8 vs 7.6 meses para TPC y TP). Ambos regímenes presentaron neutropenia febril y neurotoxicidad en pocos casos, donde la neutropenia grado 4 fue más frecuente en el régimen TPC.

En uno de los estudios fase III realizado por Helena M. Earl y colaboradores compararon los resultados y toxicidades de la administración de trastuzumab por 12 o 6 meses en pacientes con cáncer de mama HER2+ diagnosticado tempranamente que recibieron quimioterapia de antraciclinas, taxanos o ambas [33]. La duración del tratamiento con trastuzumab fue elegida aleatoriamente entre un total de 4089 pacientes, la mitad con una terapia de 6 meses vs otra mitad con 12 meses. Los resultados obtenidos mostraron que para ambos regímenes la supervivencia libre de enfermedad fue similar (13% vs 12% para 6 y 12 meses) y entre estos la supervivencia libre de enfermedad por 4 años igual fue similar (89.4% vs 89.8% para 6 y 12 meses). Donde se observó una diferencia fue en las pacientes que presentaron efectos adversos severos con 19% para el régimen de 6 meses versus 24% para el de 12 meses. Los porcentajes de las pacientes que tuvieron que detener su tratamiento igual fue menor para el régimen de 6 meses (3%) contra el de 12 meses (8%).

Otro de estos estudios realizados reporta el aumento de la eficacia del trastuzumab como tratamiento adyuvante junto con pertuzumab y docetaxel en comparación con tratamiento con trastuzumab, docetaxel y placebo [34] para pacientes en etapas avanzadas y con metástasis. Se reportó una mediana de 56.5 meses de OS a comparación de 40.8 meses del grupo placebo, con efectos cardiacos adversos que fueron controlados con otros fármacos sin complicaciones mayores. También, la PFS mejoró en 6.3 meses en el grupo recibiendo pertuzumab y se extendió la respuesta de duración media en 7.7 meses. Ambos grupos presentaron eventos adversos por la administración de docetaxel.

Actualmente la técnica por excelencia para el diagnóstico de cáncer de mama HER2+ y seleccionar a las candidatas a terapia con trastuzumab es mediante una biopsia y realizando un estudio histoquímico del tejido tumoral. Por lo tanto, surge la necesidad de nuevas técnicas no invasivas para su diagnóstico y evaluación.

1.8.2. Radiofármacos con ^{64}Cu

Existen diversos estudios que comprueban la utilidad del ^{64}Cu como radiomarcador junto con anticuerpos monoclonales. Entre ellos se encuentran los siguientes:

Cai et al. [35] utilizaron el anticuerpo monoclonal cetuximab marcado con ^{64}Cu y el agente quelante DOTA para visualizar células cancerosas que sobre expresan el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en su superficie celular. La absorción del radiofármaco se midió mediante estudios PET y se observó su especificidad al EGFR en roedores portadores de tumores que sobre expresan este receptor y una baja acumulación de actividad en tumores EGFR negativos. El radiofármaco fue principalmente metabolizado por el hígado teniendo una absorción de $19.7 \pm 2.7 \% \frac{\text{ID}}{\text{g}}$, $14.0 \pm 1.4 \% \frac{\text{ID}}{\text{g}}$ y $12.5 \pm 2.5 \% \frac{\text{ID}}{\text{g}}$ a 1 h, 16 h y 48 h post inyección, respectivamente. Los riñones no presentaron una absorción o captación observada. Los tumores EGFR+ por su parte presentaron una mayor actividad 24 h post inyección y la vida media en sangre del radiofármaco fue de 18 h.

Otro estudio elaborado por Paudyval et al. [36] mediante el marcado de bevacizumab con ^{64}Cu y DOTA como agente quelante bifuncional observó la

captación en injertos de cáncer de colon VEGF positivo en roedores. Midieron una acumulación en tumor del radiofármaco a 24, 48 y 72 h post inyección de $22.7 \pm 1.0 \% \frac{ID}{g}$, $24 \pm 0.2 \% \frac{ID}{g}$ y $19.0 \pm 2.5 \% \frac{ID}{g}$ respectivamente y una acumulación de $9.7 \pm 1.2 \% \frac{ID}{g}$ a las 48 h p.i. bloqueando los receptores con 1 mg de bevacizumab sin radiomarcarse un día antes de la administración del radiofármaco, lo que corrobora la especificidad del radiofármaco para evaluar de manera no invasiva la expresión del VEGF. El metabolismo del radiofármaco en hígado fue considerable, presentando una absorción de $17.2 \pm 1.7 \% \frac{ID}{g}$, $13.0 \pm 4.2 \% \frac{ID}{g}$ y $10.6 \pm 1.5 \% \frac{ID}{g}$ a 24 h, 48 h y 72 h p.i. respectivamente.

El anticuerpo monoclonal trastuzumab ha sido previamente conjugado con SCN-Bn-NOTA y radiomarcado con ^{64}Cu [37] poniendo a prueba la estabilidad y la inmunoreactividad en estudios mediante imágenes PET de roedores con un modelo de cáncer de mama HER2+. Los resultados mostraron alta estabilidad y una buena inmunoreactividad del radiofármaco. El ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab tuvo una absorción máxima en tumor a 48 h p.i. con una dosis absorbida por actividad inyectada en el corazón, el hígado y el bazo de 48 ± 13 , 79 ± 4 y $47 \pm 10 \mu\text{Gy}/\text{MBq}$ respectivamente. El grupo concluye que el ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab podría ser utilizado para seleccionar a los pacientes en el momento correcto para administrar una terapia enfocada a HER2, evaluar la respuesta a la terapia y detectar el esparcimiento metastásico.

En la actualidad existen diversos anticuerpos monoclonales desarrollados y en vías de desarrollo que aún no han sido radio marcados con ^{64}Cu para observar su utilidad en el diagnóstico y tratamiento de diferentes neoplasias. Las propiedades del ^{64}Cu junto con las del trastuzumab tienen un potencial uso clínico para el diagnóstico de cáncer de mama HER2+ de manera no invasiva, teniendo la capacidad de captarse de manera específica en el tumor para la posterior obtención de la imagen PET y el seguimiento de la terapia.

Capítulo 2. Producción y control de calidad

El proceso de producción y el control de calidad consta de varias etapas que tienen algunas variaciones dependiendo del estado físico del material blanco y de la forma química requerida del radionúclido para el marcado del radiofármaco. A pesar de ello, para radionúclidos producidos mediante reacciones nucleares en un ciclotrón, el proceso general consta principalmente de las siguientes etapas:

- Selección del material blanco.
- Irradiación del blanco para la producción del radionúclido.
- Separación y obtención del radionúclido.
- Preparación de la molécula precursora.
- Síntesis Radioquímica o radiomarcado.
- Purificación o separación de moléculas marcadas y radionúclido libre.

En el control de calidad se tienen en general las siguientes pruebas:

- Inspección visual.
- Medición del pH.
- Pureza radionuclídica (identidad).
- Pureza radioquímica.
- Pureza química.
- Esterilidad.
- Endotoxinas bacterianas.

Dependiendo del radionúclido a producir, su estado físico y el radiofármaco a sintetizar, el proceso tiene duración variable que puede ir desde minutos a horas.

2.1. Producción del radionúclido

2.1.1. Selección del material blanco

De esta etapa dependerán las etapas posteriores ya que la forma física del material blanco hará que el cuerpo del blanco en el ciclotrón y la forma química del radionúclido producido varíen.

Existen principalmente 3 formas físicas para los materiales blanco: gaseosos, líquidos y sólidos. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas a la hora de su preparación, irradiación y la separación del material blanco y el radionúclido producido. La forma física también dependerá del núclido blanco, su facilidad de obtención, pureza y costo. Los principales radionúclidos utilizados en medicina nuclear para estudios PET con sus respectivas reacciones nucleares son: $^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$, $^{16}\text{O}(p, \alpha)^{13}\text{N}$, $^{15}\text{N}(p, n)^{15}\text{O}$ y $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$.

En el caso del oxígeno las formas físicas más comunes de los materiales blanco para producir los radionúclidos son líquida y gaseosa ya que el oxígeno se puede tener en su forma molecular como O_2 o como agua (H_2O) ambas formas utilizando un blanco isotópicamente enriquecido con el isótopo de interés.

La selección de la forma física del blanco dependerá del producto deseado. Por ejemplo, en la producción de ^{18}F si el blanco es $^{18}\text{O}[\text{H}_2\text{O}]$ el producto será flúor iónico $^{18}\text{F}^-$ que es útil para reacciones de radiomarcado por sustitución nucleofílica como el caso del *FDG*. Sin embargo, al ser agua enriquecida su costo aumentará. Igualmente, el cuerpo del blanco, su geometría y su enfriamiento variarán, un ejemplo de cuerpo del blanco para líquidos se muestra en la figura 2.1 en la que se observa que en la cavidad donde entra el agua enriquecida también entra He el cual sirve para presurizar el agua en la cavidad y por detrás de dicha cavidad circula agua de enfriamiento.

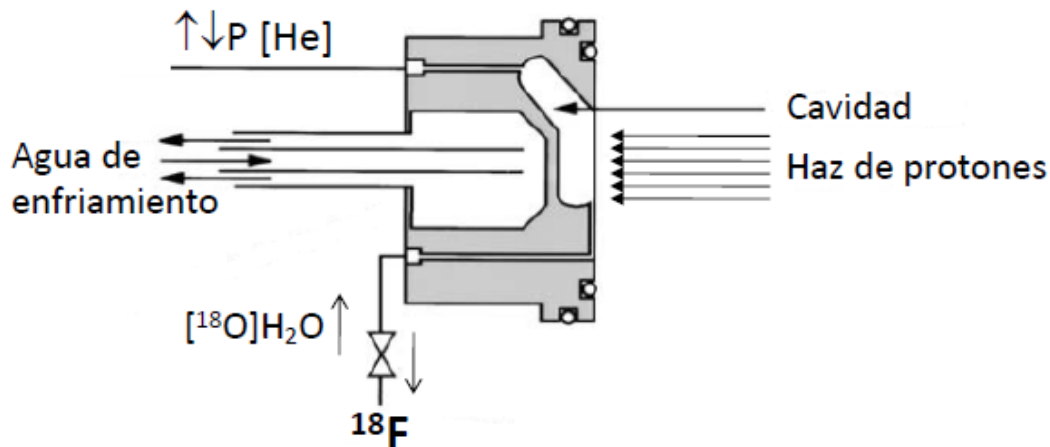


Figura 2.1. Geometría típica de un blanco líquido.

El nitrógeno normalmente se usa en su forma gaseosa molecular N_2 para la producción tanto de ^{11}C como de ^{15}O , mediante las reacciones nucleares $^{14}N(p, \alpha)^{11}C$ y $^{15}N(p, n)^{15}O$, respectivamente. En el caso del ^{11}C se le añade un pequeño porcentaje de O_2 natural para que el radionúclido producido se obtenga en la forma química de $[^{11}C]CO_2$ el cual se puede utilizar directamente o convertirlo a yoduro de metilo ($[^{11}C]CH_3I$) para la síntesis de radiofármacos por carboxilación o metilación, respectivamente. Para la producción del ^{11}C se utiliza nitrógeno natural dada la alta abundancia de ^{14}N (99.636%), por lo que los costos de producción del ^{11}C se reducen al no requerir enriquecimiento isotópico.

Al igual que el cuerpo del blanco en el caso de líquidos, los blancos gaseosos tienen su propia estructura del cuerpo blanco, la cual se muestra en la figura 2.2. Una característica a resaltar es que la presurización en este tipo de blancos se logra con la misma presión del gas como material blanco contenido en la cavidad de irradiación. Finalmente la diferencia más importante es el tamaño de la cavidad ya que los gases, al ser menos densos y tener un poder de frenado al haz de protones mucho menor que los líquidos, requieren una profundidad mayor para poder frenar el haz de partículas incidentes e igualmente se tiene que considerar la dispersión y

divergencia del haz al interactuar con los átomos del gas para evitar que el haz de protones interactúe con la superficie de la cavidad y el agua de refrigeración ya que ésta podría quedar activada mediante la reacción nuclear $^{16}\text{O}(p, \alpha)^{13}\text{N}$.

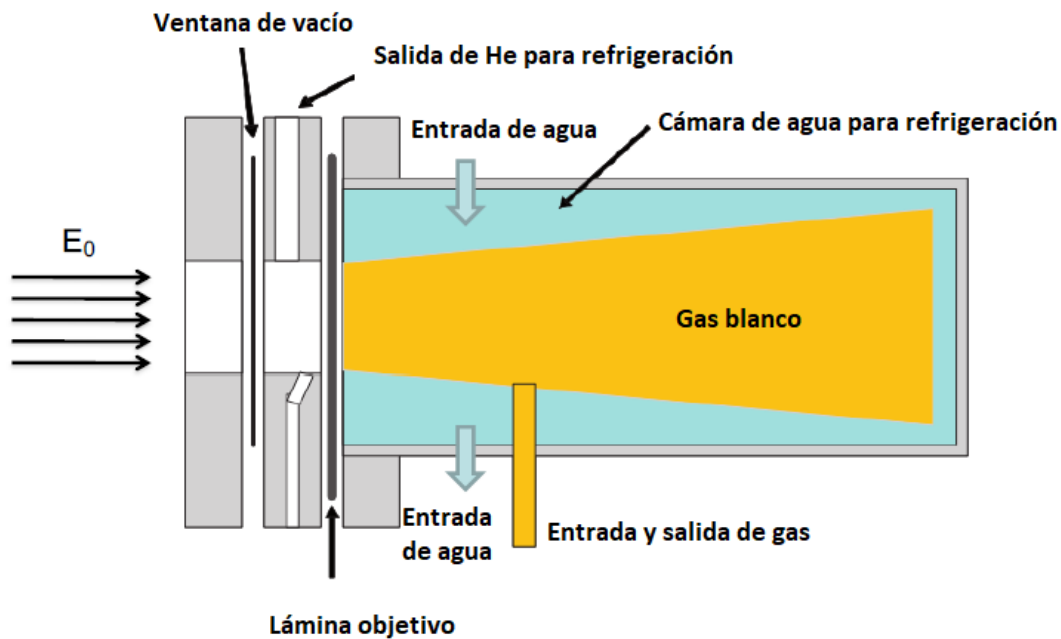


Figura 2.2. Geometría típica de un blanco gaseoso.

Para los blancos gaseosos y líquidos su procesamiento es en general automatizado. Los radionúclidos obtenidos al ser de baja Z tienen un alto porcentaje de decaimiento por β^+ y vidas medias relativamente cortas como las del ^{11}C ($T_{\frac{1}{2}} = 20.4 \text{ min}$) y el ^{18}F ($T_{\frac{1}{2}} = 110 \text{ min}$). El proceso de radiomarcado con estos radionúclidos usualmente se lleva a cabo de forma directa.

Por su parte los radionúclidos obtenidos de blancos sólidos son considerados no convencionales y se caracterizan por que su procesamiento es más difícil de automatizar, la mayoría de las veces tienen una vida media mayor que la de los radionúclidos convencionales producidos en blancos gaseosos y líquidos, su decaimiento por β^+ es en porcentaje menor a los convencionales y pueden llegar a emitir rayos gamma diferentes a los de aniquilación. Otro aspecto importante a considerar es que los radionúclidos no convencionales metálicos requieren de un

ligando, por lo que la síntesis radioquímica variará a comparación de los convencionales (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O y ^{18}F).

La diferencia más importante de los blancos sólidos es que se necesita fijar el blanco a una base que sea posible colocar en el ciclotrón para su irradiación. Por lo tanto, la geometría del cuerpo variará bastante a comparación de los blancos líquidos y gaseosos, un ejemplo se muestra en la figura 2.3. La estructura donde se coloca el disco de soporte variará en función del ciclotrón que se esté utilizando, esta puede tener forma de disco, rectangular, cilindro, dedal, etc.

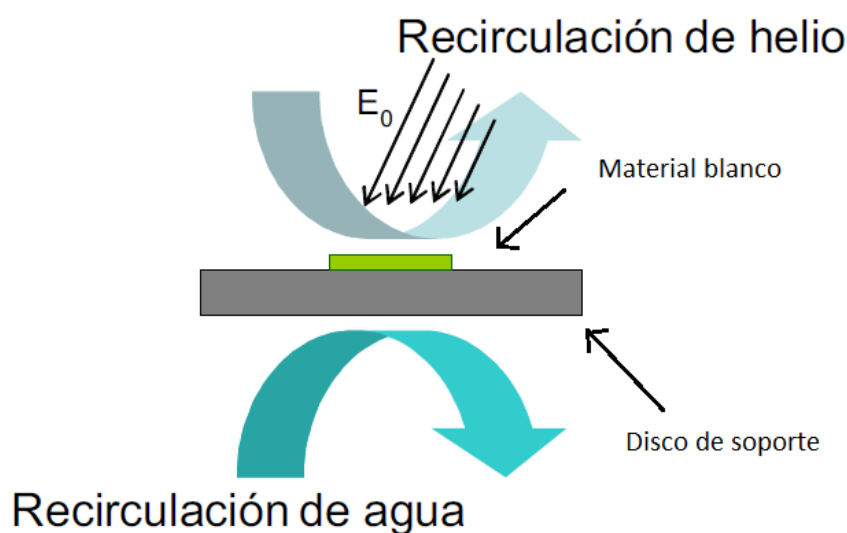


Figura 2.3. Geometría típica de irradiación de blancos sólidos.

El radionúclido producto seguirá estando en el disco de soporte por lo que posterior a la irradiación se deberá separar de él, lo cual se explicará a más detalle en la sección correspondiente.

En el caso de la producción del ^{64}Cu actualmente se utiliza un blanco de ^{64}Ni electrodepositado en un disco de oro para su posterior irradiación (procedimiento que se detallará en la siguiente sección). Igualmente, los costos de producción se incrementan al requerir un material isotópicamente enriquecido ya que la abundancia natural del ^{64}Ni es de tan solo 0.93% y tiene un costo de aproximadamente \$40 USD/mg.

2.1.2. Preparación e Irradiación del blanco para la producción de radionúclidos

Como se vio previamente existen 3 tipos de blancos y en función de cual se utilice dependerá el método de preparación y su irradiación.

En el caso de blancos gaseosos se tomará como ejemplo la producción de ^{18}F molecular utilizando $^{18}\text{O}_2$ como material blanco.

El procesamiento de los blancos líquidos y gaseosos son generalmente automatizados por lo que mediante tubos capilares se conecta el tanque con $^{18}\text{O}_2$ con el cuerpo, llenándose e igualando presiones.

Posteriormente se inicia la irradiación y dependiendo de la actividad requerida y de la corriente utilizada por el ciclotrón se irradiará por un tiempo dado. La actividad obtenida al final del bombardeo estará dada por:

$$A_{eob} = A_{eosb} \left[\frac{mCi}{\mu A} \right] (1 - e^{-\lambda t}) I [\mu A] \quad (2.1)$$

Donde:

- A_{eob} : es la actividad al final del bombardeo en mCi
- A_{eosb} : es la actividad de saturación al final del bombardeo en $\frac{mCi}{\mu A}$
- λ : es la constante de decaimiento del radionúclido producido en s^{-1}
- t : es el tiempo de bombardeo+
- I : es la corriente del haz de protones en el ciclotrón en μA .

La ecuación es válida para las irradiaciones de cualquier tipo de blanco independientemente de su forma física. Puesto que existe una transferencia de energía, parte de ella se absorberá como energía térmica, lo cual aumentará la temperatura y por lo tanto la presión en el cuerpo. Igualmente, siguiendo el ejemplo de un blanco gaseoso, se generará una corriente de convección dentro del cuerpo como se muestra en la figura 2.4.

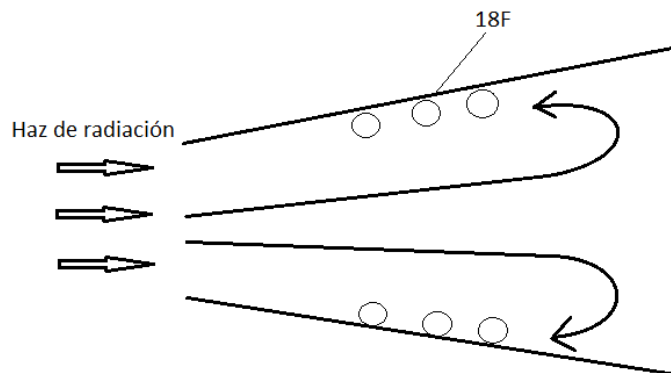


Figura 2.4. Corriente de convección creada por la irradiación de un blanco gaseoso.

Al generarse la corriente de convección aproximadamente el 80% del ^{18}F se fijará en la pared del cuerpo. Posteriormente se extrae el $^{18}\text{O}_2$ hacia una trampa criogénica por diferencias de presión. Para recuperar el ^{18}F se llena el cuerpo con Kr con 1% de F_2 , se irradia para generar la corriente convectiva y por desplazamiento isotópico se intercambia el ^{18}F por el F_2 en la pared.

En el caso de blancos líquidos el proceso es igualmente automatizado. Tomando como ejemplo la producción del $^{18}\text{F}^-$ utilizando $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ como blanco, se llena el cuerpo con el agua isotópicamente enriquecida y posteriormente se presuriza con helio. El helio sirve para aumentar el punto de ebullición y así evitar la formación burbujas. Teniendo la presión deseada se bombardea con protones por un tiempo determinado.

Para materiales sólidos el proceso es más complejo al momento de preparar el blanco, ya que en algunos casos se requiere realizar una electrodeposición en una base de soporte. Para este proyecto la electrodeposición del ^{64}Ni se realizó en un disco de oro hiperpuro (pureza del 99.99%).

El proceso de electrodeposición consta de varias partes y el objetivo es generar una capa electrodepositada del isótopo en la base de soporte, el cual debe estar en una solución electrolítica en forma de catión o anión.

Para llevar a cabo la electrodeposición se deben tener principalmente una fuente de voltaje un cátodo, un ánodo, y una solución electrolítica en donde se encontrará el isótopo que se quiere electrodepositar. El esquema del proceso y el ensamble experimental se muestran en la figura 2.5.

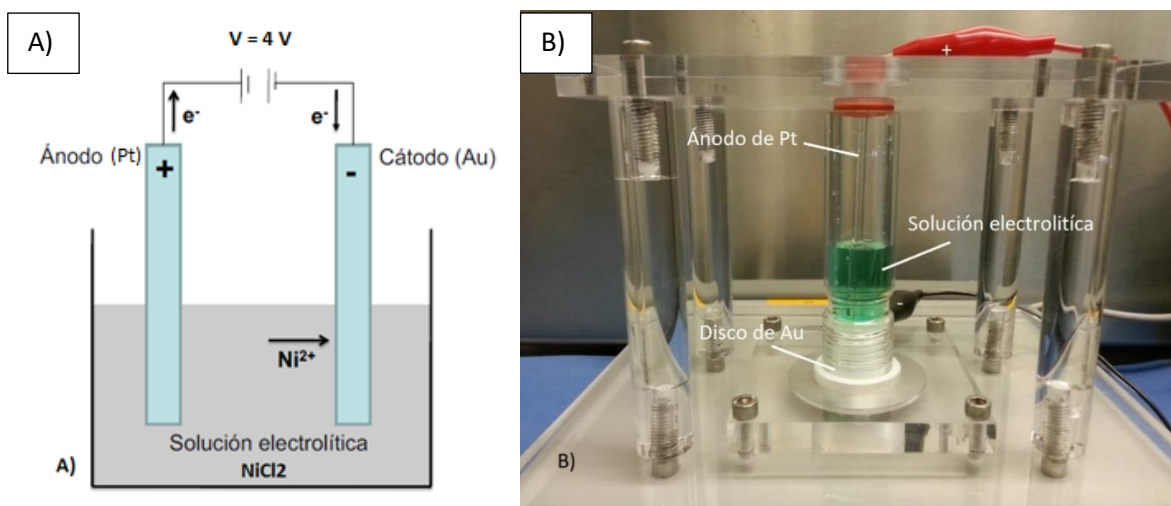


Figura 2.5. a) Esquema de la electrodeposición de $^{64}\text{Ni}^{2+}$ sobre un cátodo de Au, b) Ensamble experimental [38].

Una vez obtenido el ^{64}Ni electrodepositado se procede a la irradiación del blanco, el cual debe ser refrigerado eficazmente para evitar que la temperatura alcance el punto de fusión de los materiales del blanco y la base de soporte. Para ello es necesario seleccionar un disco soporte de un material con una alta conductividad térmica y resistencia a altas temperaturas. Se debe refrigerar con agua y en caso de ser necesario con algún gas refrigerante como el helio circulando directamente sobre el blanco como muestra la figura 2.3. El esquema del blanco sólido en el ciclotrón UNAM se muestra en la figura 2.6.

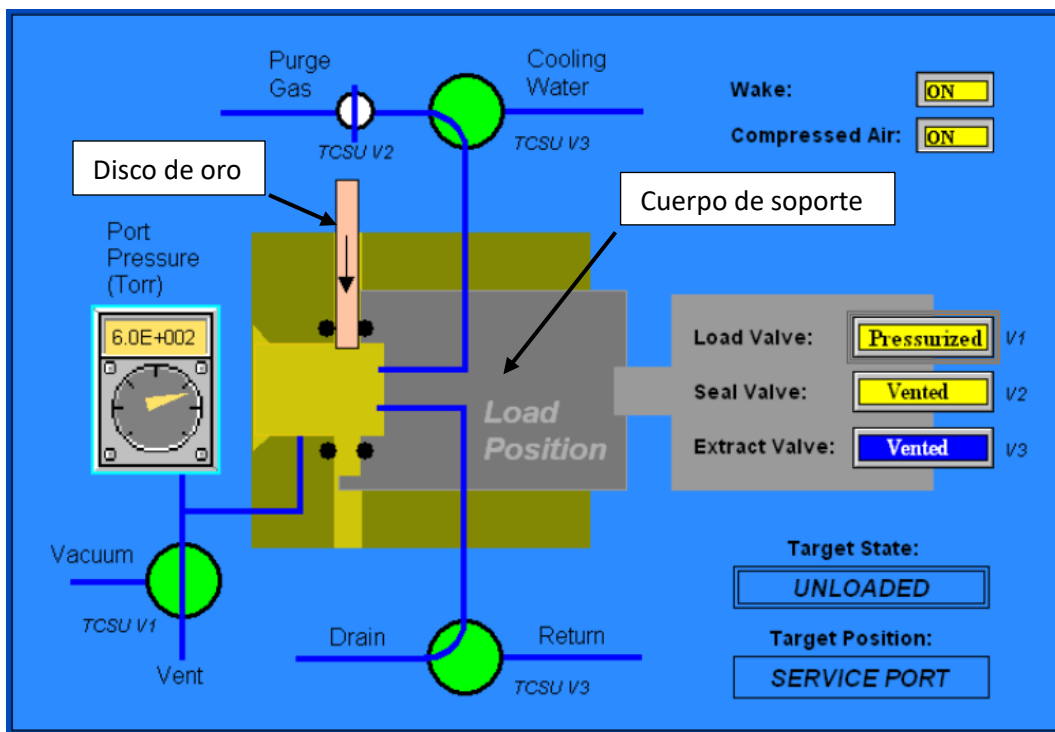


Figura 2.6. Diagrama esquemático del sistema para la irradiación de blancos sólidos en el ciclotrón UNAM.

El tiempo de irradiación dependerá de la actividad deseada, tomando en cuenta que la vida media del ^{64}Cu es de 12.7 h y que la A_{eosb} es de $180 \frac{\text{mCi}}{\mu\text{A}}$ para protones de 11 MeV que es la energía del ciclotrón de la Facultad de Medicina, UNAM.

2.1.3. Separación radioquímica y obtención del radionúclido.

Ya que los procesos de obtención de blancos sólidos son muy diferentes a los de líquidos y gaseosos se explicará directamente el de blancos sólidos mediante separación radioquímica.

En el caso del ciclotrón de la Facultad de Medicina, UNAM, después del bombardeo el disco de oro cae al retraer el cuerpo de soporte que se muestra en la figura 2.6. El disco es manejado con pinzas y puesto sobre un contenedor de tungsteno para llevarlo al módulo de disolución y separación radioquímica.

El módulo utilizado para la separación radioquímica es de la marca Trasis modelo mini All in One, como el mostrado en la figura 2.7, que se adaptó para realizar la

separación radioquímica del ^{64}Cu . En el módulo se lleva a cabo la separación radioquímica del ^{64}Cu y el material blanco (^{64}Ni). En el mismo proceso se separan las impurezas radionuclídicas producidas. Al irradiar el blanco de ^{64}Ni se produce ^{61}Co mediante la reacción $^{64}\text{Ni}(p,\alpha)^{61}\text{Co}$ y tiene una vida media de 1.65 h decayendo por β^- . El ^{61}Co es la impureza radionuclídica más importante en la producción de ^{64}Cu utilizando un blanco de ^{64}Ni enriquecido, pero al ser removido en el proceso de separación radioquímica no representa un problema. Al final del proceso se obtendrá el $^{64}\text{Cu}^{2+}$ listo para marcar con el precursor químico.



Figura 2.7. Módulo Trasis mini All in one (mini AiO).

Para realizar este proceso se extrae con pinzas el blanco irradiado del blindaje de tungsteno y se coloca en el bloque de disolución. Se sella el módulo y se añade una solución de HCl 10.4M para disolver el material blanco electrodepositado calentando a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 20 min. Una vez disuelto el material blanco se agrega agua milli-Q para reducir la molaridad del HCl a 6M.

Una vez diluido en ácido el módulo extrae la solución hacia una columna de resina de intercambio iónico AG1-X8. En dicha columna se eluye el ^{64}Ni con esa molaridad

6M y posteriormente se pasa una solución de HCl 4M para separar el ^{61}Co , y finalmente HCl 0.1M para extraer el ^{64}Cu . La fracción eluida que contiene el ^{64}Cu es evaporada en el reactor a 120°C para dejar únicamente el residuo de $^{64}\text{Cu Cl}_2$, que se recupera con un pequeño volumen de HCl 0.1M que se utiliza como solución *stock* para el marcaje. Utilizando disolventes ultrapuros se puede obtener una actividad molar de hasta $20 \frac{\text{Ci}}{\mu\text{mol}}$ de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ teniendo que la actividad molar sin acarreador es del $245 \frac{\text{Ci}}{\mu\text{mol}}$. La figura 2.8 muestra un perfil típico de elución y en función de la molaridad de solución de HCl. La figura 2.9 muestra el esquema general del módulo de separación radioquímica.

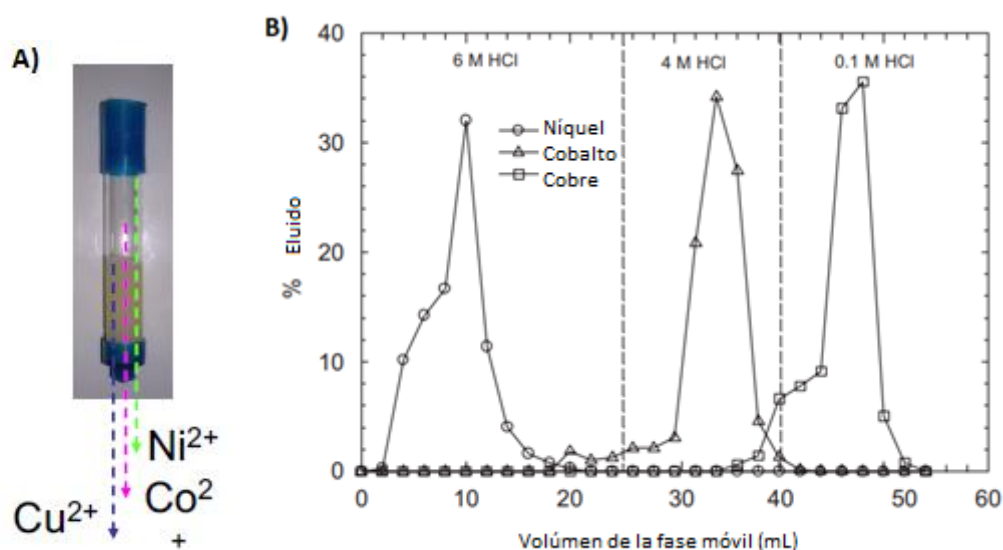


Figura 2.8. A) Columna de resina AG1-X8, B) Perfil de separación de ^{64}Ni , ^{61}Co y ^{64}Cu por cromatografía de intercambio iónico [39].

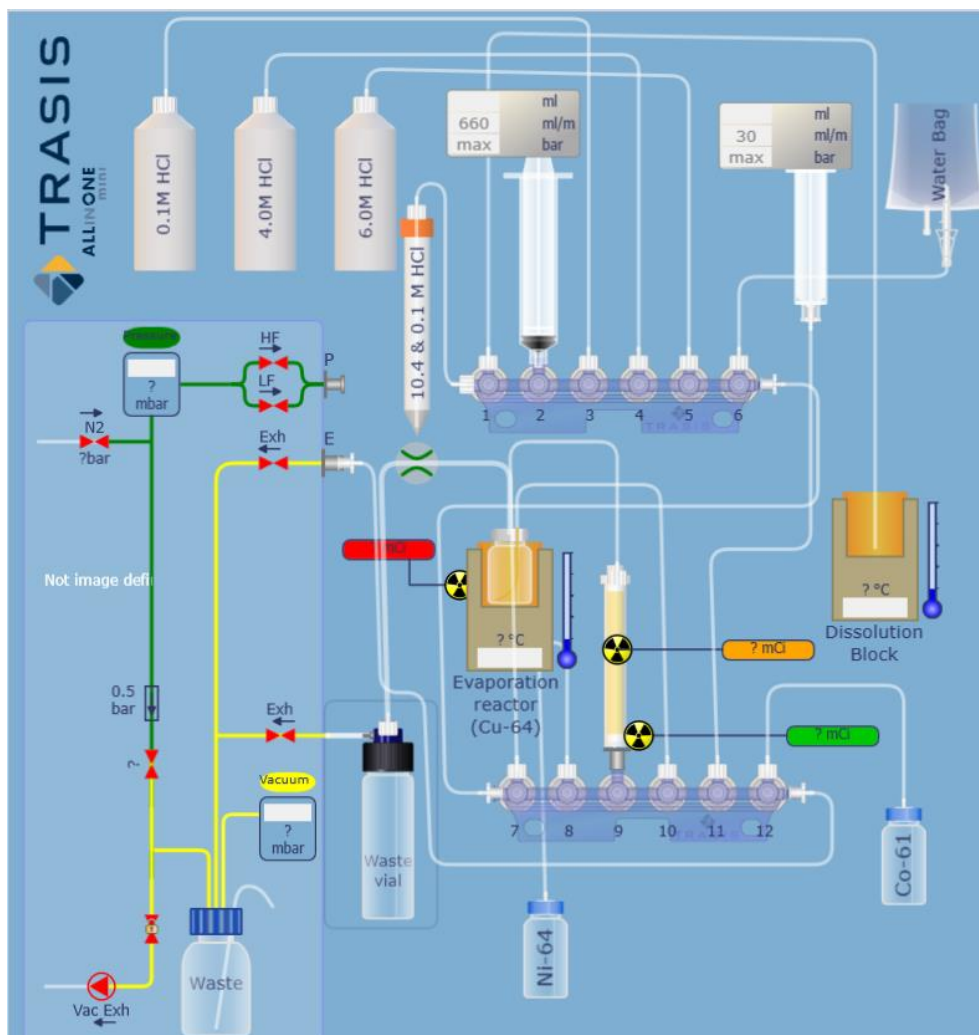


Figura 2.9. Diagrama esquemático del módulo de separación radioquímica.

Ya recuperado el ^{64}Ni se obtiene directamente en forma de $^{64}\text{NiCl}_2$ en solución de HCl 6M, esta se calienta para evaporar el HCl y recuperar el $^{64}\text{NiCl}_2$ y así repetir la electrodeposición. El proceso de recuperación tiene una eficiencia $\geq 95\%$.

2.1.4. Molécula precursora y síntesis radioquímica

El conjugado NOTA-Benzoil-NCS-Trastuzumab (NOTA-Trastuzumab) se obtuvo como un kit de formulación de un solo vial y fue sintetizado en el LANIDER del ININ. Para el radiomarcado, el conjugado (5 mg) liofilizado es reconstituido con 1.5 ml de buffer 0.25M de NaOAc y se incuba después de añadir 0.2 ml de $^{64}\text{CuCl}_2$ (0.1M HCl) por 30 min a 37 °C para finalmente obtener el radiofármaco ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab.

2.2. Control de calidad

Los radiofármacos al ser soluciones inyectables deben tener un riguroso proceso de control de calidad para garantizar su uso seguro en los pacientes que los reciben, y para que los efectos ocasionados sean únicamente los deseados ya sea para diagnóstico o terapia. Las pruebas garantizan distintas purezas como la radionuclídica, química y radioquímica. Otro aspecto que se debe considerar es disminuir el tiempo que conlleva realizar las pruebas de control de calidad, ya que la mayoría de los radionúclidos utilizados en PET son de vida media corta y la duración del proceso se debe minimizar.

Dicho proceso se lleva a cabo por personal diferente al que hizo la producción del radiofármaco y se debe iniciar justo después de la síntesis radioquímica. En el caso de este proyecto, el control de calidad es realizado por el personal de la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón encargado de estos procedimientos.

Las pruebas típicas de control de calidad de radiofármacos son las siguientes:

2.2.1. Inspección visual

Esta prueba ocurre justo después de realizar la síntesis radioquímica y simplemente se debe observar la solución obtenida en busca de partículas suspendidas, colores no deseados, sedimentos o cualquier propiedad que no sea atribuible a la solución deseada de referencia. Si se encuentra alguna propiedad no deseada el producto es descartado.

2.2.2. Determinación del pH

Posterior a la inspección visual se extraen aproximadamente 200 μL de solución para realizar esta y las demás pruebas posteriores. Para la determinación del pH se puede hacer uso de tiras medidoras de pH o con un medidor digital dependiendo de la resolución requerida. El pH ideal para los radiofármacos es de 7.4 que es el pH de la sangre, sin embargo, la sangre tiene una gran capacidad amortiguadora, y dado el pequeño volumen inyectado se pueden administrar en un intervalo amplio de pH. También se debe considerar que la estabilidad de algunas moléculas está definida por el pH así que es de suma importancia revisar que sea el correcto para la estabilidad del radiofármaco previo a su administración.

2.2.3. Pureza Radionuclídica

La pureza radionuclídica se refiere al porcentaje de actividad correspondiente al radionúclido de interés en comparación con la actividad total, contando la contribución de radionúclidos de activación no deseada ya sea en el material blanco o en la ventana del blanco al momento de irradiar, etc. Puede ser determinada obteniendo el espectro de emisión gamma de la muestra. Para identificar plenamente los radionúclidos, además del espectro de emisión, se puede medir la vida media, especialmente de los radionúclidos emisores de positrones que no emiten gammas adicionales a los fotones de aniquilación.

2.2.4. Pureza radioquímica

Se mide la actividad presente en la muestra de solución del radiofármaco en la forma química deseada, ya que podría encontrarse el radionúclido sin reaccionar o productos secundarios de la reacción radiomarcados. Esta debe ser mayor que el 90-95% y se determina mediante diversos métodos cromatográficos, por ejemplo, mediante cromatografía de capa fina (TLC) o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés). La cromatografía es muy útil ya que separa las diferentes moléculas por sus respectivos pesos moleculares, y puesto que cada una de las moléculas en la solución tienen distintos pesos moleculares la contribución de actividad de cada una se puede separar y determinar fácilmente.

En el caso de la cromatografía de capa fina se hace una auto radiografía para digitalmente medir la contribución de cada una de las moléculas radiomarcadas.

2.2.5. Pureza química

Aquí se mide principalmente el residuo de los solventes utilizados durante el proceso de disolución y separación del radionúclido, así como de la síntesis radioquímica. Se determina mediante cromatografía de gases y se verifica que no se excedan los límites permitidos de dichos solventes en ppm.

2.2.6. Esterilidad

Se verifica la ausencia de bacterias o microorganismos viables en el radiofármaco. Los radiofármacos se esterilizan por filtración al hacerlos pasar por una membrana de $0.22 \mu m$ la cual permite la filtración de medios líquidos e impide el paso de gases.

Puesto que no se puede hacer una prueba de esterilidad tradicional con medios de cultivo, se hace una prueba indirecta o de proceso verificando la integridad de la membrana del filtro intentando pasar aire por ella y observar que la presión se mantenga, hasta un cierto valor especificado por el fabricante.

2.2.7. Endotoxinas bacterianas

Finalmente, otra prueba consiste en la determinación de endotoxinas bacterianas que en algunos casos al ser más pequeñas que la membrana de esterilidad pudieran pasar por ella. El método utilizado es el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) con el método de gelificación o gel-clot. La prueba de endotoxinas bacterianas se realiza comúnmente mediante el uso del sistema PTS Endosafe, el cual mezcla la muestra del radiofármaco con el reactivo LAL, mide la densidad óptica de la mezcla y ésta se relaciona con la concentración de endotoxinas.

Una vez que se realizan todas las pruebas de control de calidad estipuladas para cada radiofármaco se elabora un certificado de control de calidad que indica los resultados de las pruebas, y si todas las pruebas dieron resultados satisfactorios se procede a liberar el radiofármaco para su uso en pacientes.

Capítulo 3. Farmacocinética y biodistribución de radiofármacos en estudios PET

En la imagen molecular PET se busca obtener imágenes que proporcionen información de algún proceso fisiológico a nivel molecular y así poder diagnosticar enfermedades u obtener información sobre la efectividad de un tratamiento. Para ello se requiere identificar algún marcador como un receptor celular (HER2 para este proyecto), una proteína, etc., cuya expresión, anabolismo o metabolismo se vea alterado debido a una enfermedad. Para poder obtener una biodistribución y captación en el sitio de interés se debe contar con un radiofármaco con alta afinidad hacia el objetivo molecular, este debe cruzar barreras vasculares, intersticiales o de membrana dependiendo del caso y maximizar la captación específica del radiofármaco. Igualmente, dependiendo de las propiedades del radiofármaco se tendrá una farmacocinética característica, un tiempo medio de captación en el sitio de interés, la vía de excreción y el tiempo medio de excreción también variarán.

Idealmente un radiofármaco debe absorberse de manera rápida en el objetivo molecular, con una actividad mínima en la sangre y en órganos que no son de interés para obtener un contraste adecuado, no se debe disociar en la sangre y tener una excreción rápida. La vida media biológica debe ser del orden de la vida media física para poder obtener imágenes a lo largo de su captación y excreción.

En el caso de los anticuerpos monoclonales su captación y metabolización es lenta, por lo que normalmente para su radiomarcado se utilizan radionúclidos de vida media relativamente larga (^{64}Cu con vida media de 12.7 h en este caso). Debido a su lenta farmacocinética, normalmente durante las primeras horas post-inyección, se tendrá una alta actividad en la sangre, por lo que el tiempo óptimo para obtener las imágenes PET se da varias horas o días después de su inyección. En el caso del ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab las imágenes a las 48 h post inyección presentan el mejor contraste tumor-sangre.

Para explicar la farmacocinética del radiofármaco se abordarán las partes principales de la misma que consta del transporte al objetivo molecular, biodistribución preclínica, biodistribución clínica, metabolización y excreción.

3.1. Transporte al objetivo molecular

Un radiofármaco seguirá diversos procesos antes de llegar al objetivo, desde su administración, transporte al capilar mediante el flujo sanguíneo, su extracción del capilar hacia el tejido y finalmente el objetivo molecular. En imagen molecular normalmente son de interés solo alguno de estos procesos, sin embargo, el resto está estrechamente relacionado con el de utilidad y de igual manera son importantes para conocer los tiempos ideales de imagen, cuantificación de dosis absorbida en órganos y vías de excreción.

El transporte del radiofármaco dependerá en un principio de la forma en la que se administra. En la mayoría de los casos para objetivos moleculares la vía de administración es la intravenosa ya que dichos objetivos son accesibles principalmente mediante la vascularización del cuerpo. En el caso del trastuzumab, al utilizarlo como medicamento, la manera más común de administrarlo es por vía intravenosa, sin embargo, actualmente existe la opción de hacerlo subcutáneamente donde se ha demostrado una eficiencia y seguridad similares [40]. Las variaciones entre una y otra vía de administración es la dosis que para la vía intravenosa se determina en función del peso del paciente con un régimen semanal, o cada 3 semanas con una dosis inicial mayor, mientras que para la administración subcutánea es una dosis fija cada 3 semanas [41]. Unas de las ventajas de su administración subcutánea son los tiempos cortos de administración (≈ 5 min de manera subcutánea vs 90 min por la vía intravenosa) y menos molestias durante la administración. Posiblemente en un futuro este método sea el preferido y se convierta en el más usado. Recientemente se investiga la eficiencia de su administración de manera intratecal para poder llegar a metástasis cerebrales ya que el trastuzumab no atraviesa la barrera hematoencefálica saludable, sin embargo si la barrera está comprometida debido a la metástasis cerebral o por

radioterapia, se podría dar una captación cuando se administra de manera intravenosa [42], [43], [44].

En la vía de administración intravenosa se llega directamente al torrente sanguíneo desde donde el radiofármaco se distribuye en todo el sistema circulatorio obteniendo una concentración de actividad en sangre más rápidamente. Una buena referencia para obtener la concentración de actividad en la sangre mediante imagen molecular PET es en el ventrículo izquierdo que puede desempeñar el papel de almacén sanguíneo. Una vez en el torrente sanguíneo los vasos se encargarán de distribuir el radiofármaco a los diferentes tejidos u órganos que tienen una captación no específica (solo debido a la irrigación sanguínea), así como al sitio de absorción de interés. El radiofármaco debe ser químicamente estable en sangre hasta alcanzar el sitio de interés. Si no fuera estable al menos por el tiempo requerido para los estudios, el radionúclido podría separarse del fármaco o se podrían formar metabolitos que podrían ser captados de manera específica en el sitio de interés, ocasionando un aumento de actividad en sangre y las rutas de metabolización del radiofármaco. En caso de que se formen metabolitos se podrían captar en otros tejidos u órganos, dando lugar a focos de captación inespecífica. Woo SK. y colaboradores [37] realizaron estudios de estabilidad para el ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab mediante cromatografía de capa delgada al incubar el radiofármaco en suero humano, suero de roedor y PBS a 1, 4, 6, 12, 24 y 48 h, obteniendo una alta estabilidad.

Sin embargo, hay ocasiones en las que el degradar o descomponer el radiofármaco en moléculas más simples podría ocasionar un beneficio. Uno de los objetivos de ello puede ser lograr una depuración más rápidamente la actividad en sangre y lograr un mejor contraste tumor-sangre a menores tiempos post-inyección. En una investigación realizada por Quin Ren et al. [45] utilizaron inyecciones de uroquinasa a distintos tiempos post inyección de ^{64}Cu -CB-TE1A1P-USL-Trastuzumab en roedores. Con ello se separó el radionúclido del trastuzumab para su excreción por la vía renal y así disminuir la actividad en sangre, obteniendo mejor contraste del tumor. Así se logró aumentar el cociente tumor-sangre y disminuir el tiempo para el

cual se obtiene dicho valor de 72 h a 24 h post inyección. Otro motivo útil de degradar el radiofármaco sería igualmente disminuir la dosis recibida en los órganos críticos cuando es utilizado para terapia molecular.

Para obtener una captación en el sitio de interés, el radiofármaco utilizado debe desempeñar el rol de la molécula con especificidad a la ruta metabólica o al receptor celular de interés por lo que su comportamiento deberá ser similar y no deberá alterar el proceso fisiológico a estudiar. Para ello se desarrollan análogos de la molécula o a veces es posible simplemente sustituir un átomo estable de la molécula por un radioisótopo de ese elemento. En el segundo caso es necesario verificar que la molécula resultante no se vea afectada por el efecto isotópico, el cual ocasiona un comportamiento químico diferente por el hecho de tener un peso atómico distinto. En el caso del ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab el rol del fármaco es bloquear los receptores HER2 para evitar la formación de homo/heterodímeros y así detener el inicio de las rutas de señalización intracelulares, por lo que su efecto sería contrario a lo que muchos otros radiofármacos buscan.

Cuando se utiliza un radiotrazador análogo se debe cuidar que conserve las propiedades de la molécula original en el proceso o sitio de interés. Al elaborar trazadores análogos se busca disminuir la complejidad de la farmacocinética lo cual se logra disminuyendo los procesos bioquímicos en los que interactúa la molécula y así volviendo al análogo más específico del sitio o proceso fisiológico a estudiar. Otra de las razones por las cuales se usan los trazadores análogos es debido a que normalmente las moléculas orgánicas solo contienen una cantidad limitada de elementos (C, H, O, N y P) y existe una variedad inmensa de radionúclidos que no entran dentro de esa lista. En el caso de anticuerpos monoclonales, como se mencionó previamente, su farmacocinética es lenta, por lo que requieren un radionúclido de vida media adecuada y al ser muchos de ellos metales se requiere un agente quelante para su unión al fármaco. El ^{64}Cu ha sido previamente conjugado satisfactoriamente con el trastuzumab utilizando los agentes quelantes DOTA y NOTA [37],[46], [47].

Posterior a su distribución por el sistema sanguíneo el radiofármaco circulará hacia el sitio de interés y deberá ser transportado de los vasos sanguíneos al tejido u órgano objetivo. La transferencia o flujo del radiofármaco entre los vasos sanguíneos y el tejido u órgano dependerá de diversos factores como pueden ser el flujo sanguíneo en dicho vaso (en unidades de mL/min), la permeabilidad del radiofármaco entre el vaso y el tejido, el área superficial del capilar y si se tiene algún tipo de transporte activo, pasivo, etc. específico a la molécula marcada. Por lo tanto, la velocidad de absorción del radiofármaco en el sitio de interés dependerá también de estos factores. La velocidad de absorción será proporcional a qué parte de la concentración de actividad transportada del torrente sanguíneo al tejido se queda en él, esto viene dado por la extracción neta:

$$E_n = \frac{C_A - C_V}{C_A} \quad (3.1)$$

Donde las C representan la concentración de actividad arterial y venosa. La extracción neta da la diferencia entre la extracción de concentración de actividad de la arteria hacia el tejido y su eliminación del tejido a la vena. Si no se considera la depuración del radiofármaco del tejido se obtiene la extracción unilateral que es la concentración de actividad que entra al tejido desde los vasos sanguíneos y se puede medir al observar la velocidad de absorción del tejido u órgano justo después de la inyección del radiofármaco.

Dependiendo del caso, la molécula radiomarcada entrará a una ruta metabólica/anabólica y quedará atrapada en la célula del sitio de interés como el caso del FDG. Para estos casos la molécula deberá ser transportada a través de la membrana celular ya sea por transporte activo, pasivo mediado por acarreador o por difusión simple.

En el caso de los anticuerpos monoclonales el objetivo son receptores celulares que pueden estar localizados extra o intramembrana. En el caso del ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab su objetivo son los receptores HER2 que se encuentran en la superficie membranal de las células de cáncer de mama, por lo que no requiere algún tipo de transporte celular [48].

Una vez en el tejido hay cuatro posibilidades para el radiofármaco: que siga existiendo de manera libre, unirse al receptor de interés, que se una no específicamente a otros receptores o que regrese al torrente sanguíneo.

La captación y el tiempo de permanencia en el sitio de interés del fármaco dependerán de la fuerza y facilidad con la cual se una con el receptor celular. Lo anterior puede cuantificarse con la constante de disociación K_d la cual se puede calcular mediante estudios *in vitro* midiendo la concentración de ligandos libres ([L]), receptores ([R]) y ligandos unidos a receptores ([RL]) cuando se tiene un equilibrio de asociación y disociación:

$$K_d = \frac{[L][R]}{[RL]} \quad (3.2)$$

Entre menor sea el valor de la constante se tendrá una mayor y mejor unión del radiofármaco hacia el receptor en cuestión. La inversa de la constante de disociación es conocida como la afinidad [21]. Kwon L. et al. reportaron una $K_d = 5.0 \pm 0.6 \text{ nM}$ para el ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab [49].

Para conocer la farmacocinética se requiere la toma de diversos parámetros y muestras a diferentes tiempos para conocer hacia donde se va el radiofármaco y qué tan rápido es absorbido o excretado. Dependiendo de si es un estudio preclínico o clínico se tendrá un menor o mayor número de limitantes para obtener dichos datos y obtener modelos matemáticos que proporcionen, por ejemplo, la vida media efectiva en sangre o la captación máxima en el sitio de interés.

En el caso de estudios preclínicos con roedores se pueden tomar imágenes dinámicas a diferentes tiempos para obtener curvas de actividad en función del tiempo de los volúmenes de interés que pueden ser órganos, tumores y vías de excreción. También se puede sacrificar a los roedores a diferentes tiempos post-inyección para diseccionar los órganos de interés y el tumor para medir la actividad absorbida y pesarlos.

En el caso clínico solo es posible obtener índices como el SUV mediante imágenes médicas. El SUV da una medida para estandarizar la concentración de actividad en

una región normalizada a la actividad inyectada y el peso del paciente. Se puede calcular el SUV_{mean} y el SUV_{max} utilizando la concentración de actividad promedio o máxima respectivamente de la VOI. El SUV ayuda a determinar y comparar la actividad en el tumor con los órganos de mayor captación o los involucrados en la eliminación del radiofármaco.

Únicamente se pueden obtener muestras *in vivo* del paciente a diferentes tiempos como orina, sangre y heces. También se debe considerar si la farmacocinética del radiofármaco cambia cuando el paciente está recibiendo otro tipo de fármacos cuando se realiza el estudio. Es común combinar medicamentos de quimioterapia con trastuzumab como son las antraciclinas y otros anticuerpos monoclonales, pero se ha observado que esto no influye en su farmacocinética [50].

3.2. Biodistribución preclínica

Previo a la administración de cualquier radiofármaco a humanos se requiere obtener su biodistribución en estudios preclínicos en modelos animales y así tener un estimado de su comportamiento en los estudios clínicos. Los estudios *in vitro* dan un estimado de la afinidad de un radiofármaco. Pero un organismo vivo es mucho más complejo y el radiotrazador en su sistema puede interactuar de distintas maneras. Claramente la farmacocinética variará entre el modelo animal y un humano ya que se tienen factores importantes a considerar como la masa corporal, la relación de masa entre órgano-cuerpo y la velocidad del metabolismo, debido a esto la biodistribución cambiará. Para ello se requiere escalar los resultados y obtener un valor más cercano al que se obtendrá en ensayos clínicos [51].

Para realizar un estudio preclínico se debe seguir las 3R del código de ética, las cuales son:

- Reemplazar: Si el estudio se puede realizar con cultivos celulares o mediante el modelaje matemático de la respuesta fisiológica se deberá realizar de esa manera.

- Refinar: El estudio se deberá realizar minimizando el dolor y sufrimiento del animal con el que se hará, utilizando apropiadamente anestesia y/o analgesia si es necesario.
- Reducir: Es obligatorio reducir al mínimo la cantidad de animales utilizados en un estudio preclínico manteniendo el resultado deseado para asegurar un estudio exitoso.

3.2.1. Obtención de la biodistribución

A la distribución espacial de un radiofármaco dentro de un ser vivo se le conoce como su biodistribución y depende de diversos factores como su transporte, extracción vascular, unión a receptores celulares, su difusión o transporte hacia las células, metabolismo, extracción de los tejidos y su excreción. La medición de la biodistribución puede ser obtenida de dos maneras, disección post-mortem y por imagen *in vivo*.

La biodistribución varía con el tiempo, lo cual implica que una imagen médica o la actividad en un órgano a los pocos minutos post-inyección y a varios minutos u horas serán completamente distintas. Esto sienta las bases de la importancia de conocer los tiempos óptimos para la obtención de las imágenes o la disección y así obtener correctamente la biodistribución y poder calcular parámetros como curvas de actividad de los distintos volúmenes de interés en función del tiempo. Para ello se deben tomar en cuenta los factores biológicos y la vida media física del radionúclido utilizado para conocer la vida media efectiva y seleccionar correctamente tanto la cantidad como el espaciamiento temporal de las imágenes a obtener.

3.2.2. Disección

Para obtener la biodistribución de un radiofármaco mediante disección se deben seleccionar varios subgrupos de animales a los que se les administrará el radiotrazador y que serán sacrificados a diferentes tiempos. Una vez sacrificados se diseccionarán los órganos y tejidos de interés para la medición de la actividad y el peso de cada uno.

Ya que el objetivo es tener una idea de lo que se obtendrá en estudios clínicos este método se reserva a animales mamíferos. Los mamíferos más utilizados en estudios preclínicos son los roedores. Igualmente se pueden recolectar muestras de excreción como orina y heces. Es importante medir la actividad del resto del cuerpo del roedor después de extraer los órganos para tener una medida más precisa de la actividad corporal total y poder compararla con la actividad inyectada. Se debe considerar el tamaño del órgano extraído por si existe una atenuación considerable de la radiación y una subestimación de la actividad. En el caso de roedores normalmente se desprecia dicha atenuación en órganos y tejidos. Una manera de evitar una subestimación de la actividad por atenuación es medir la actividad de una porción del órgano y considerar que está uniformemente distribuida en el resto y escalar lo obtenido al peso del órgano entero. En el caso de tejidos para los que sea complicado o imposible medir su actividad total como los huesos, el músculo y la piel se puede tomar una muestra de dicho tejido y estimar la actividad total con base en a la actividad por unidad de masa de la muestra y la masa corporal total del animal para obtener un aproximado de la masa total de dicho tejido y por lo tanto su actividad total. La fórmula para obtener dicha actividad total del tejido está dada por:

$$A_{tejido} = \left(\frac{A_{muestra}}{m_{muestra}} \right) \left(\frac{m_{tejido}}{m_{MC}} \right)_{referencia} m_{MC} \quad (3.3)$$

Donde $\left(\frac{m_{tejido}}{m_{MC}} \right)_{referencia}$ es la relación de la masa del tejido con respecto a la masa corporal dada en alguna referencia bibliográfica como la de Donaldson [52].

Debido a las diferentes estimaciones realizadas durante el proceso de medición la actividad calculada diferirá de la actividad administrada. Para forzar una normalización de la actividad de cada tejido se puede dividir cada actividad obtenida por:

$$\frac{\sum_{i=1}^{Ns} A_i}{A_0} \quad (3.4)$$

Donde la sumatoria es sobre todas las actividades de cada órgano y tejido medidos y A_0 es la actividad administrada. De esta manera la suma de las actividades medidas corregidas por decaimiento dan la actividad inicial inyectada.

Un estudio se debe realizar siguiendo las 3R de la ética en estudios en animales y por la naturaleza del método de obtención de la biodistribución por disección se debería considerar obtenerla de otra manera. Una forma alterna que requiere el sacrificio de una menor cantidad de animales es con imágenes PET, que se explicará a continuación.

3.2.3. Imágenes preclínicas microPET

Para el caso de roedores la obtención de imágenes se realiza con un equipo microPET dedicado para especies pequeñas. Con ello se pueden obtener imágenes de la biodistribución del radiofármaco a diferentes tiempos sin necesidad de sacrificar al animal a cada tiempo, reduciendo con ello la cantidad de especímenes utilizados. Esto conlleva una medición menos precisa de la actividad en cada órgano y tejido de interés. Una de las principales razones de ello es la resolución espacial del dispositivo y al efecto parcial de volumen que esto ocasiona. Una de las ventajas que presenta una imagen molecular PET es la visualización de la biodistribución en los órganos y tejidos, que son más difíciles de medir mediante disección. Para caracterizar cada órgano se deben dibujar volúmenes de interés y en dichos volúmenes, con la ayuda de un software para analizar imágenes, se va obteniendo la actividad acumulada en el órgano o tejido de interés.

Para caracterizar una biodistribución con imágenes PET mediante curvas de actividad-tiempo normalmente se puede ajustar una suma de exponenciales a un mínimo práctico de tiempos a analizar que para el caso de imágenes corresponde a 3 mediciones por cada exponencial a ajustar. Los intervalos de tiempo entre las mediciones dependerán de los puntos en la curva de actividad-tiempo donde ocurran cambios bruscos ya que ahí es donde se requerirá tener una mayor frecuencia de mediciones para poder ajustar mejor la curva. Típicamente una curva de actividad-tiempo se ajusta adecuadamente a la suma de dos exponenciales. Para los intervalos de tiempo entre imágenes el reporte 67 de la ICRU aconseja los

intervalos de 1/3, 2/3, 3/2, 3 y 5 veces la vida media efectiva a cuerpo entero ya que normalmente es al inicio de la biodistribución donde aumenta en mayor medida la captación del fármaco en los diferentes órganos y tejidos así como su extracción del torrente sanguíneo [53]. En el caso preclínico, si no se tienen investigaciones previas el valor de la vida media efectiva $T_{\frac{1}{2},eff}$ no es conocido, por lo que se debe determinar en los estudios preclínicos y clínicos. También es recomendable tomar una imagen entre 2 y 5 min post inyección para tener una visualización de la captación del radiofármaco. Se debe considerar que, si el radiofármaco tiene una vida media física considerablemente alta comparada con la vida media biológica, a tiempos largos es muy probable que la biodistribución se haya estabilizado, por lo que no siempre será necesario tomar mediciones mucho tiempo después de la administración.

3.2.4. Escalamiento de la biodistribución en un modelo animal a un humano.

El objetivo de realizar estudios preclínicos es observar y cuantificar el comportamiento del radiofármaco en un ser vivo similar al humano para poder predecir los resultados clínicos. Con ello se pueden obtener su biodistribución, estimaciones de la dosis en órganos, tiempos de transporte, permanencia y excreción. Para ello se elaboran modelos de escalamiento de los datos de la biodistribución animal a la humana.

Una manera de escalar los datos obtenidos del modelo animal a un modelo humano es mediante un escalamiento alométrico del tipo $P = km^b$ donde P es el parámetro fisiológico a escalar, m es la masa del órgano, k es el coeficiente alométrico y b es el exponente alométrico. Dentro de este tipo de escalamiento se puede hacer una serie de suposiciones que simplifican el modelo a costo de poder obtener resultados experimentales muy distintos en la fase clínica.

La primera suposición es hacer $b=0$, con ello la dependencia por la diferencia de masas entre el animal y el humano se ignora, por lo que los procesos fisiológicos tienen la misma velocidad y la biodistribución a los distintos órganos y tejidos es la misma a tiempos iguales. La suposición logra simplificar el desarrollo del modelo y su implementación en la fase clínica, sin embargo, ignora varias diferencias entre

ambas especies. Una de ellas es que la anatomía entre ambas no siempre es igual y la masa de un tejido u órgano relativa a la masa corporal casi siempre difiere entre especies por lo que claramente variará la cantidad de radiofármaco que será captado por dicho órgano o tejido, sobre todo si es el sitio objetivo. Un claro ejemplo de lo último es el hecho de que la masa del cerebro de una rata con respecto a la masa corporal es la mitad de la de un humano, por lo que (en primera aproximación) la actividad absorbida para un radiofármaco con especificidad para algún proceso cerebral será el doble en humanos. Una de las ventajas de esta suposición se tiene cuando un órgano de riesgo en el modelo animal tiene una razón entre la masa del órgano y la del cuerpo entero mayor que la del humano, con lo que al escalar al humano se obtendrá una dosis mayor que la real y por lo tanto se administrará una actividad menor. Con ello no se sobrepasarían los límites de dosis y se reduciría la probabilidad de efectos estocásticos.

Otra suposición es hacer $k = \frac{1}{m_{MC}}$ y $b = 1$, con lo que se supone que la velocidad de los procesos fisiológicos escala con la masa del órgano en cuestión relativa a la masa corporal. También se supone que la distribución de actividad en los órganos y el cuerpo humano y animal es uniforme con lo que se podría encontrar una concentración de actividad a cuerpo entero en función de la actividad inyectada y la masa corporal. La actividad se escala mediante la siguiente ecuación:

$$A_{\text{órgano,humano}} = A_{\text{órgano,animal}} \left(\frac{\frac{m_{\text{órgano,humano}}}{m_{MC,humano}}}{\frac{m_{\text{órgano,animal}}}{m_{MC,animal}}} \right) \quad (3.5)$$

Se han mostrado algunas de las maneras de escalar procesos fisiológicos en función de las masas entre especies, pero igualmente se puede escalar la velocidad metabólica en función de las masas. Es bien conocido que los procesos metabólicos se vuelven cada vez más lentos entre más grande sea una especie, por lo que resulta importante tomar esto en cuenta a la hora de escalar una biodistribución en

un modelo animal a un humano. Para tomar en cuenta estos cambios se puede usar la siguiente ecuación:

$$\lambda_{humano} = \lambda_{animal} \left(\frac{m_{mc,animal}}{m_{mc,humano}} \right)^b \quad (3.6)$$

Donde las λ son los parámetros metabólicos a escalar del animal al humano. Se ha demostrado experimentalmente que b tiene un valor de múltiplos de $\frac{1}{4}$ por lo que un proceso fisiológico se espera que sea más lento en un humano que en un roedor [54], [55]. También se puede modificar la ecuación para tener la relación entre las masas de los órganos en lugar de la masa corporal y obtener un valor más exacto de escalamiento.

Los modelos anteriores pueden ser modificados para tomar en cuenta diferentes variaciones y parámetros a considerar a la hora de escalar los procesos fisiológicos y metabólicos entre especies con el objetivo de obtener valores más cercanos a los reales. Sin embargo, los modelos se pueden volver muy complejos y difíciles de modelar con los datos experimentales obtenidos sobre todo cuando no se pueden cuantificar ciertos datos. Por ejemplo, se podría considerar la variación de la permeabilidad entre un vaso sanguíneo y el tejido a estudiar entre el animal y el humano para obtener valores más exactos del escalamiento, pero este dato no siempre es posible calcularlo experimentalmente o encontrarlo en la literatura para el radiofármaco a utilizar.

3.3. Biodistribución clínica

Conocer la biodistribución de un radiofármaco en humanos es de suma importancia para poder obtener la dosis interna debida a la radiación ionizante emitida durante su permanencia en el cuerpo y determinar la actividad adecuada para producir imágenes útiles en el diagnóstico de la enfermedad en cuestión. También es de importancia para obtener los valores reales de los tiempos de permanencia en el cuerpo (vida media efectiva) a fin de determinar el momento óptimo post inyección

para la toma de imágenes, programar los estudios clínicos durante las distintas fases de investigación y una vez implementado clínicamente [51].

3.3.1. Obtención de la biodistribución mediante imagen molecular PET

Para la obtención de la biodistribución de un radiofármaco en pacientes es exclusivamente mediante la imagen médica, en este caso imagen molecular PET y para poder aprobar un radiofármaco para su uso médico se debe conocer y cuantificar su biodistribución en humanos.

3.3.2. Determinación de la cantidad de estudios y los intervalos temporales entre cada uno

El primer paso para la obtención de imágenes es la programación de los tiempos de adquisición y la cantidad de imágenes a realizar. De los estudios preclínicos se debe tener una idea de la biocinética y la vida media efectiva del radiofármaco para poder decidir los tiempos de obtención de la imagen en una primera aproximación. También se podrían considerar los resultados de radiofármacos similares para tener una idea de la farmacocinética. Pero lo anterior no es lo único que se debe considerar ya que el tiempo de duración de un solo estudio restringirá los intervalos temporales sobre todo justo después de la administración del radiofármaco donde se requiere el menor distanciamiento temporal entre imágenes. La duración de un estudio dependerá, entre otros factores, principalmente en la actividad administrada, el porcentaje de los decaimientos β^+ para el radionúclido utilizado y la sensibilidad del equipo.

Entre los factores a considerar que involucran al paciente está su tolerancia para la duración de la adquisición de imágenes ya que para tiempos prolongados se podría tener movimiento y la imagen se degradaría. Para el caso de la separación temporal de dichas adquisiciones puede que al paciente no le sea posible regresar al hospital días después de la inyección del radiofármaco.

La planeación de los estudios debe llevar un equilibrio entre la actividad administrada y la duración de la adquisición de imágenes considerando principalmente las primeras adquisiciones ya que la actividad disminuirá y la

duración del estudio inevitablemente aumentará para obtener una relación señal a ruido aceptable.

Independiente a los factores antes mencionados las curvas de actividad a obtener pueden ser modeladas mediante el ajuste de curvas exponenciales, para cada exponencial a ajustar se requieren 3 mediciones y al final se requerirán entre 4 y 6 mediciones.

Similarmente, como en la fase preclínica, hay una distribución temporal recomendada por la ICRU en función de los múltiplos de la vida media efectiva de 1/3, 2/3, 3/2, 3 y 5 veces [53].

3.3.3. Imágenes PET obtenidas

En el análisis de las imágenes obtenidas en los estudios preclínicos se debe cuantificar la actividad de los órganos y tejidos que se espera tengan una captación considerable de actividad y que estén incluidos entre los especificados por el sistema MIRD (Medical Internal Radiation Dose). El sitio de inyección se debe considerar para estudiar en el análisis de imagen si presenta una extravasación del radiofármaco ya que se requiere una corrección de la actividad que entró en el cuerpo de la persona.

Para la imagen molecular PET en el estudio de la actividad en los distintos órganos y tejidos a estudiar es común definir volúmenes de interés (VOI por sus siglas en inglés) para que, con la ayuda del software de análisis, obtener la actividad y así ir cuantificando la biodistribución a distintos tiempos. El proceso se puede hacer de manera manual con base en a la experiencia del médico que contornea las imágenes tomográficas y va definiendo los límites de cada órgano o tejido. Sin embargo, cuando se tienen tomografías de cuerpo entero con una cantidad extensa de cortes coronales el proceso se puede volver tedioso y tardado. Esto puede ser resuelto mediante la automatización del contorneo en cada corte tomográfico donde se tienen diferentes métodos para definir los bordes de los distintos órganos y tejidos, pero este proceso no es perfecto debido a diferentes aspectos como lo son el efecto parcial de volumen y el solapamiento de órganos. Aunque el proceso se pueda automatizar siempre se requerirá de la corrección humana para verificar los

contornos sobre todo en las zonas de alto gradiente y el proceso al definir VOI se vuelve semiautomatizado.

3.4. Metabolización y excreción.

Los tiempos y formas de metabolización y excreción dependerán exclusivamente del radiofármaco con el que se esté trabajando y de la molécula marcada. En el caso de la metabolización debe ser conocida previo a los estudios ya que se conoce la molécula con la que se está trabajando y es desarrollada para observar algún proceso fisiológico, una ruta metabólica celular o en el caso de este estudio su captación en el receptor celular HER2.

No en todos los casos se conocen con exactitud los procesos de metabolización y excreción, como lo es con el trastuzumab. El fármaco es metabolizado intracelularmente después de su unión al receptor HER2 en péptidos y aminoácidos. Su metabolización está posiblemente mediada por las células epiteliales, es no lineal y dependiente de la dosis administrada [48]. Las células epiteliales expresan el receptor neonatal de Fc (FcRn por sus siglas en inglés) el cual se encarga del transporte de inmunoglobulinas y el control de su catabolismo. El FcRn internaliza la inmunoglobulina en la célula mediante endosomas y luego es reciclada hacia la superficie celular. La inmunoglobulina en exceso que no está unida al FcRn es degradada mediante lisosomas [56].

Para el trastuzumab el valor de la vida media biológica más comúnmente encontrado en la literatura es de aproximadamente 28 días para un régimen de dosis semanal [50]. Otros estudios reportan vidas medias distintas entre 18.3 [57] y 16.4 [58] días en un régimen de cada 3 semanas por lo que la vida media es dependiente de la frecuencia de administración del trastuzumab.

También se ha encontrado que la metabolización del trastuzumab se incrementa conforme el tamaño del tumor es mayor y que la vida media biológica es mayor en pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico [59].

Capítulo 4. Dosimetría interna.

Como se mencionó en el capítulo anterior es importante cuantificar la dosis absorbida debido a la interacción de la radiación ionizante con la materia en los órganos cuando se inyecta un radiofármaco. Dicha importancia crece si el uso que se le da es terapéutico ya que la actividad utilizada es mayor que la utilizada con fines de diagnóstico. Cuando se está estudiando un nuevo radiofármaco se requiere su evaluación dosimétrica desde los ensayos preclínicos para poder estimar la dosis que recibiría un paciente y posteriormente, la obtención de la dosis de radiación absorbida en ensayos clínicos. Para ello primero se requiere definir una serie de magnitudes de dosimetría que se emplean para poder cuantificar y comparar entre distintos estudios, así como modelos de referencia como lo son los maniquís de referencia utilizados en la dosimetría interna.

4.1. Magnitudes en dosimetría interna

En medicina es común utilizar la palabra dosis para referirse a la cantidad de algún medicamento utilizado para un tratamiento, pero cuando se trabaja con radiación ionizante la palabra toma otro significado. En este contexto la palabra dosis absorbido se refiere a la cantidad de energía depositada por algún tipo de radiación ionizante (fotones, electrones, etc.) a un material en una determinada cantidad de masa.

4.1.1. Dosis absorbida

La magnitud de interés en dosimetría interna es la dosis absorbida en el tejido u órgano. La dosis absorbida es la energía absorbida por unidad de masa de cualquier material. Queda definida como:

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad (4.1)$$

Donde $d\varepsilon$ es la energía promedio impartida por la radiación ionizante en la materia en un elemento de volumen de masa dm . Las unidades de la dosis de radiación en el sistema internacional son los $\frac{J}{kg}$ llamados Gy.

$$1Gy = 1 \frac{J}{kg}$$

4.1.2. Dosis equivalente

Denominada por H_T , toma en cuenta el tipo y energía de la radiación ionizante que interacciona con la materia, en este caso tejido, y por lo tanto el daño biológico que podría ocasionar. Debido a las diferentes interacciones de la radiación con la materia en función de la partícula que está interaccionando la dosis es absorbida de diferente manera. Para un fotón de alta energía (del orden de MeV) la dosis es absorbida progresivamente en un gran volumen de tejido debido a que los fotones son atenuados y no tienen un alcance finito. Las partículas alfa y beta, por otro lado, tienen un alcance definido por lo que depositan su energía en un volumen más reducido, siendo las alfas las que tienen un menor alcance y por lo tanto toda la energía es absorbida en un volumen menor de masa. Lo anterior se traduce en que, dependiendo de la partícula que interacciona y su energía, las ionizaciones provocadas ocurrirán en un intervalo espacial menor y podrán provocar un mayor daño biológico a las células y al ADN produciendo, por ejemplo, una mayor cantidad de roturas de una o doble cadena.

Para considerar este efecto se introduce un factor de ponderación w_R que toma en cuenta el tipo de radiación para obtener la dosis equivalente para poder cuantificar y comparar la dosis debida a distintos radionúclidos o fuentes de radiación. La dosis equivalente viene dada por:

$$H_T = D_T w_R \quad (4.2)$$

Donde D_T es la dosis promedio absorbida en el tejido T y w_R toma valores distintos en función del tipo y energía de la radiación ionizante, sus valores típicos se muestran en la tabla 4.1. La unidad usada para la dosis equivalente se le denomina sievert (Sv).

Tabla 4.1. Factores w_R en función del tipo de radiación y su energía [60].

Tipo de radiación	w_R
Fotones	1
Electrones (excepto Auger) y muones	1
Neutrones:	
< 10 keV	5
10 keV a 100 keV	10
100 keV a 2 MeV	20
2 MeV a 20 MeV	10
> 20 MeV	5
Protones > 2 MeV	10
Partículas alfa, fragmentos de fisión y núcleos pesados.	20

4.1.2. Dosis efectiva

El concepto de dosis efectiva fue introducido por la ICRP y representa la dosis equivalente que, si es recibida uniformemente en el cuerpo entero ocasionaría un riesgo similar al ocasionado por la absorción de una dosis uniforme en el caso real, por ejemplo, en la dosis depositada en distintos órganos al inyectar un radiofármaco. Para obtener la dosis efectiva se debe considerar la radiosensibilidad de cada órgano y tejido y el tipo de radiación que interacciona. La dosis efectiva queda en función de la dosis equivalente como:

$$E = \sum_T H_T w_T \quad (4.3)$$

Donde w_T es el factor de ponderación por el tipo de tejido y la sumatoria va para todos los tejidos y órganos de interés. La dosis efectiva da una idea del riesgo estocástico que la radiación ionizante pudiera ocasionar. La unidad utilizada para la dosis efectiva es igualmente el Sv. Los factores de ponderación w_T utilizados para el cálculo de la dosis efectiva se encuentran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Factores w_T para los distintos tejidos [61].

Órgano o tejido	w_T
Cerebro	0.01
Glándulas salivales	0.01
Médula ósea roja	0.12
Pulmones	0.12
Pecho	0.12
Pared del colon	0.12
Pared del estómago	0.12
Esófago	0.04
Hueso superficial	0.01
Piel	0.01
Tiroides	0.04
Gónadas	0.08
Hígado	0.04
Pared de la vejiga	0.04
Tejidos restantes	0.12

4.2. Cálculo de la dosis absorbida

Para hacer un cálculo de la dosis absorbida en los órganos de interés se requiere la siguiente información:

- El esquema de decaimiento del radionúclido utilizado. Con ello se identifican los tipos de decaimiento que sufre, la contribución de cada decaimiento, el tipo de radiación que emite y sus energías.
- La actividad inyectada.
- La biodistribución del radiofármaco y su cuantificación en cada órgano que se requiere evaluar.
- El tiempo de permanencia junto con la concentración de actividad a lo largo del tiempo en cada órgano de interés para el cálculo de la actividad acumulada.

Con lo anterior y mediante la ayuda de un software computacional (por ejemplo, OLINDA/EXM el cual se mencionará posteriormente) se puede determinar la dosis absorbida en cada órgano.

Uno de los parámetros más importantes para calcular la dosis absorbida es la actividad acumulada representada por \tilde{A} , que se refiere a cuántos decaimientos hubo en un órgano específico durante el tiempo de permanencia del radiofármaco. Una vez conociendo la cantidad de decaimientos y que porcentaje de dichos decaimientos (alfa, beta, gamma, etc.) corresponde a qué tipo de emisión, se puede hacer un cálculo del transporte de energía dentro del órgano y a otros órganos. En dosimetría interna los órganos y tejidos se pueden dividir entre fuentes y blancos, teniendo que un mismo órgano puede tener ambos papeles. También, conociendo el tipo de partícula que se emite se puede obtener la fracción de la energía de dicha partícula que se absorbe en el órgano o tejido de interés, teniendo en cuenta que las partículas cargadas tienen un menor alcance y los fotones solo pueden ser atenuados.

Con lo mencionado se puede definir una ecuación para obtener la dosis absorbida en el órgano T debido al órgano fuente S :

$$D_T = \frac{k\tilde{A} \sum_i y_i E_i \phi_i (T \leftarrow S)}{m_T} \quad (4.4)$$

Donde:

- y_i es la fracción de la i -ésima emisión
- E_i es la energía de la i -ésima emisión (o energía promedio en el caso de emisión beta)
- ϕ_i es la fracción absorbida en el órgano o tejido de interés de la i -ésima emisión
- m_T es la masa del órgano o tejido
- k es una constante de proporcionalidad que varía en función de las unidades utilizadas para la actividad, energía y de las unidades en las que se quiere

reportar la dosis. Por ejemplo, si se utilizan unidades del sistema internacional el valor de k es:

$$k = 1.6 \cdot 10^{-7} \frac{Gy \cdot kg}{MBq \cdot s \cdot MeV}$$

4.2.1. Actividad acumulada

Para obtener la actividad acumulada, idealmente se integra la actividad en función del tiempo para el órgano fuente

$$\tilde{A} = \int_0^{\infty} A(t) dt \quad (4.5)$$

Sin embargo, en los estudios reales no se obtiene una función de la actividad, sino puntos en función del tiempo obtenidos mediante una serie de mediciones por lo que se tienen dos opciones para obtener la actividad acumulada, aproximando el área mediante la sumatoria de trapezoides o el ajuste de una curva que reproduzca los datos obtenidos y su posterior integración analítica. Ambos métodos dan resultados aceptables, pero deben tenerse consideraciones al utilizarlos.

En el caso del método por trapezoides la suma del último trapezoide no contempla la cola de decaimiento y la expulsión que tiene el radiofármaco, por lo que se puede subestimar la actividad acumulada. Para contemplar esta sección y dar un enfoque conservativo se podría suponer que después de este punto el radionúclido únicamente decae físicamente y se integra la actividad después de este punto, por lo que se volvería una manera híbrida de obtener \tilde{A} .

En el segundo método se requiere de una cantidad de puntos suficientes para obtener un ajuste adecuado que reproduzca la realidad. Normalmente los procesos fisiológicos pueden representarse mediante una suma de términos exponenciales (4.6), por lo que su integración resulta sencilla.

$$A(t) = \sum_i a_i e^{-(b_i t)} \quad (4.6)$$

Donde a_i y b_i son los parámetros ajustados.

En este punto es importante mencionar que la farmacocinética del radiofármaco en un órgano o tejido puede ocurrir de distintas maneras. El radiofármaco siempre tiene un periodo de captación y posteriormente una disminución de la actividad por el decaimiento físico y la eliminación biológica. Dependiendo del órgano y del radiofármaco utilizado algún proceso puede llegar a ser despreciable, por ejemplo, si la captación ocurre rápidamente, o es despreciable en la escala temporal en comparación de la vida media del radionúclido y su retención, puede no considerarse el periodo de captación y únicamente calcular \tilde{A} después del máximo de captación.

Debido a que el radiofármaco sufre decaimientos radiactivos y una eliminación biológica se puede calcular una vida media efectiva que considere ambos procesos. Dichos procesos se pueden representar adecuadamente mediante un decaimiento exponencial, lo cual facilita el cálculo de la vida media efectiva T_e :

$$T_e = \frac{T_p \cdot T_b}{T_p + T_b} \quad (4.7)$$

Donde T_p es la vida media física y T_b la vida media biológica.

Suponiendo que el periodo de captación es despreciable la actividad acumulada está dada por:

$$\tilde{A} = 1.44T_e A \quad (4.8)$$

Donde A es la actividad máxima o inicial en el órgano fuente. Lo anterior solo es posible si se conoce correctamente la vida media de la eliminación biológica. También se pueden tener los casos donde la vida media del radionúclido es mucho menor que la biológica, por lo que en la ecuación (4.7) $T_e \approx T_p$ o viceversa si la vida media biológica es menor a la física.

4.2.2. Determinación de la concentración de actividad

Para poder cuantificar la actividad en un órgano se requiere de un software que permita la determinación de la concentración de actividad en los volúmenes de interés que pueden ser órganos, tejidos, tumores y cualquier otro sitio donde haya

una captación considerable del radiofármaco. Para ello existen diversos softwares que dan las herramientas para crear regiones de interés (ROI) y posteriormente volúmenes de interés (VOI) que darán la información de la concentración de actividad (Bq/ml o Bq/cc) en imágenes PET.

En este trabajo se utilizó el software Pmod que cuenta con las herramientas mencionadas con las que se pueden crear los VOI necesarios y obtener la concentración de actividad en dichos volúmenes. También permite la fusión de imágenes CT, MRI y PET para poder trazar las regiones de interés más fácilmente mediante estudios hechos por equipos híbridos PET/CT.

4.2.3. Fracción absorbida

Previo al cálculo de la dosis absorbida se requiere conocer la fracción absorbida $\phi_i(T \leftarrow S)$ para cada par fuente-objetivo y para el radionúclido utilizado. Para su obtención se utilizan softwares basados en Monte Carlo para calcular el transporte de energía debido a las diferentes emisiones de radiación ionizante para los diferentes medios donde se da el decaimiento del radionúclido en cuestión. El valor de $\phi_i(T \leftarrow S)$ para un radionúclido dado y un par fuente-objetivo es calculado para cada tipo de emisión y posteriormente los valores encontrados se guardan para que los cálculos posteriores de dosimetría interna sean más fáciles y rápidos para el mismo radionúclido. El valor de la fracción absorbida depende del tipo y energía de la radiación, la distancia entre la fuente y el objetivo, el volumen y composición del órgano absorbente. Al depender de lo anterior, los valores de ϕ_i se deben obtener mediante un modelo adecuado a la situación real, es decir, los valores de ϕ_i para un recién nacido no pueden ser los calculados para un modelo de un hombre de 70 kg. Para ello los modelos más usados son los publicados por el comité MIRD los cuales tienen establecidos diversos modelos representando humanos recién nacidos, de 1 año, 5 años, 10 años, 15 años y adultos los cuales pueden ser utilizados para obtener los valores de ϕ_i [62]. Con los valores de $\phi_i(T \leftarrow S)$ se calcula el valor $S_i(T \leftarrow S)$ que condensa la información de las abundancias de emisión y energías del radionúclido ($\sum_i y_i E_i \phi_i(T \leftarrow S)$). Los valores de $S_i(T \leftarrow S)$

son los que se proporcionan en las tablas del MIRD y son los utilizados por OLINDA/EXM para realizar el cálculo de la dosis absorbida.

4.2.4. Dosis absorbida

Finalmente se puede calcular la dosis absorbida utilizando la concentración de actividad obtenida con el software de análisis de imagen de las biodistribuciones a distintos tiempos, los datos del radionúclido utilizado y las fracciones absorbidas para cada par fuente-objetivo para el radionúclido en cuestión. Para ello en este trabajo se utilizó el software de OLINDA/EXM (Organ Level Internal Dose Assessment / Exponential Modeling), el cual tiene la información necesaria para el cálculo de la dosis interna para más de 800 radionúclidos y distintos modelos humanos. La información que se proporciona al software es el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido ($\frac{\%ID}{g}$) de los órganos cuantificados a los tiempos en los que se realizaron los estudios. El $\frac{\%ID}{g}$ indica la actividad presente en una región u órgano como porcentaje de la actividad inyectada disponible. Mediante un ajuste exponencial de los $\frac{\%ID}{g}$ a diferentes tiempos el software calcula la actividad acumulada para obtener la dosis absorbida en los distintos órganos y tejidos.

El software de OLINDA/EXM permite tres tipos de ajuste exponencial para calcular la actividad acumulada, de una, dos o tres exponenciales. En este estudio se utilizó el ajuste con tres exponenciales ya que fue el que mejor se ajustó a los datos proporcionados.

Con la actividad acumulada obtenida en cada órgano, los valores de $S_i(T \leftarrow S)$ para el modelo humano utilizado y conociendo las emisiones del radionúclido OLINDA/EXM calcula la dosis absorbida por actividad inyectada en los órganos, el cuerpo entero y la dosis efectiva aplicando la ecuación (4.4).

Capítulo 5. Materiales y métodos

5.1 Electrodeposición

El níquel enriquecido isotópicamente al 99.53% (^{64}Ni) en solución electrolítica con un pH entre 3.5 y 4 y con $25 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ de H_3BO_3 es electrodepositado sobre un disco de oro utilizando un voltaje máximo de 4 V. El montaje se puede observar en la figura 5.1. El disco de oro desempeña el papel del cátodo atrayendo los iones de $^{64}\text{Ni}^{2+}$ mientras que el filamento de platino funciona como ánodo.

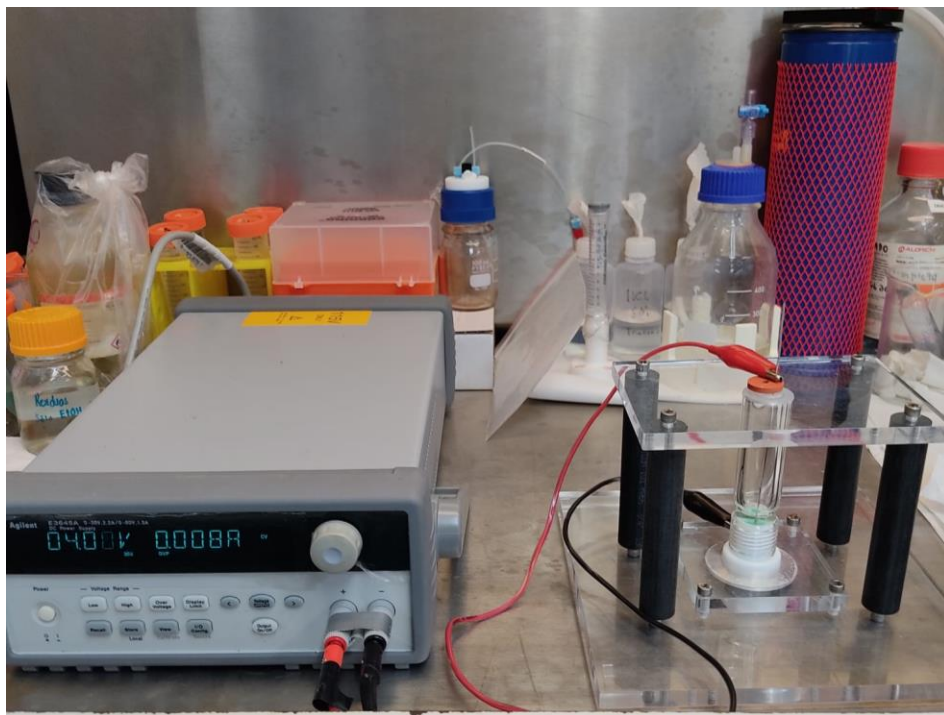


Figura 5.1. Montaje para la electrodeposición con la fuente de voltaje y la celda electrolítica.

Para realizar la electrodeposición primero se deben lavar el disco de oro, el tubo de cristal, el ánodo de platino y la base de PTFE sumergiéndolos en ácido nítrico por unos minutos, esto con el objetivo de eliminar impurezas metálicas. El disco de oro posteriormente debe ser pesado para calcular la cantidad de Ni electrodepositado al terminar la electrodeposición.

El ánodo debe ser colocado de tal manera que quede en el centro y 5 mm por encima del disco de oro.

El voltaje a utilizar dependerá de la cantidad de Ni en la solución electrolítica y se debe cuidar que la corriente generada no sea muy alta ya que se producirían burbujas durante el proceso que aumentan la resistividad de la solución. El proceso dura alrededor de 24 h y al terminar se revisa la cantidad de Ni remanente en la solución. Al inicio la solución electrolítica tiene un tono verdoso que indica la presencia de Ni y al terminar debe verse transparente.

5.2 Recuperación y reciclado de ^{64}Ni

Para la recuperación del ^{64}Ni después de la separación radioquímica se utilizaron un vial de vacío, un vial de condensación enfriado con nitrógeno líquido, un reactor de evaporación y una bomba para generar el vacío. El montaje experimental se muestra en la figura 5.2.



Figura 5.2. Montaje para la evaporación de la solución recuperada de ^{64}Ni en HCl 6M para su subsecuente electrodeposición.

Una vez evaporado el HCl 6M para reciclar el ^{64}Ni y utilizarlo en una nueva electrodeposición se debe acondicionar agregando agua mili-Q, la cual tiene un contenido de metales por debajo del nivel de ppb, al vial con el ^{64}Ni y mezclar adecuadamente con un *vortex* de laboratorio. Una vez mezclado se debe agregar una pequeña cantidad de HCl 0.1M ultrapuro hasta obtener un pH entre 3.5 y 4. Una vez obtenido el pH adecuado se agregan $25 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ de H_3BO_3 y se vuelve a mezclar la solución con *vortex*, estando así lista para volverse a electrodepositar.

5.3 Bombardeo

La irradiación se realizó con un haz de protones con una energía de 11 MeV y una corriente de $40 \mu\text{A}$ en el ciclotrón Eclipse HP de la Facultad de Medicina, UNAM. Los bombardeos realizados tuvieron una duración típica de 2 h colocando el disco de oro con el Ni electrodepositado en el mecanismo neumático adaptado para este ciclotrón mostrado en la figura 5.3.

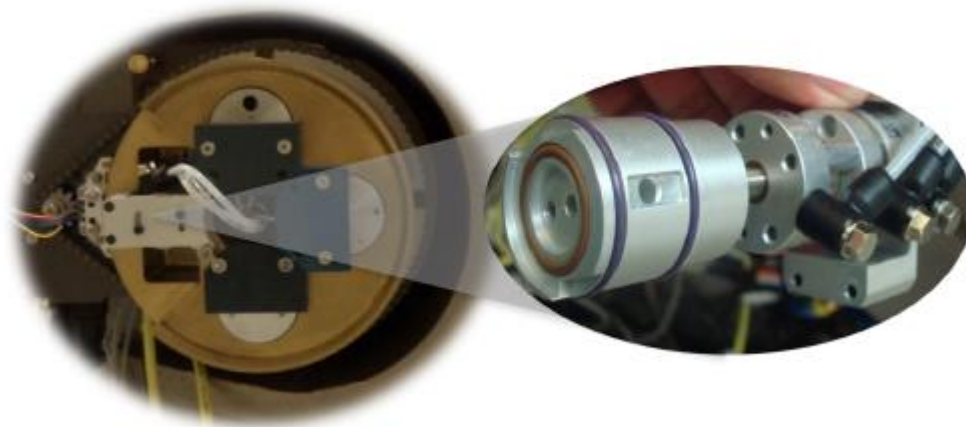


Figura 5.3. Mecanismo neumático para la colocación del disco de oro y su irradiación en el ciclotrón Eclipse HP.

El mecanismo neumático permite la refrigeración del disco de oro con agua que circula pasando por la superficie inferior del disco.

5.4 Separación radioquímica

Para la separación radioquímica el disco de oro es colocado sobre un bloque de disolución, como el mostrado en la figura 5.4, en el cual el Ni electrodepositado y los productos activados son disueltos en una solución de HCl 10.4M calentando el *dedo caliente* del bloque con el módulo calentador.

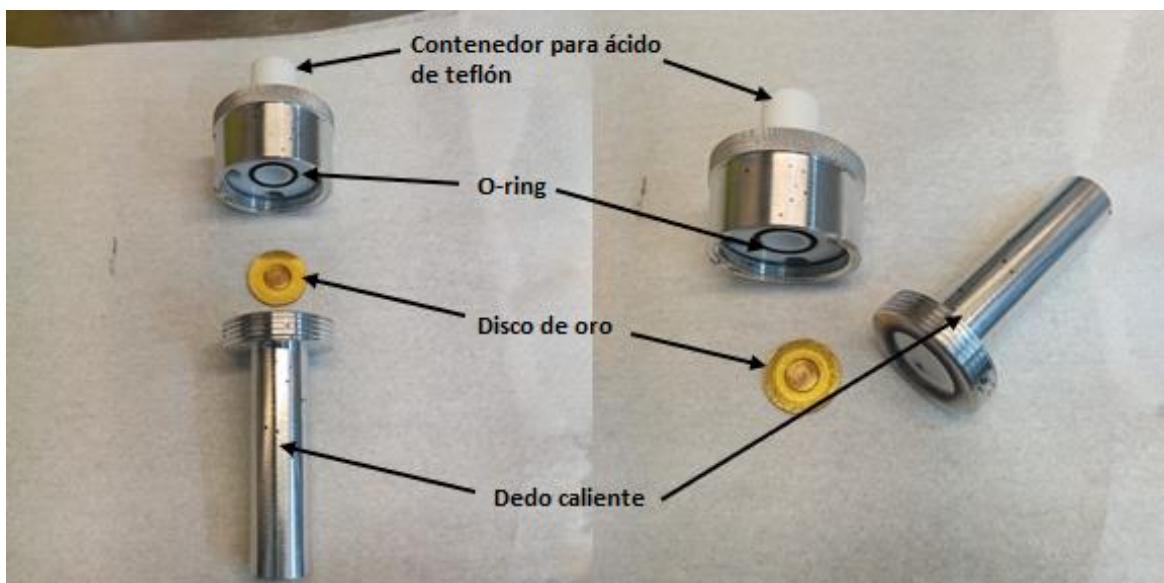


Figura 5.4. Bloque de disolución junto con el disco de oro.

5.4.1 Módulo de separación radioquímica

La figura 5.5 muestra el montaje experimental para la separación radioquímica utilizando un módulo Trasis mini AllinOne (AiO), cuyo proceso es completamente automático después de colocar el blanco sólido en el bloque de disolución. Desde la computadora con el software Trasis Supervision se puede observar en que parte del proceso se encuentra y si se presenta algún error durante la separación radioquímica.

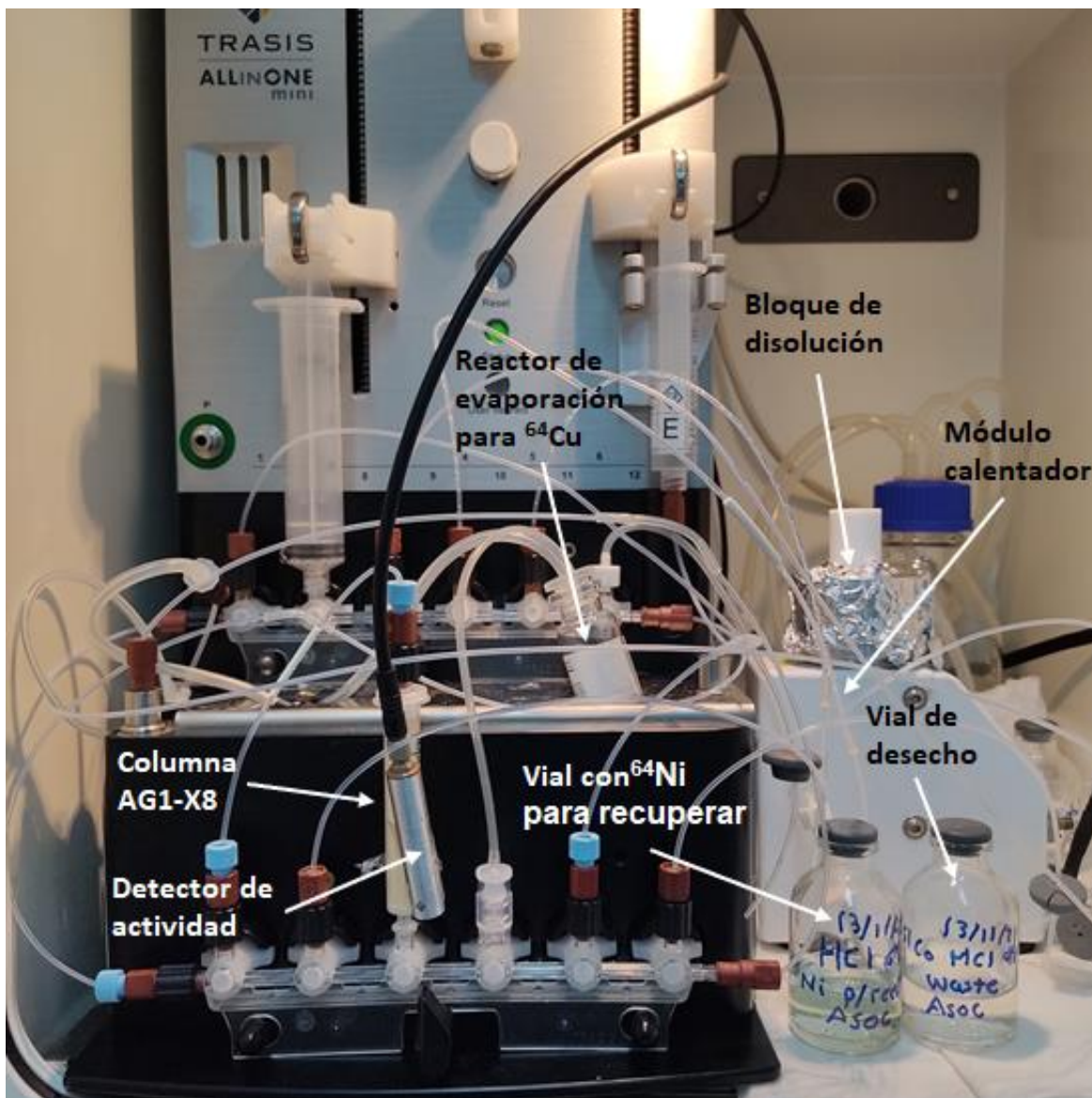


Figura 5.5. Módulo Trasis miniAiO junto con el bloque de disolución para la separación radioquímica del ^{64}Cu , ^{64}Ni y ^{61}Co .

El proceso de separación radioquímica se resume a continuación:

- Se añaden 2 ml de HCl 10.4 M al disco de oro en el bloque de disolución y se calienta a 90 °C por 30-40 min hasta que el Ni y los productos de activación estén disueltos.
- En paralelo al proceso previo se acondiciona la columna AG1-X8 pasando 16 ml de HCl 6M.

- Se añaden 1.4 ml de HCl 0.1M al bloque de disolución para reducir la molaridad del HCl a 6M, los 3.4 ml resultantes se extraen y pasan por la columna AG1-X8 para separar el ^{64}Ni y lo eluido se manda al vial de ^{64}Ni para recuperar posteriormente. Con esta molaridad el ^{61}Co y el ^{64}Cu quedan atrapados en la columna.
 - Se enjuaga el bloque de disolución con 4 ml de HCl 6M y se manda nuevamente al vial de ^{64}Ni .
 - Se pasan otros 6 ml de HCl 6M por la columna y se envían al vial de ^{64}Ni , esto con el objetivo de recuperar la mayor cantidad posible de ^{64}Ni para su reutilización.
 - Se pasan 6 ml de HCl 4M por la columna para eluir el ^{61}Co y se envían al vial de desecho.
 - Posteriormente se pasan 9.5 ml de HCl 0.1M para eluir el ^{64}Cu y se envía al reactor de evaporación.
 - Se calienta el reactor a 120 °C para evaporar el HCl 0.1M y dejar el ^{64}Cu .
- Para reducir la exposición a la radiación ionizante durante la separación radioquímica, el módulo fue colocado dentro de una celda Trasis H600 que se muestra en la figura 5.6. La celda puede permanecer completamente cerrada mientras se da seguimiento al proceso de purificación desde la interfaz gráfica del software de control.



Figura 5.6. Vista de la celda Trasis H600 cerrada y la computadora con el software Trasis Supervision.

5.4.2 Espectrometría gamma del radiofármaco

Para estudiar el radionúclido se obtuvo un espectro gamma 24 h después del bombardeo, a fin de identificarlo y observar si había alguna contribución de otro radionúclido. El espectro fue obtenido con un detector de centelleo de NaI(Tl) en la configuración mostrada en la figura 5.7.

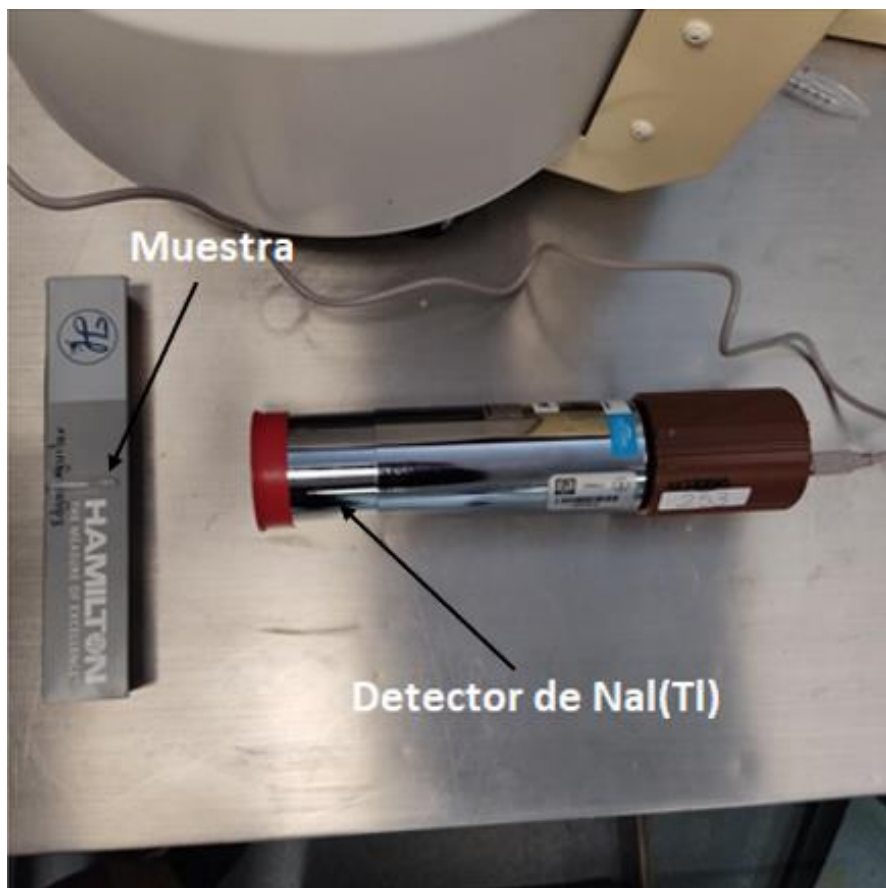


Figura 5.7. Configuración para la medición del espectro gamma de una muestra de ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab.

5.5 Radiomarcado

Una vez evaporado el HCl 0.1M del reactor de evaporación, el $^{64}\text{CuCl}_2$ fue reconstituido en 300-500 μL de HCl 0.1 M y una fracción de ello fue utilizada para el radiomarcado del conjugado por incubación en un baño seco. El agente quelante NOTA fue el utilizado para radiomarcarse con el ^{64}Cu y se utilizó un búfer de acetato de sodio para estabilizar el pH durante el radiomarcado.

La figura 5.8 muestra los viales con la molécula precursora liofilizada NOTA-Benzoin-NCS-Trastuzumab y el búfer de acetato de sodio utilizados. Este kit fue desarrollado en colaboración con el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (LANINDER-ININ).

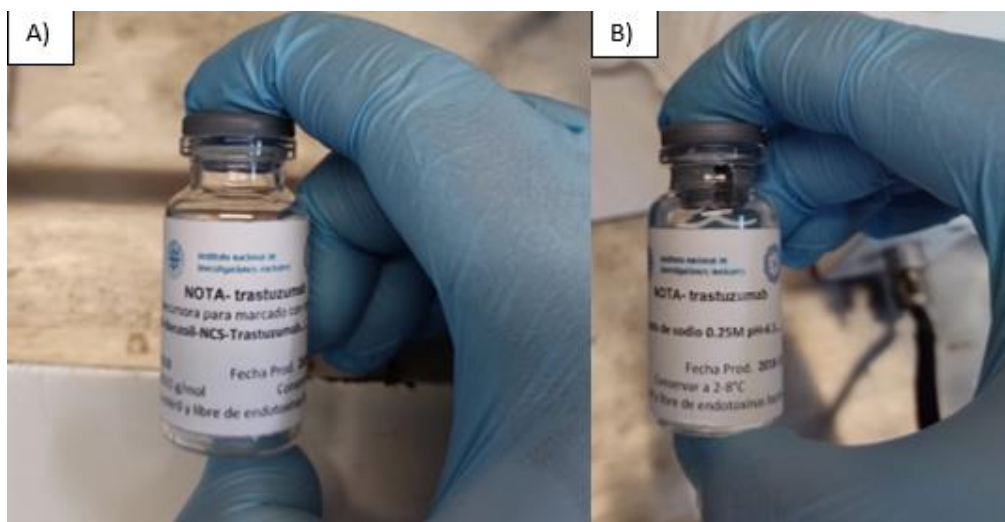


Figura 5.8. A) vial con la molécula precursora NOTA-Benzoil-NCS-Trastuzumab, B) vial con búfer de acetato de sodio 0.25M.

5.5.1 Incubación

Se utilizaron 5 mg de la molécula precursora y los tiempos de incubación fueron de 30-60 min a 37°C en un baño seco digital con 1.5 ml de búfer y $^{64}\text{CuCl}_2$ (figura 5.9).

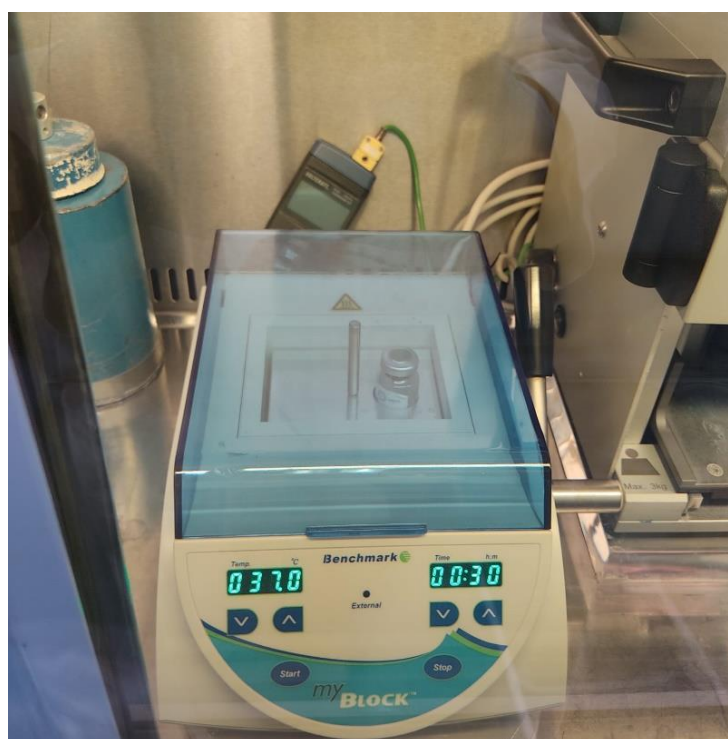


Figura 5.9. Baño seco digital, con temperatura y tiempo configurables, utilizado para el radiomarcado.

5.5.2 Purificación vía cromatografía por exclusión de tamaño

Para aumentar la pureza radioquímica se utilizaron las columnas mostradas en la figura 5.10. Estas columnas permiten separar moléculas de gran tamaño de las moléculas con menor tamaño, por lo que permiten separar el ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab del $^{64}\text{CuCl}_2$ que no logró reaccionar durante el radiomarcado.

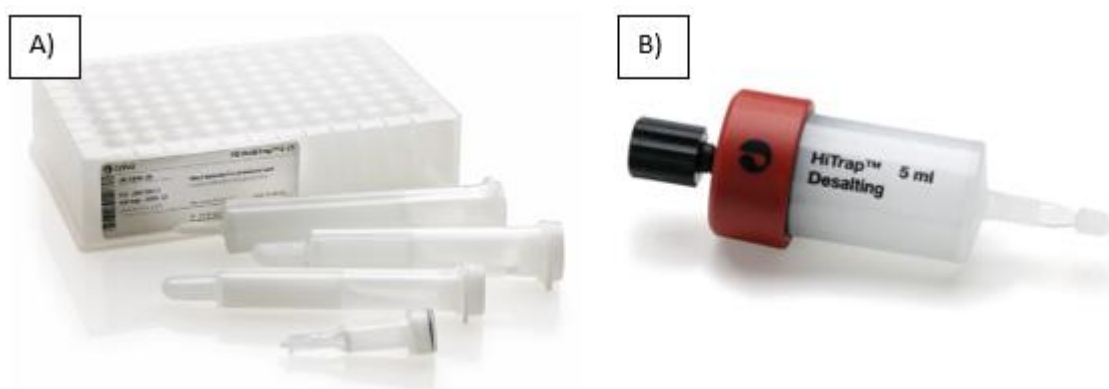


Figura 5.10. A) columna PD-10 con capacidad de elución de 2.5 ml, B) columna HiTrap con capacidad de elución de 1.5 ml.

Las columnas fueron acondicionadas con 25 ml de solución salina. Una vez acondicionadas el primer volumen eluido fue desechado (2.5 ml y 1.5 ml para las columnas PD-10 y Hitrap respectivamente) y el segundo volumen fue colectado en varios viales. Los viales obtenidos fueron analizados por radiocromatografía con una HPLC Waters 1525 de la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón UNAM.

El radiofármaco finalmente fue esterilizado mediante filtración utilizando un filtro Millex-GV Durapore de $0.22\ \mu\text{m}$ mostrado en la figura 5.11.



Figura 5.11. Filtro Millex GV Durapore de 0.22 μm .

5.6 Estudios preclínicos

Las imágenes fueron obtenidas con un microPET Focus 120 de la Facultad de Medicina, UNAM. El equipo tiene una resolución espacial de 1.6 mm, un FOV radial de 7.6 cm y un FOV axial de 10 cm. Las imágenes fueron reconstruidas con el algoritmo de reconstrucción iterativo OSEM2D, un total de 128 proyecciones, una matriz de 128X128 pixeles y un tamaño de píxel de 0.86X0.86 mm.

Los ratones fueron inoculados en el hombro con la línea celular HCC1954 de 2 a 4 semanas antes de los estudios. Se estudiaron en total 9 ratones separados en 2 grupos de 5 y 4 ratones. Al grupo de 5 ratones se le administró únicamente el radiofármaco mientras que el grupo de 4 ratones fue el bloqueado previamente con trastuzumab.

Las imágenes estáticas microPET fueron obtenidas a 1h, 3h, 24 h y 48 h p.i. En algunos de ellos se obtuvieron imágenes a 72 h y 96 h p.i. para observar la biodistribución a estos tiempos ya que a 96 h no se tiene registro en la literatura sobre la biodistribución de ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab. La duración de las adquisiciones para cada tiempo p.i. se resume en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Duración de las adquisiciones a los distintos tiempos p.i.

Tiempo p.i. de la adquisición (h)	Duración de la adquisición (min)
1 y 3	10
24, 48 y 72	30
96	120

Un día previo a los estudios con ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab se obtuvieron imágenes estáticas con FDG a 40 min p.i. de 10 min de duración para comparar la captación en el tumor entre ambos radiofármacos. Los estudios con FDG fueron realizados con los ratones en ayuno de 5 h y se les inyectó una actividad de $271 \pm 37 \mu\text{Ci}$.

Para medir la actividad a inyectar se utilizó el activímetro mostrado en la figura 5.12.

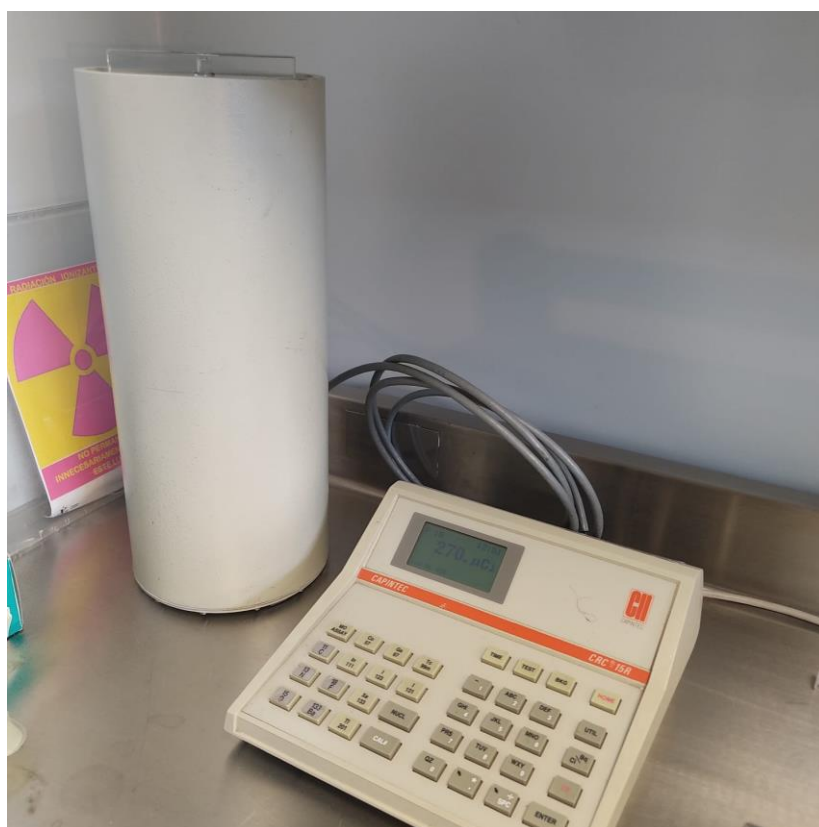


Figura 5.12. Activímetro utilizado para medir la actividad a inyectar a los ratones.

Los ratones fueron sedados con isoflurano al 2% y el radiofármaco se inyectó en un volumen no mayor que $100 \mu\text{L}$ por la vena de la cola (figura 5.13 C).

Para el bloqueo de receptores se utilizaron 0.5-1 mg de NOTA-Trastuzumab disueltos en un volumen $< 50 \mu\text{L}$ de solución salina, y se administraron 1 h antes de la inyección del radiofármaco.

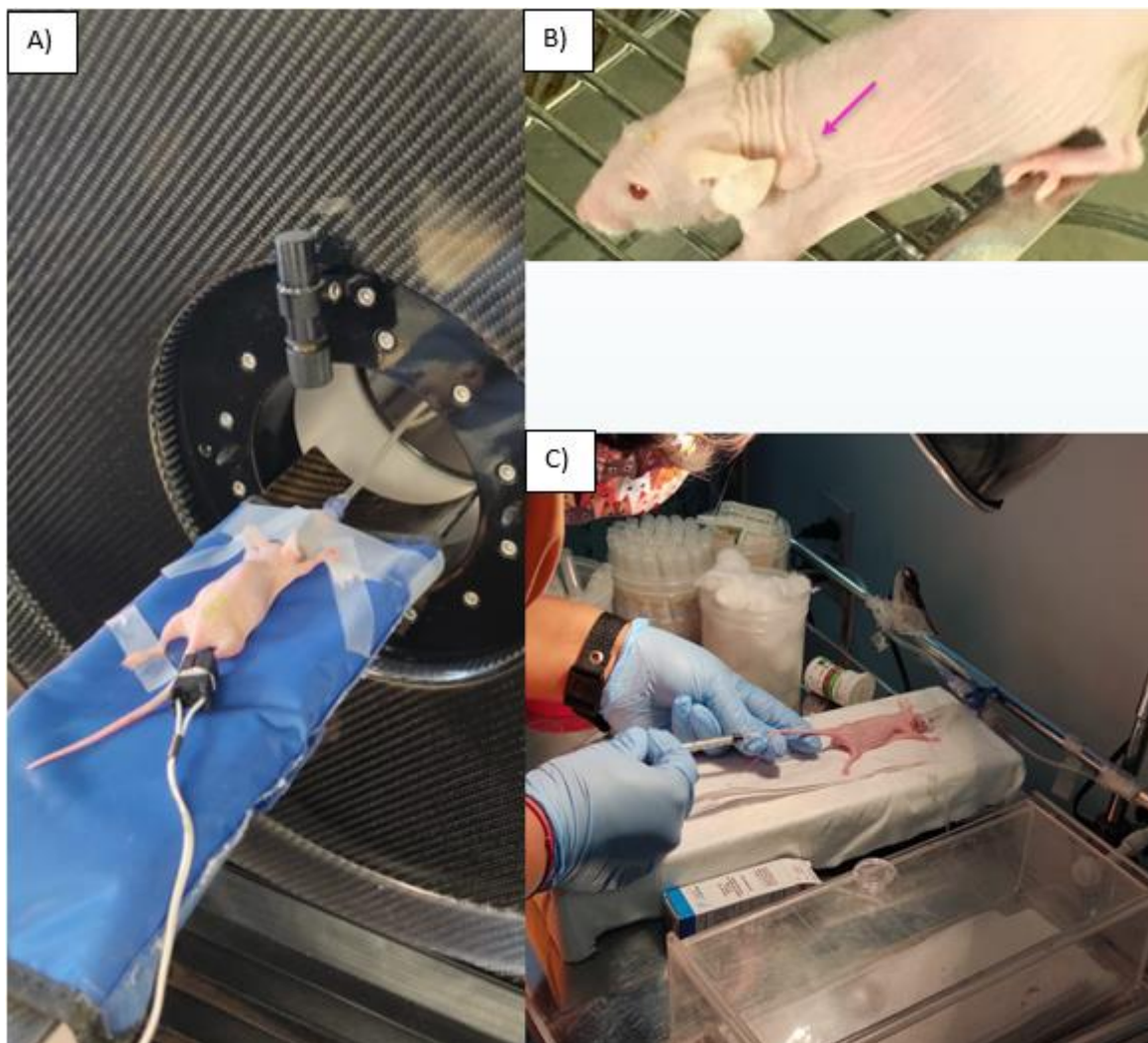


Figura 5.13. A) ratón en posición para obtener las imágenes con el microPET, B) ratón con el tumor subcutáneo visible, C) Sedación y administración del radiofármaco al ratón previo al estudio.

5.6.1 Cuantificación

Para realizar la cuantificación se obtuvieron las concentraciones de actividad con base en las imágenes microPET obtenidas de los estudios preclínicos elaborando VOI en los órganos con mayor captación y en el tumor. La limitante en este caso fue el no contar con un microCT para poder segmentar los órganos con base en las

imágenes tomográficas, por ello se realizaron varias VOI para una misma región de captación que correspondía a órganos fácilmente identificables como el hígado y el corazón. Las regiones anatómicas con captación del radiofármaco que correspondían a un órgano u otro fueron identificadas con la ayuda de la médico veterinario del Laboratorio de Investigación Preclínica microPET de la Facultad de Medicina, UNAM. Posteriormente se calculó el promedio de las concentraciones de actividad obtenidas en cada órgano y la concentración de actividad promedio fue utilizada para calcular los porcentajes de dosis inyectada por gramo de tejido ($\%ID/g$) de los órganos y el tumor de cada ratón.

Para obtener los valores de $\%ID/g$ en cada órgano, en función de la concentración de actividad corregida por decaimiento, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\%ID}{g}\right)_{\text{órgano}} = \frac{\left(\frac{C_A}{A_0} \cdot 100\right) e^{\lambda t}}{\rho_o} \quad (5.1)$$

Donde C_A es la concentración de actividad promedio del órgano en $\left[\frac{kBq}{ml}\right]$, A_0 es la actividad inyectada en kBq, λ es la constante de decaimiento del radionúclido, t el tiempo transcurrido entre la inyección del radiofármaco y el estudio, ρ_o es la densidad del órgano o tejido.

Para obtener el valor del SUV_{mean} se utilizó la siguiente ecuación:

$$SUV_{mean} = \left(\frac{C_A}{A_0} m_{WB}\right) e^{\lambda t} \quad (5.2)$$

Donde m_{WB} es la masa total del ratón en gramos.

5.6.2 Dosimetría interna

Para extrapolar los $\%ID/g$ obtenidos de las biodistribuciones en ratones a humanos se utilizó la siguiente ecuación [63], [64]:

$$\left(\frac{\%ID}{\text{órgano}}\right)_{\text{humano}} = \left[\left(\frac{\%ID}{g}\right)_{\text{animal}} \left(kg_{TB_{\text{peso}}}\right)_{\text{animal}} \left(\frac{g_{\text{órgano}}}{kg_{TB_{\text{peso}}}}\right)_{\text{humano}} \right] \quad (5.3)$$

Donde $kg_{TB_{peso}}$ es el peso del cuerpo entero en kg y g_{organo} es el peso del órgano en g.

Las masas de referencia de cada órgano para mujeres fueron obtenidas del ICRP 89 [65] y se resumen en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Masas de referencia para mujeres de los órganos considerados [65].

Órgano	Masa (g)
Hígado	1400
Corazón	620
Riñones	275
Intestino	1140
Cuerpo entero	60 kg

Con los valores obtenidos se ajustaron las curvas de actividad-tiempo utilizando el software OLINDA/EXM. La curva de ajuste utilizada en el software es la siguiente:

$$Actividad(t) = Ae^{-at} + Be^{-bt} + Ce^{-ct} \quad (5.4)$$

Estas curvas se integraron utilizando igualmente OLINDA/EXM para calcular los valores de la actividad acumulada y con dichos valores hacer la dosimetría interna del radiofármaco.

En el caso de los intestinos se utilizó el modelo gastrointestinal proporcionado por OLINDA/EXM.

Capítulo 6. Resultados

6.1 Electrodeposición

La corriente inicial generada utilizando 4 V fue de 8 a 10 mA. La duración de las electrodeposiciones realizadas fue de ~20 h con un remanente en la solución < 3% del níquel total electrodepositado, que se determinó utilizando una tira reactiva (figura 6.1). Las electrodeposiciones fueron de 10 a 20 mg de níquel enriquecido al 99.53% (^{64}Ni). En la última electrodeposición se utilizó níquel reciclado, lo que mejoró el rendimiento de marcado ya que al pasar por el proceso de purificación se eliminan impurezas de Cu y otros metales que compiten con el ^{64}Cu en el radiomarcado.

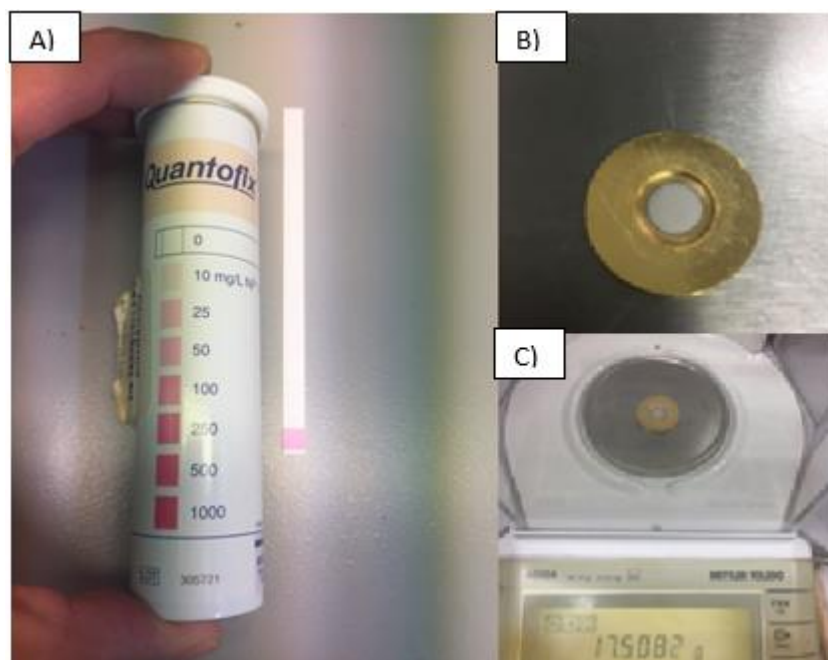


Figura 6.1. A) Tira reactiva para medir la cantidad restante de Ni en la solución electrolítica, B) Blanco sólido electrodepositado con Ni, C) Pesaje del blanco.

El voltaje y la corriente utilizados generaron una electrodeposición homogénea como se puede observar en la figura 6.1B y el Ni remanente en la solución fue mínimo.

6.2 Recuperación y reciclado de ^{64}Ni

Se recuperaron 3 viales (figura 6.2) de ^{64}Ni obtenidos de purificaciones durante este proyecto y se preparó con ello una solución stock con un pH de 3.7 y $25 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ de H_3BO_3 que fue utilizada en una electrodeposición.

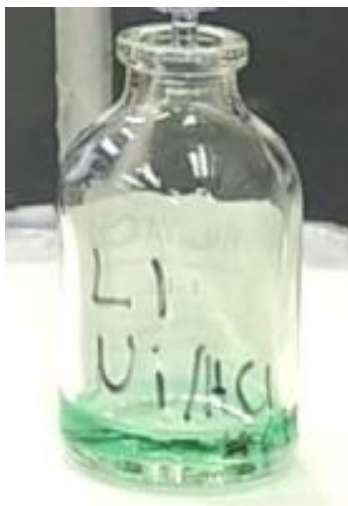


Figura 6.2. Vial con ^{64}Ni recuperado en solución de HCl 6M.

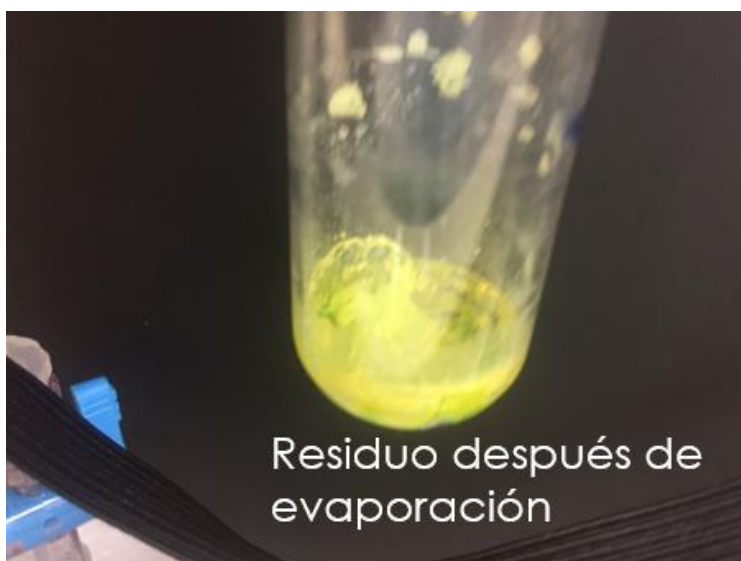


Figura 6.3. ^{64}Ni después de evaporar el HCl 6M y posteriormente preparar una nueva solución stock.

La evaporación del HCl 6M dio como resultado ^{64}Ni de un color verdoso como se puede observar en la figura 6.3.

La eficiencia de recuperación del ^{64}Ni fue $> 95\%$. Las pérdidas son debidas a una posible pérdida de la solución con ^{64}Ni mientras los gases de evaporación son absorbidos por la bomba que genera el vacío en el vial de evaporación (figura 5.2). Esta bomba al succionar el aire desde el vial de vacío, pasando por el de evaporación y luego por el de condensación, puede absorber cierta cantidad de solución si no se mantiene a una temperatura adecuada ya que al llegar al punto de ebullición el HCl empieza a burbujear. Otro aspecto por considerar para mejorar la eficiencia de recuperación es la cantidad de solución a evaporar. En el vial utilizado en este proyecto se evaporaron máximo 10 ml de solución recuperada a una $T = 110\text{ }^\circ\text{C}$ configurada en el software del módulo. Con ello se evitó la pérdida de la solución hacia el vial de condensación y que únicamente se evacuaron los gases evaporados.

6.3 Bombardeo

Con los parámetros utilizados se obtuvieron A_{EOB} de $96.3 - 210\text{ mCi}$ de ^{64}Cu , dependiendo de la cantidad de níquel electrodepositado en el blanco.

La tabla 6.1 muestra las A_{EOB} de los blancos y la cantidad de Ni electrodepositado.

Tabla 6.1. A_{EOB} de ^{64}Cu obtenidas con un tiempo de bombardeo de 2 h y una corriente de $40\text{ }\mu\text{A}$ durante los experimentos.

Blanco	A_{EOB} (mCi)	Ni electrodepositado (mg)
1	181.7	20.3
2	96.3	11.0
3	210.0	18.3

6.4 Separación radioquímica

La separación radioquímica del material blanco y de los productos de activación se realizó $\sim 24\text{ h}$ después del final del bombardeo. Esto con el fin de permitir el decaimiento de los productos de activación de vida media corta, principalmente ^{61}Co

que se co-produce con el ^{64}Cu , disminuyendo la exposición a la radiación durante la descarga del blanco y su traslado al laboratorio donde es procesada.

Como se ha mencionó en la sección 5.4, para la separación radioquímica se utilizaron distintas molaridades de HCl para separar el ^{64}Ni , ^{61}Co y ^{64}Cu . Los volúmenes y molaridades de HCl utilizados se resumen en la tabla 6.2.

Tabla 6.2. Cantidades y molaridades de HCl utilizadas para eluir los distintos metales durante la purificación.

Molaridad (M) de HCl	Volumen (ml)	Eluye
6	13.4	^{64}Ni
4	6	^{61}Co
0.1	9.5	^{64}Cu

Con los detectores de actividad colocados en distintas partes del módulo se obtiene un perfil de elusión como el de la figura 6.4. El detector colocado en la salida de la columna es el que se utiliza para obtener la actividad del ^{64}Cu . Con este perfil de elusión se encontró que al iniciar a eluir el HCl 0.1M se deben dejar pasar 3 ml al desecho ya que este primer volumen no contiene ^{64}Cu y luego coleccionar alrededor de 2.5 ml en el vial del reactor (punto de cambio señalado en la figura 6.4) y los 4 ml restantes de HCl 0.1M son enviados al desecho. Así la mayoría del ^{64}Cu es coleccionado en $\sim 2.5\text{ ml}$ y el resto del HCl 0.1 M es mandado a un vial de desecho. Esto es debido al volumen muerto de la columna, lo cual deja una cierta cantidad de HCl 4M de la elusión del ^{61}Co , por lo que los primeros ml que salen de la columna al cambiar a HCl 0.1 M se mezclan con el sobrante 4M y no logran eluir el ^{64}Cu ya que la molaridad combinada es mayor que 0.1M. Esto ayuda a coleccionar el ^{64}Cu en un volumen pequeño de solución y reducir los tiempos de evaporación en el reactor.



Figura 6.4. Perfil típico de elución medido por los distintos detectores de actividad en el módulo Trasis miniAiO.

Una vez colectado el ^{64}Cu en el reactor se utilizó una $T = 110\text{ }^\circ\text{C}$ para la evaporación del HCl 0.1M quedando únicamente el $^{64}\text{CuCl}_2$, que se recupera en un volumen de 0.3-0.5 ml que se utiliza como solución *stock* para el radiomarcado.

6.4.1 Espectrometría gamma del radiofármaco

La figura 6.5 muestra el espectro gamma obtenido sin haber evidencias de impurezas radionuclídicas 24 h después del final del bombardeo. El segundo pico corresponde a la γ de 1346 keV emitida en el decaimiento del ^{64}Cu con una abundancia del 0.48%.

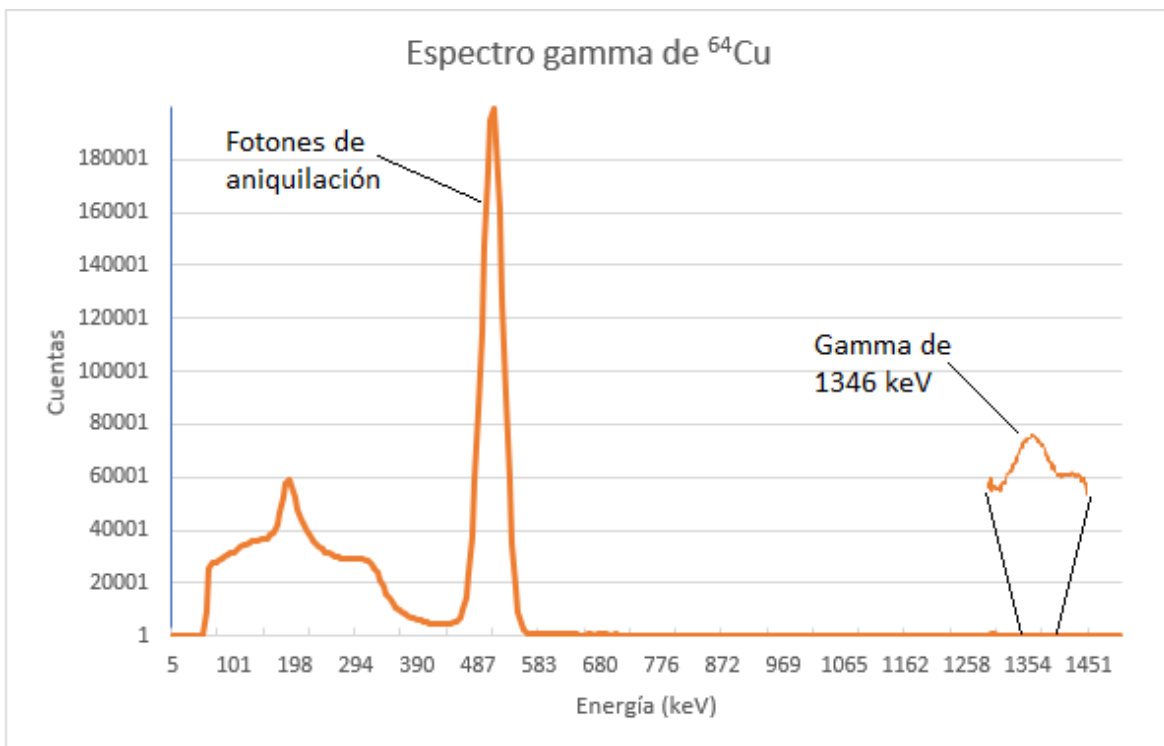


Figura 6.5. Espectro gamma de una muestra de $^{64}\text{CuCl}_2$.

6.5 Radiomarcado

Incubando 5 mg de NOTA-Trastuzumab, 1.5 ml de búfer y el $^{64}\text{CuCl}_2$ a 37 °C por 60 min se obtuvieron rendimientos de marcado o purezas radioquímicas de 20-30% debido a las impurezas de Cu, que eran del orden de ppm en el níquel enriquecido utilizado en las primeras electrodeposiciones. Se encontró que la cantidad de $^{\text{nat}}\text{Cu}$ debido a esto era de $\sim 1:10$ contra el ^{64}Cu producido, por lo que se requirió un proceso de purificación del radiofármaco por cromatografía por exclusión de tamaño para separar el $^{64}\text{CuCl}_2$ que no logró unirse a NOTA-Trastuzumab. El rendimiento de marcado puede ser mejorado al reciclar el ^{64}Ni ya que se eliminan las impurezas de Cu y Co que compiten en el proceso de radiomarcado del ^{64}Cu .

6.5.1 Purificación vía cromatografía por exclusión de tamaño

La tabla 6.3 resume la pureza radioquímica (PRQ) obtenida por radiocromatografía (figura 6.6) después de pasar el radiofármaco por cada columna.

Tabla 6.3. PRQ obtenida después de pasar el radiofármaco por las distintas columnas.

Primera columna PD-10			Segunda columna Hitrap			
# Viales	Viales utilizados	PRQ (%)	# Viales	Viales utilizados	PRQ (%)	Actividad total (mCi)
26	8-20	60-70	22	15-20	90-91	0.47

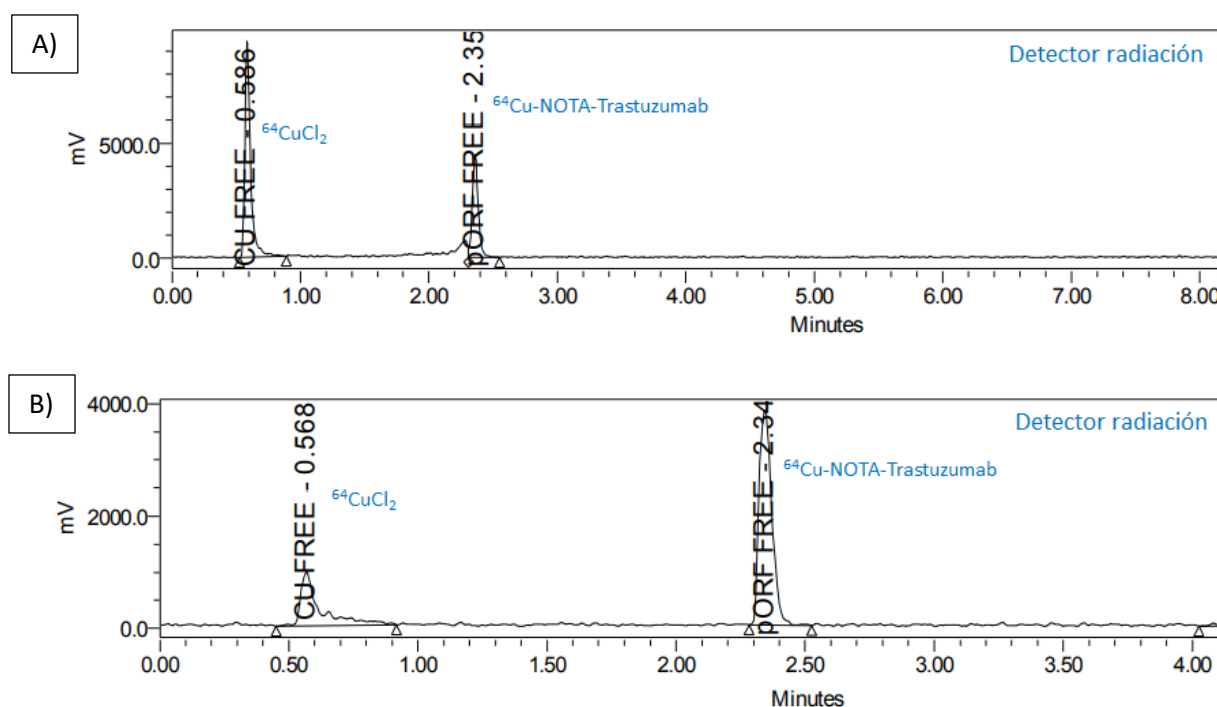


Figura 6.6. Perfil de radio cromatografía de una muestra del radiofármaco a) pre-purificación, b) post-purificación.

Una vez procesado el radiofármaco con ambas columnas se logró mejorar la pureza radioquímica de 20% hasta > 90% por lo que se estableció un método para poder recuperar una solución con bajo rendimiento de marcado debido a impurezas isotópicas de Cu, a alguna contaminación durante el proceso de purificación o a la presencia de otros metales que compiten en el proceso de radiomarcado. La principal desventaja de realizar este proceso es que la actividad obtenida después

del radiomarcado es reducida en cada cromatografía por lo que esto se debe tener en cuenta al planificar la actividad requerida en los estudios preclínicos.

Ya obtenido un rendimiento mayor que el 90% es posible realizar los estudios preclínicos con ratones.

6.6 Estudios preclínicos

6.6.1 Biodistribución

A los ratones se les administró el radiofármaco de manera intravenosa por la vena de la cola con una actividad de $101.8 \pm 6.4 \mu Ci$.

En la figura 6.7 se puede observar la biodistribución a distintos tiempos p.i. de un ratón no bloqueado y otro ratón bloqueado obtenidas mediante estudios microPET. Al ratón bloqueado se le administraron 0.5 mg de NOTA-Trastuzumab 1 h antes de la inyección del radiofármaco.

Las masas corporales de los ratones estudiados se resumen en la tabla 6.4.

Tabla 6.4. Masas corporales de los ratones incluidos en el estudio.

	Ratón	Peso (g)
No bloqueados	1	19.0
	2	21.2
	3	21.4
	4	21.7
	5	23.3
Bloqueados	6	24.1
	7	21.3
	8	20.5
	9	21.7

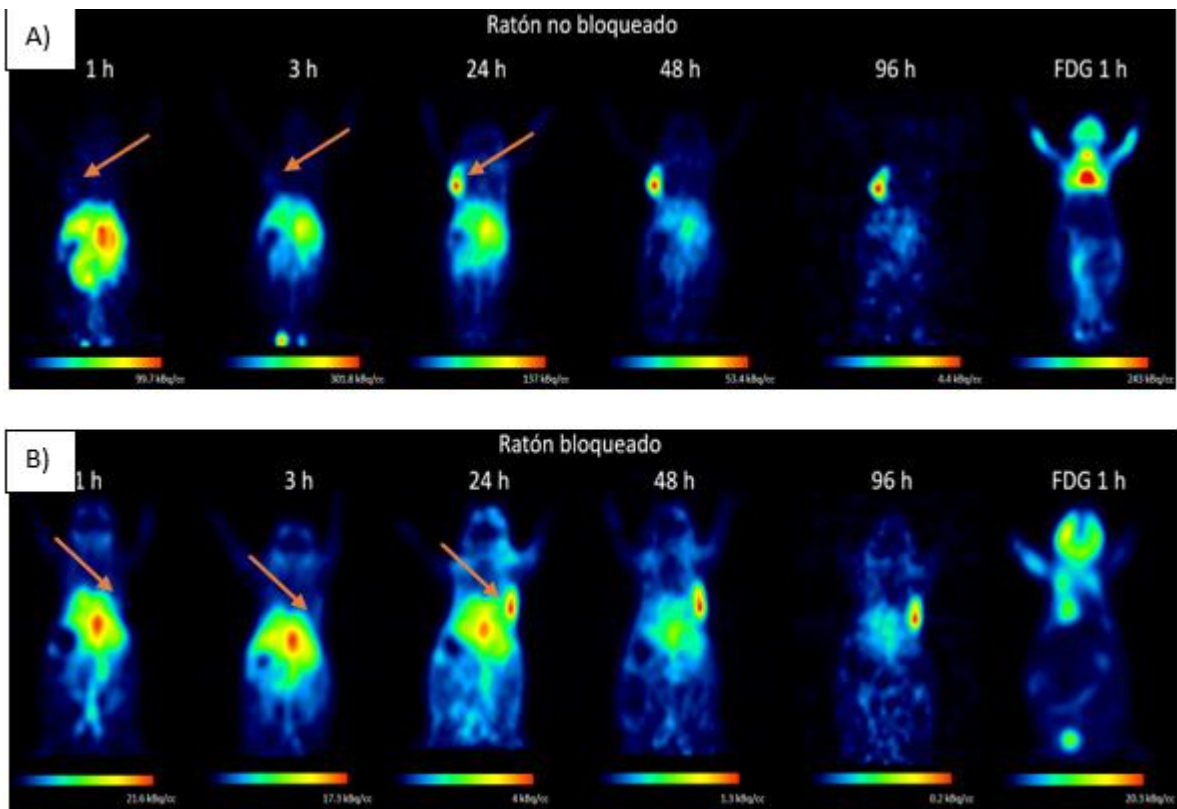


Figura 6.7. A) Biodistribución de ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab en un ratón no bloqueado a diferentes horas p.i. y la biodistribución de FDG a 40 min p.i, B) Biodistribución en un ratón bloqueado con 0.5 mg de NOTA-Trastuzumab 1 h antes de la inyección del radiofármaco y su biodistribución con FDG. Las flechas naranjas señalan la posición del tumor.

El tumor del ratón no bloqueado puede visualizarse fácilmente a partir de las 24 h p.i., teniendo el mejor contraste entre el tumor y el fondo a las 48 h p.i. A las 96 h prácticamente sólo se observa captación en el tumor, sin embargo, se tiene mucho ruido en la imagen. En el caso del hígado a las primeras horas p.i. es el órgano con mayor captación y a partir de las 24 h p.i. se puede observar una disminución de la concentración de actividad, ya a las 48 h y 96 h la captación es casi nula.

En el caso del ratón bloqueado aún es posible visualizar el tumor a partir de las 24 h p.i., pero en la cuantificación es donde se puede observar una diferencia entre el no bloqueado y el bloqueado al comparar sus $\%ID/g$ en el tumor, los cuales tienen un valor de $12.4 \pm 5.1 \%$ y $6.5 \pm 1.8 \%$ a 48 h p.i., respectivamente. Para el ratón

bloqueado el hígado se comporta de manera similar en las imágenes disminuyendo su captación a partir de las 24 h p.i.

En ambos casos los estudios microPET con FDG a 40 min p.i. no mostraron captación en el tumor lo que vuelve al ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab como un mejor candidato para identificar tumores HER2+. La captación de FDG que se observa en el cuello del ratón no bloqueado es debido a la grasa parda y se tiene captación en el cerebro por su alto consumo de glucosa.

Ya que aún se observó una captación del radiofármaco en los tumores de los ratones bloqueados con 0.5 mg de trastuzumab se decidió usar 1 mg 1 h antes de la administración del radiofármaco. La figura 6.8 muestra las biodistribuciones a distintos tiempos de un ratón no bloqueado y un ratón bloqueado con 1 mg de trastuzumab.

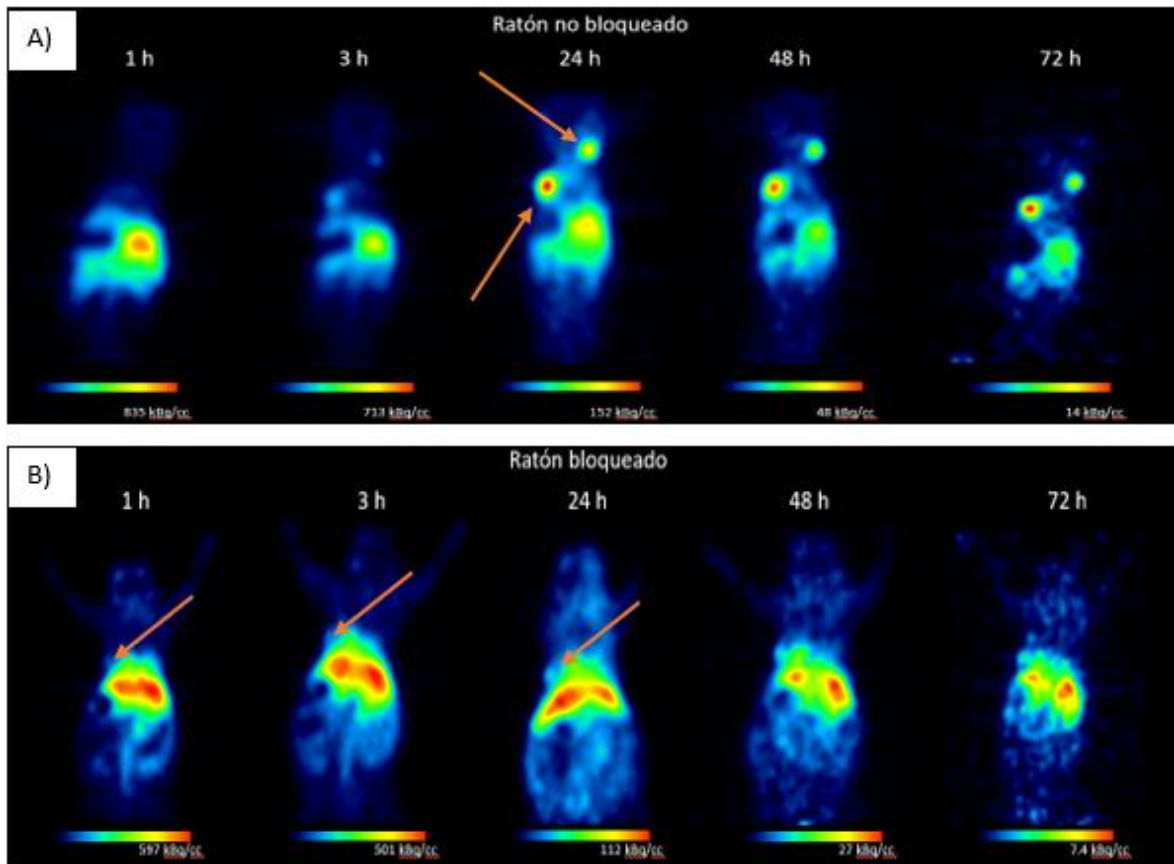


Figura 6.8. A) Biodistribución de ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab en un ratón no bloqueado a diferentes horas p.i. B) Biodistribución en un ratón bloqueado con 1 mg de NOTA-Trastuzumab 1 h antes de la inyección del radiofármaco. Las flechas naranjas señalan la posición del tumor.

Como se puede observar de la figura 6.8 el ratón no bloqueado tiene dos tumores, siendo el inferior izquierdo el tumor más grande. Esto puede ser debido a que en el momento de la inoculación una parte de las células no fueron colocadas en la posición correcta dando lugar al tumor superior más pequeño y posteriormente la inoculación correcta en el hombro del ratón (tumor inferior).

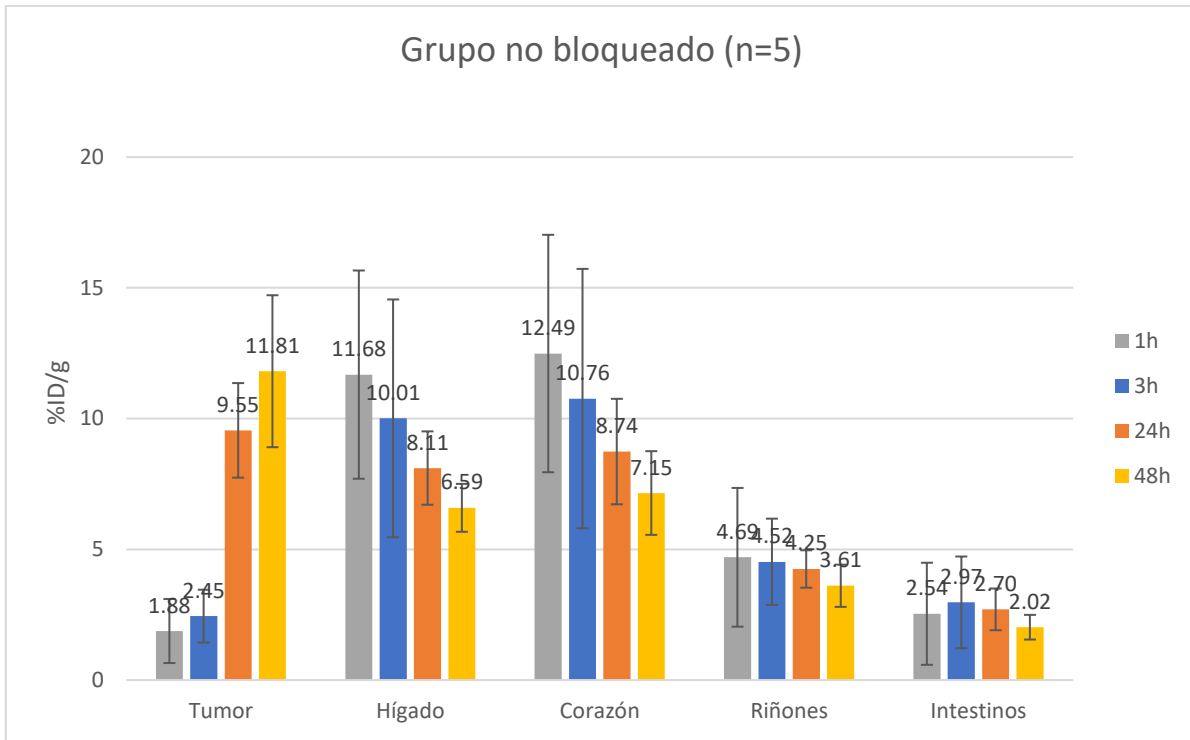
Igualmente, como en el grupo anterior, en el ratón no bloqueado se pueden observar fácilmente los tumores después de las 24 h p.i. En este grupo se adquirieron imágenes hasta 72 h p.i. y el contraste entre el tumor y el fondo es igualmente bueno a las 48 h p.i.

En este caso, el tumor del ratón bloqueado muestra una captación del radiofármaco mucho menor utilizando 1 mg de trastuzumab para bloquear los receptores HER2, por lo que esta cantidad sería la adecuada para futuros estudios preclínicos con este radiofármaco. Los $\%ID/g$ a las 48 h p.i. de los tumores en el ratón no bloqueado y en el bloqueado de la figura 6.8, dieron valores de $9.9 \pm 2.7 \%$ y $3.4 \pm 0.7 \%$, respectivamente, con lo que se puede confirmar que el tumor del ratón bloqueado tuvo una captación menor respecto al de la figura 6.7 el cual fue de $6.5 \pm 1.8 \%$.

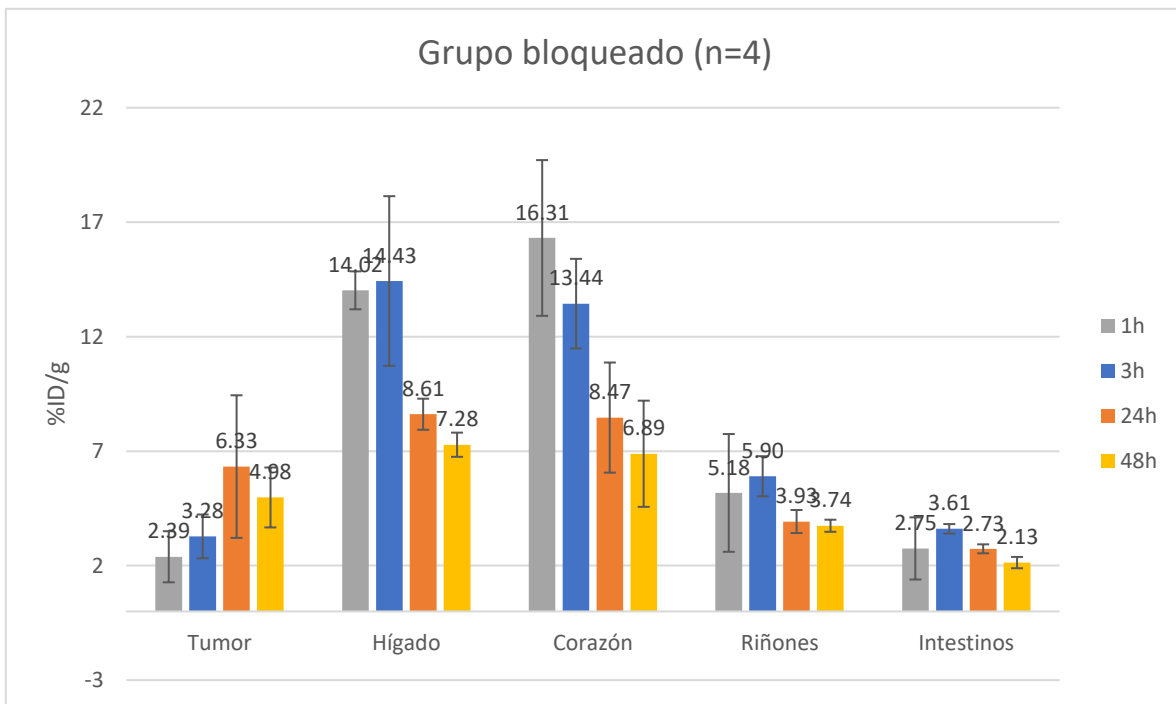
Los resultados obtenidos para los demás ratones del grupo bloqueado como del no bloqueado fueron similares a lo observado en las figuras 6.7 y 6.8.

6.6.2 Cuantificación

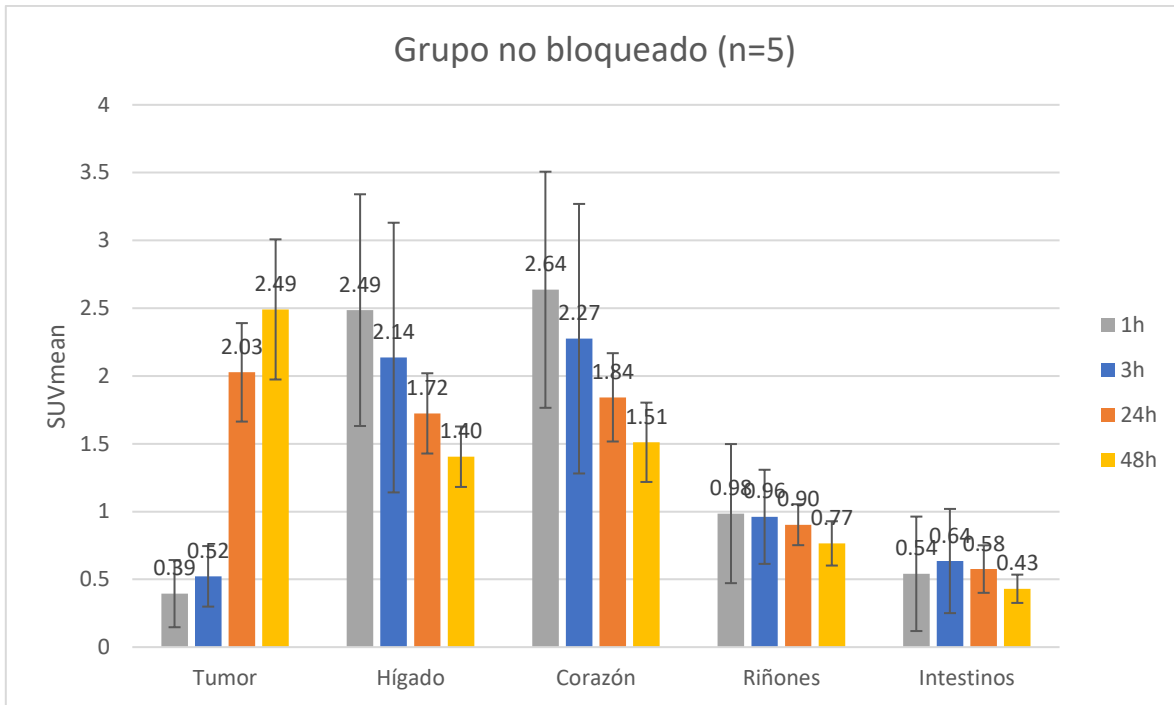
Se obtuvieron los $\%ID/g$ promedio para los grupos bloqueado y no bloqueado a distintos tiempos p.i. para el tumor, hígado, corazón, riñones e intestinos. Los $\%ID/g$ promedio se observan en las gráficas 6.1 y 6.2. En el caso del grupo bloqueado se promediaron los $\%ID/g$ de los ratones bloqueados con 0.5 y 1 mg de trastuzumab. También se calculó el SUV_{mean} el cual se reporta en las gráficas 6.3 y 6.4.



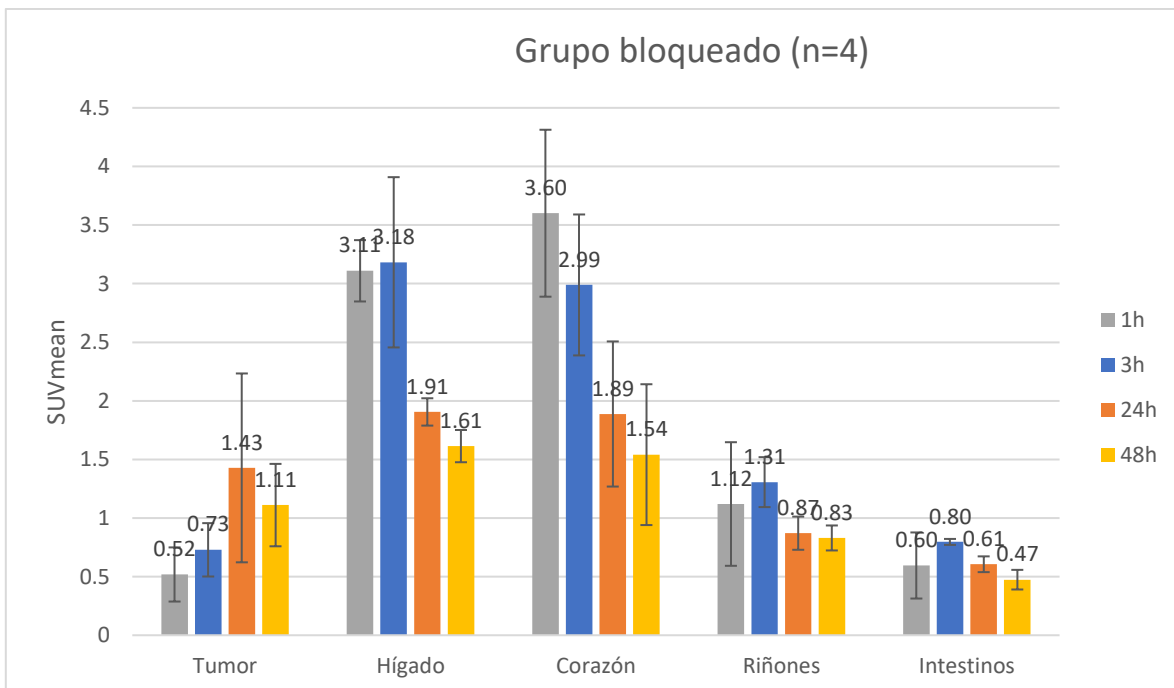
Gráfica 6.1. %ID/g promedio (^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab) del tumor y órganos a distintos tiempos post inyección para el grupo no bloqueado.



Gráfica 6.2. %ID/g promedio (^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab) del tumor y órganos a distintos tiempos post inyección para el grupo bloqueado.



Gráfica 6.3. SUV_{mean} (^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab) del tumor y órganos a distintos tiempos post inyección para el grupo no bloqueado.



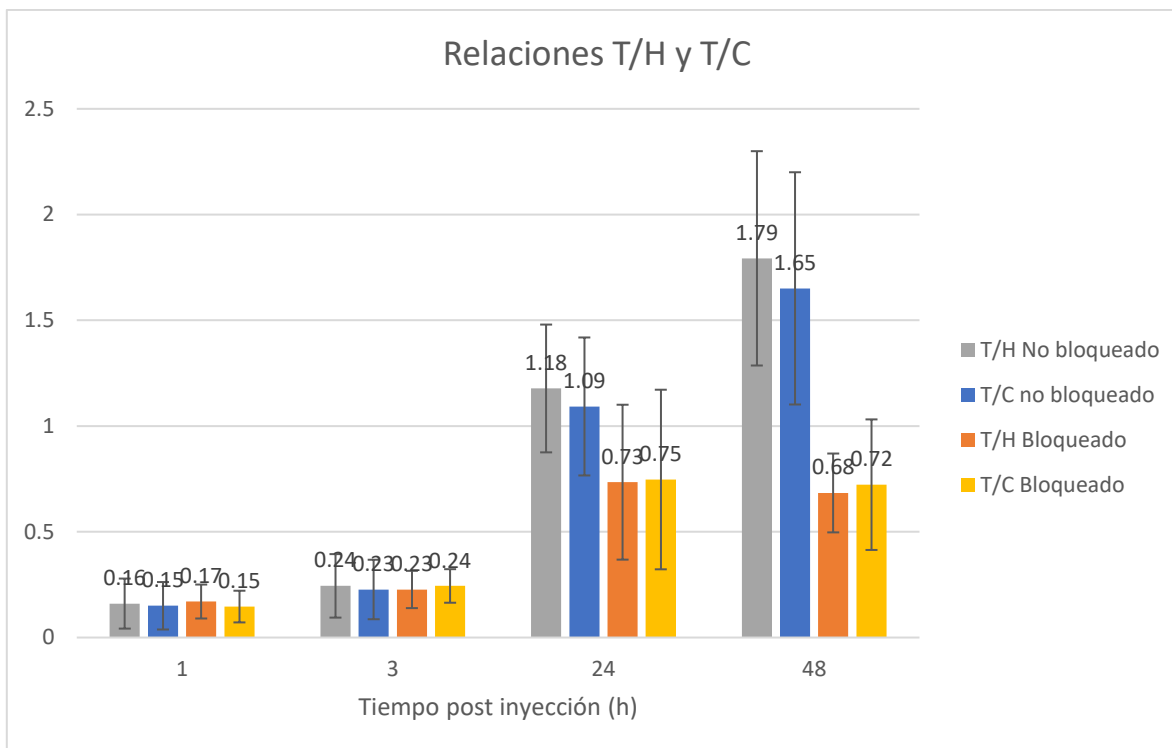
Gráfica 6.4. SUV_{mean} (^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab) del tumor y órganos a distintos tiempos post inyección para el grupo bloqueado.

Los valores del $\%ID/g$ para el tumor muestran una clara diferencia a las 24 h y 48 h p.i. entre el grupo no bloqueado y el bloqueado teniendo una relación de los $\%ID/g$ de 1.5 y 2.4 a las 24 h y 48 h (p.i.), respectivamente. Para el tumor a 24 h y 48 h p.i. entre el grupo no bloqueado y bloqueado se obtuvieron valores P mediante la prueba T de Student de 0.05 y 0.003, respectivamente, con lo que se puede considerar en ambos casos una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos. También se observa para el tumor del grupo no bloqueado que se tiene una tendencia de incremento del $\%ID/g$ y el SUV_{mean} conforme aumenta el tiempo p.i. llegando a un máximo a las 48 h, que es consistente con lo reportado en otros estudios [66], [67].

En el caso del hígado y el corazón tanto para el grupo no bloqueado como para el bloqueado se observa una disminución de la captación con el tiempo. En el caso del grupo bloqueado los valores del $\%ID/g$ a las primeras horas es ligeramente mayor pero los valores P obtenidos mediante la prueba T de Student no dieron resultados para considerar esta diferencia estadísticamente relevante, lo que da soporte a la captación específica del radiofármaco en los tumores HER2+.

Los intestinos y los riñones mostraron un $\%ID/g$ constante en el tiempo y no se observaron diferencias entre el grupo no bloqueado del bloqueado.

También se calcularon las relaciones del $\%ID/g$ tumor/hígado y tumor/corazón para cuantificar el contraste que se tiene del tumor en las imágenes con respecto a los órganos que mostraron una mayor captación del radiofármaco. Los resultados se muestran en la gráfica 6.5.



Gráfica 6.5. Relaciones tumor/hígado (T/H) y tumor/corazón (T/C) de los grupos de ratones no bloqueados y bloqueados a diferentes tiempos post inyección.

En este caso la relación T/H a 24 h y 48 h p.i. entre ambos grupos dio un valor $P < 0.05$, y en el caso de T/C sólo a las 48 h p.i. se obtuvo un valor $P < 0.05$. Las relaciones entre T/H y T/C entre el grupo bloqueado y no bloqueado dan valores de 2.63 y 2.3 respectivamente a las 48 h.

Las relaciones de contraste son importantes ya que en un futuro si el ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab es utilizado en el diagnóstico de pacientes con cáncer de mama HER2+ con sospecha de metástasis, se podrá observar la captación del radiofármaco cuando exista posible presencia de metástasis en hígado, esto a las 48 h (p.i.) lo que concuerda con lo reportado en la literatura [46], [66], [67].

La tabla 6.5 resume los valores P obtenidos para los casos relevantes mencionados.

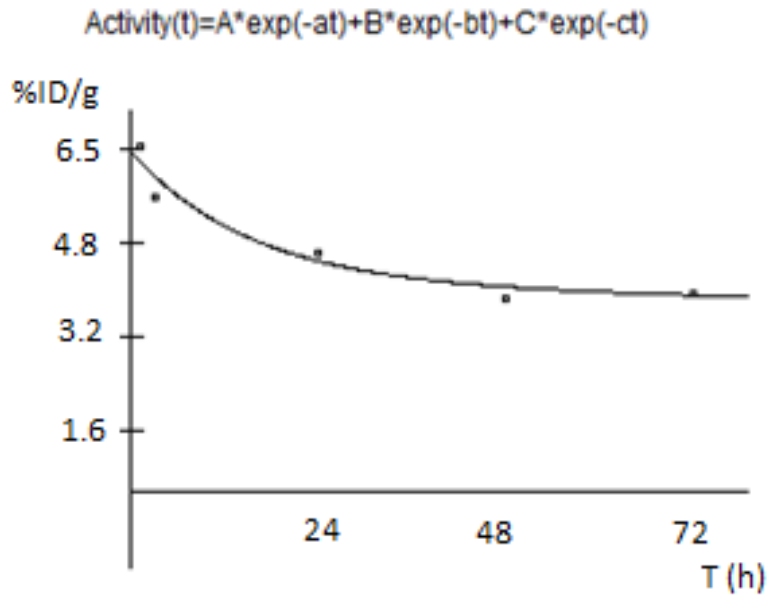
Tabla 6.5. Valores P entre los grupos de ratones no bloqueados (NB) y bloqueados (B) para distintos casos.

Valor P			
%ID/g (NB vs B)		Relaciones de contraste (NB vs B)	
Tumor		T/H	
24 h	0.05	24 h	0.04
48 h	0.003	48 h	0.0045
Hígado		T/C	
1 h	0.28	24 h	0.1
3 h	0.16	48 h	0.02
Corazón			
1 h	0.2		
3 h	0.35		

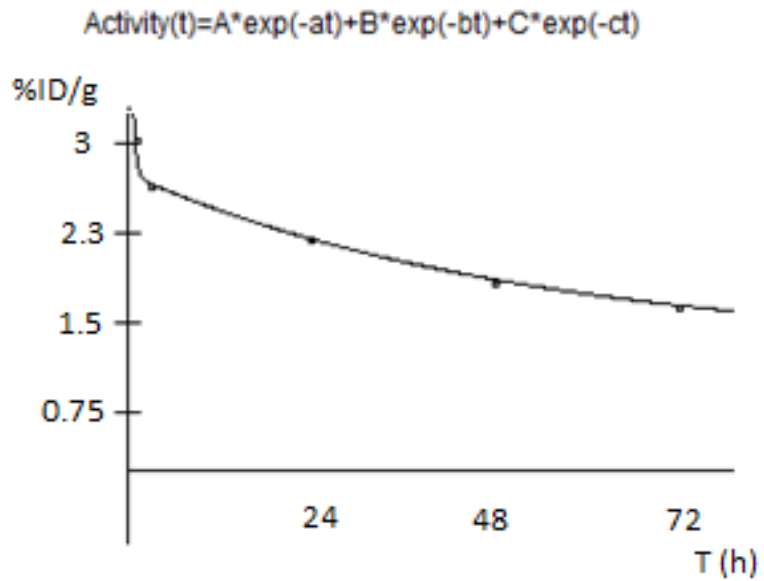
Con estos resultados se puede confirmar que el radiofármaco es específico para tumores que sobre-expresen el receptor HER2 ya que el método del bloqueo de receptores reduce su captación en el tumor. También se obtienen resultados similares a otras investigaciones en las que se ha encontrado que a 48 h p.i. el tumor alcanza su máxima captación y es cuando se obtienen las imágenes con el contraste más alto entre el tumor y los órganos con alta captación [46], [66], [67].

6.6.3 Dosimetría interna

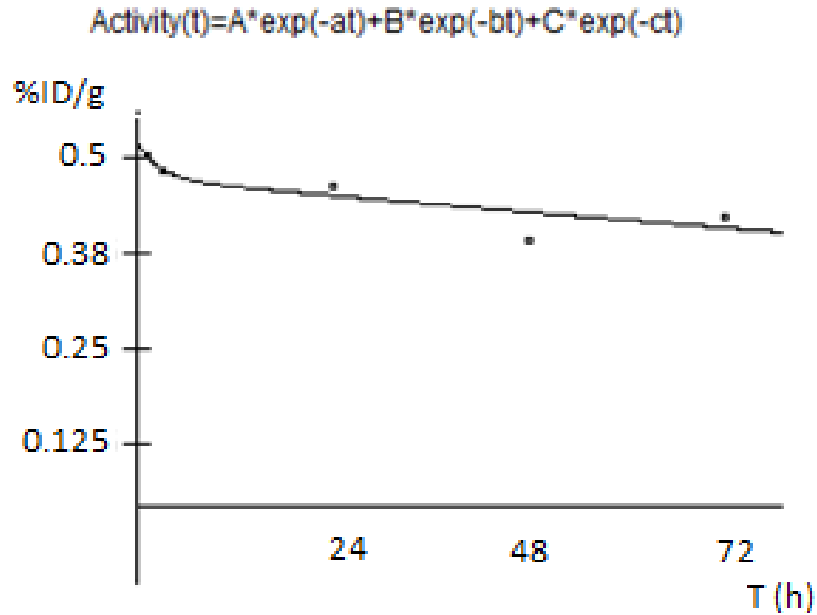
El software OLINDA/EXM generó las curvas mostradas en las gráficas 6.6, 6.7 y 6.7.



Gráfica 6.6. Curva de ajuste del %ID/g del hígado, para la determinación de la actividad acumulada obtenida en OLINDA/EXM.



Gráfica 6.7. Curva de ajuste del %ID/g del corazón, para la determinación de la actividad acumulada obtenida en OLINDA/EXM.



Gráfica 6.8. Curva de ajuste del %ID/g de los riñones, para la determinación de la actividad acumulada obtenida en OLINDA/EXM.

Integrando las curvas de ajuste del $\left(\frac{\%ID}{\text{órgano}}\right)$ para el hígado, corazón, riñones y considerando que el resto de la actividad está homogéneamente distribuida en el resto del cuerpo se obtuvieron las actividades acumuladas de la tabla 6.6. Como se puede observar en la gráfica 6.1 el valor del %ID/g para intestinos se mantuvo aproximadamente constante en el tiempo, con un valor de $\left(\frac{\%ID}{g}\right)_{\text{Intestinos}_{\text{ratón}}} = 2.6\%$ en promedio, por lo que se consideró un $\left(\frac{\%ID}{\text{intestino}}\right)_{\text{humano}} = 0.98\%$ para el modelo.

Tabla 6.6. Actividades acumuladas por unidad de actividad inyectada obtenidas en OLINDA/EXM en distintos órganos y el resto del cuerpo.

Órgano	Actividad acumulada por actividad inyectada (MBq-h/MBq)
Corazón	0.403
Riñones	0.076
Hígado	0.818
Intestino grueso inferior	0.045
Intestino grueso superior	0.061
Intestino delgado	0.032
Resto del Cuerpo	16.8

Con estos valores se calculó la predicción de dosis en mujeres para este radiofármaco. Los valores de dosis en los distintos órganos y la dosis efectiva se reportan en la tabla 6.7.

Tabla 6.7. Predicción de dosis en mujeres obtenida en OLINDA/EXM extrapolando de la biodistribución en ratones.

Órgano	Dosis ($\mu\text{Gy}/\text{MBq}$)
Glándulas suprarrenales	36.8 ± 0.2
Cerebro	30.7 ± 0.2
Senos	30.4 ± 1.5
Pared de la vesícula biliar	36.8 ± 0.1
Pared del Intestino grueso inferior	48.8 ± 5.8
Intestino delgado	36.9 ± 0.2
Pared estomacal	35.7 ± 4.3
Pared del Intestino grueso superior	46.1 ± 0.2
Pared cardiaca	14.3 ± 0.1
Riñones	33.3 ± 0.2
Hígado	59.9 ± 2.9
Pulmones	34.3 ± 4.1
Músculo	32.3 ± 0.2
Ovarios	35.8 ± 7.2
Páncreas	37.6 ± 0.2
Médula ósea roja	27.4 ± 3.3
Células osteogénicas	70.6 ± 0.7
Piel	28.5 ± 0.3
Bazo	34.8 ± 0.2
Timo	34.9 ± 0.2
Tiroides	31.9 ± 1.6
Pared de la vejiga	32.1 ± 1.6
Útero	35.7 ± 0.2
Cuerpo entero	34.2 ± 0.9
Dosis efectiva ($\mu\text{Sv}/\text{MBq}$)	35.2 ± 1.1

Los valores obtenidos se pueden comparar con los resultados de otros estudios. Woo S. junto con un equipo de trabajo [37] realizaron estudios preclínicos para el ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab en roedores portadores de tumores BT-474 HER2+, en los cuales obtuvieron que la captación del radiofármaco alcanzó su máximo a las 48 h post inyección y por lo tanto un mejor contraste tumor-sangre. Entre sus resultados reportan una dosis absorbida en corazón de $0.048 \frac{\text{mGy}}{\text{MBq}}$, en hígado de $0.079 \frac{\text{mGy}}{\text{MBq}}$, para el bazo de $0.047 \frac{\text{mGy}}{\text{MBq}}$ y de $2.43 \pm 1.09 \frac{\text{mGy}}{\text{MBq}}$ en tumor.

Se han realizado algunos estudios clínicos utilizando trastuzumab radiomarcado con ^{64}Cu . Uno de los primeros estudió la biodistribución y farmacocinética del ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2+ con o sin metástasis [46]. En el estudio se tomaron imágenes PET a 1, 24 y 48 h post inyección de $126 \pm 8 \text{ MBq}$ del radiofármaco obteniendo que el tiempo óptimo para su imagen es a las 48 h, semejantes a los resultados del estudio preclínico de Woo S.K. [37]. La dosis efectiva calculada fue de $0.036 \pm 0.009 \frac{\text{mSv}}{\text{MBq}}$ la cual, considerando la cantidad de actividad inyectada, da como resultado una dosis efectiva menor que la de un estudio PET con FDG. La dosis absorbida en los órganos para los estudios con ^{64}Cu y trastuzumab reportados en la literatura se resume en la tabla 6.8.

Otro estudio utilizó el ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab para detectar y medir la captación del radiofármaco en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama metastásico HER2+. Los resultados de la dosis depositada en los distintos órganos y la dosis efectiva se muestran en la tabla 6.8. En el estudio se comparó la sensibilidad para detectar lesiones metastásicas previamente identificadas por imagen CT, en las imágenes obtenidas 24 h p.i. se obtuvo una sensibilidad del 77%, y del 89% a las 48 h, mientras que para el FDG es del 93%, resultando ser un buen radiofármaco para detectar y medir lesiones metastásicas diseminadas [66].

Lee I. et al. [67] en un estudio reciente evaluaron el radiofármaco utilizado en este proyecto (^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab) en pacientes con cáncer de mama HER2+ mediante imagen PET. Al igual que en los estudios previos se encontró que el mejor cociente tumor-sangre se da a las 48 h post inyección y la dosis absorbida en los

órganos sanos (tabla 6.8) resultó ser menor que para el radiofármaco ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab. Se concluye que el radiofármaco tiene una captación específica en los tumores HER2+ y que podría ser utilizado como herramienta para evaluar el estado de los tumores y respuesta a terapia para las pacientes con cáncer de mama HER2+.

La tabla 6.8 resume las dosis en los órganos con mayor absorción y la dosis efectiva de este estudio y los diferentes estudios reportados en la literatura.

Tabla 6.8. Comparación de las dosis absorbidas en órganos y dosis efectiva de distintos estudios y el realizado en este proyecto.

Radiofármaco	^{64}Cu-NOTA-Trastuzumab [67]	^{64}Cu-DOTA-Trastuzumab [46]	^{64}Cu-DOTA-Trastuzumab [66]	^{64}Cu-NOTA-Trastuzumab (este estudio)
Órgano	Dosis absorbida ($\frac{\mu\text{Gy}}{\text{MBq}}$)			
Suprarrenales	50 ± 1	31 ± 4		36.8 ± 0.2
Pared cardíaca	42 ± 8	34.0 ± 4.6	160	14.3 ± 0.1
Riñones	44 ± 9	103 ± 34	90	33.3 ± 0.2
Hígado	76 ± 7	237 ± 117	120	59.9 ± 2.9
Pulmones	34 ± 4	57 ± 70		34.3 ± 4.1
Bazo	63 ± 10	142 ± 40	100	34.8 ± 0.2
Dosis efectiva ($\mu\text{Sv}/\text{MBq}$)	10 ± 1	36 ± 9	30	35.2 ± 1.1

La dosis absorbida en las glándulas suprarrenales y pulmones en este proyecto son similares a las obtenidas en estudios con el mismo radiofármaco. La dosis en la pared cardíaca e hígado fueron las más bajas respecto a los demás estudios. Se obtuvo una dosis efectiva mayor al estudio que utilizó el agente quelante NOTA y similar a los que utilizaron DOTA.

En este estudio se obtuvieron dosis absorbidas en corazón e hígado más bajas respecto a los demás, lo cual es de suma importancia ya que el radiofármaco es procesado por la vía hepatobiliar y tiene una alta captación en corazón debido a que el tejido del corazón tiene una expresión importante de receptores HER2.

El agente quelante NOTA ha demostrado reducir la dosis absorbida en los órganos y la dosis efectiva respecto al quelante DOTA por lo que lo hace un mejor candidato para su uso en estudios clínicos. Si se administra el radiofármaco en estudios clínicos con una actividad de 185 MBq la dosis absorbida en la pared cardíaca, hígado y la dosis efectiva serían de 2.6, 11.1 mGy y 6.5 mSv, respectivamente sin considerar la dosis absorbida aportada por el estudio CT. La dosis efectiva sería similar a los valores reportados para estudios con FDG [68], por lo que se considera un radiofármaco seguro para su uso en estudios clínicos de diagnóstico.

Conclusiones

Se logró realizar la electrodeposición del níquel enriquecido al 99.53% (^{64}Ni) adecuadamente sobre un disco de oro hiperpuro con un mínimo remanente en la solución. También se recuperó satisfactoriamente el ^{64}Ni de separaciones radioquímicas previas para utilizarlo en nuevas electrodeposiciones, con lo que se reducen los costos de producción de radiofármacos con ^{64}Cu , producido mediante la reacción nuclear $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$. La evaporación de la solución recuperada de ^{64}Ni dio una alta eficiencia de recuperación ($> 95\%$) y con ello es posible reciclar varias veces el ^{64}Ni utilizado en cada experimento.

Con los parámetros utilizados durante el bombardeo del blanco se obtuvieron actividades de ^{64}Cu adecuadas para terminar con una actividad suficiente del radiofármaco después de realizar el proceso de separación radioquímica, purificación por cromatografía y poder realizar los estudios preclínicos.

En la purificación radioquímica la temperatura en el bloque de disolución fue la adecuada para disolver el blanco en HCl 10.4M y extraer la solución del disco de oro. Se lograron separar correctamente el ^{64}Ni , ^{61}Co y ^{64}Cu y recuperar eficientemente el ^{64}Ni para su reutilización. También, se redujo la contaminación del ^{61}Co al mínimo separándolo en un vial de desecho que puede dejarse en un blindaje para su decaimiento. Los detectores del módulo Trasis miniAiO fueron de utilidad para identificar cuando colectar el ^{64}Cu en el reactor de evaporación y así reducir la cantidad de HCl 0.1M a evaporar, reduciendo el tiempo necesario.

Utilizando 5 mg de NOTA-Benzoil-NCS-Trastuzumab, 1.5 ml de búfer y 60 min de incubación se obtuvieron rendimientos de marcado del 20-30% con lo que se encontró que la principal razón del bajo rendimiento de marcado eran las impurezas en ppm del $^{\text{nat}}\text{Cu}$ que se encontraban en el ^{64}Ni enriquecido, el cual fue utilizado sin pasar por un proceso de separación radioquímica previo. Con esto se concluye que entre mayor cantidad de separaciones radioquímicas y recuperaciones de ^{64}Ni consecutivas se realicen, las ppm de $^{\text{nat}}\text{Cu}$ disminuyen y con ello se obtienen mejores rendimientos de marcado.

Se estableció un método para aumentar satisfactoriamente la pureza radioquímica del radiofármaco mediante una purificación vía cromatografía por exclusión de tamaño. Mediante este proceso se elevó la pureza radioquímica de 20% a >90%. Las desventajas de realizar este proceso son el tiempo consumido (de 1 h a 2 h), la pérdida de actividad obtenida después del radiomarcado.

Durante los estudios preclínicos se encontró que 1 mg de trastuzumab sin radiomarcado es suficiente para bloquear correctamente los receptores HER2 de los tumores en los ratones. Con ello se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de ratones no bloqueado del grupo bloqueado. Con estos resultados se puede asegurar que el ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab es específico a tumores HER2+ ya que el método del bloqueo de receptores reduce considerablemente su captación en dichos tumores. También se encontró que 48 h p.i. es el tiempo más adecuado para visualizar la captación en el tumor teniendo el mejor contraste entre el hígado y el corazón, por lo que se podrían visualizar metástasis en hígado. Las imágenes a 96 h p.i. dieron una biodistribución en donde sólo se apreciaba captación del radiofármaco en el tumor, sin embargo, se requeriría una actividad inyectada mayor a la utilizada en este proyecto para obtener mejores imágenes a estos tiempos.

En el escalamiento de dosis a humanos se obtuvieron valores de dosis efectiva semejantes a estudios previos con ^{64}Cu y trastuzumab, obteniendo una dosis absorbida menor en los órganos con mayor captación, como los son el corazón y el hígado, en comparación con dichos estudios. En las predicciones de este estudio los órganos con mayor captación fueron las células osteogénicas ($70.6 \pm 0.7 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{MBq}}$), el hígado ($59.9 \pm 2.9 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{MBq}}$), la pared del intestino grueso inferior ($48.8 \pm 5.8 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{MBq}}$) y la pared del intestino grueso superior ($46.1 \pm 0.2 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{MBq}}$).

Con los resultados obtenidos se comprobó la utilidad del ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab para la evaluación específica de tumores HER2+ y su posible uso clínicamente para seleccionar a las mejores candidatas para una terapia con trastuzumab, con una dosis efectiva semejante a un estudio con FDG y con la ventaja de que, una vez

producido el radiofármaco, puede ser transportado a distintos estados de la república mexicana que cuenten con equipos PET o PET/CT.

Bibliografía

- [1] Gobierno de México, “Estadísticas sobre cáncer de mama,” 2014. <http://www.infocancer.org.mx/?c=cancer-cifras&a=estadisticas-cancer-mama-2014> (accessed Jul. 19, 2020).
- [2] National Breast Cancer Foundation, “Breast Anatomy - National Breast Cancer Foundation,” 2012. <http://www.nationalbreastcancer.org/breastanatomy>. (accessed Jul. 19, 2020).
- [3] J. . Shackney S. E. and Silverman, “Molecular evolutionary patterns in breast cancer,” *Adv. Anat. Pathol.*, vol. 10, pp. 278–290, 2003.
- [4] National Cancer Institute, “Breast Cancer Treatment (Adult) (PDQ®)—Health Professional Version,” *Bethesda, MD: National Cancer Institute*, 2020. .
- [5] Morgentern Kaplan D. and Aceves Díaz S., “Efectos del trastuzumab como terapia coadyuvante para pacientes con cáncer de mama HER2 positivo: Una revisión sistemática,” *Arch. Med.*, vol. 13, no. 3, 2017.
- [6] Harold J. Burstein, “The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers,” *N Engl J Med*, vol. 353, no. 16, p. 3, 2005.
- [7] Zahi Mitri et al., “The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy,” *Chemother. Res. Pract.*, vol. 2012, p. 7, 2012, doi: 10.1155/2012/743193.
- [8] Caterina Marchio et al., “Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 72, pp. 123–135, 2021, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.02.016.
- [9] Gary A. Ulaner et al., “Detection of HER2-Positive Metastases in Patients with HER2-Negative Primary Breast Cancer Using 89Zr-Trastuzumab PET/CT,” *J. Nucl. Med.*, vol. 57, no. 10, pp. 1523–1528, 2016, doi: 10.2967/jnumed.115.172031.
- [10] Naoki Niikura et al., “Loss of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Expression in Metastatic Sites of HER2-Overexpressing Primary

- Breast Tumors,” *J Clin Oncol*, vol. 30, no. 6, pp. 593–599, 2012, doi: 10.1200/JCO.2010.33.8889.
- [11] Breastcancer, “HER2 status,” 2019. <https://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/her2> (accessed Aug. 18, 2020).
- [12] Machado N. et al., “Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas,” *Asoc. Colomb. infectología*, p. 12, 2006.
- [13] A. García Merino, “Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos,” *Neurología*, vol. 26, no. 5, pp. 301–306, 2011, doi: 10.1016/j.nrl.2010.10.005.
- [14] Thuy Vu et al., “Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer,” *Front Oncol*, vol. 2, no. 62, p. 6, 2012, doi: 10.3389/fonc.2012.00062.
- [15] Soumaya Labidi et al., “Targeted Therapies in HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer,” *Breast Care*, p. 5, 2016, doi: 10.1159/000452194.
- [16] Nishant Mohan et al., “Trastuzumab-mediated cardiotoxicity: current understanding, challenges, and frontiers,” *Antib Ther*, vol. 1, no. 1, pp. 13–17, 2018, doi: 10.1093/abt/tby003.
- [17] Slamon D J et al., “Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2,” *N Engl J Med*, vol. 344, no. 11, pp. 783–792, 2001, doi: 10.1056/NEJM200103153441101.
- [18] Michael S. Ewer et al., “Cardiac Toxicity of Trastuzumab-Related Regimens in HER2-Overexpressing Breast Cancer,” *Clin. Breast Cancer*, vol. 7, no. 8, pp. 600–607, 2007, doi: 10.3816/CBC.2007.n.017.
- [19] Maria Luque Cabal et al., “Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It,” *Clin Med Insights Oncol*, vol. 10, pp. 21–30, 2016, doi: 10.4137/CMO.S34537.
- [20] Blázquez A. et al., “Trastuzumab. Informe para la comisión de farmacia y terapéutica del hospital Cabueñes,” *Hosp. Cabueñes*, p. 11, 2008.
- [21] Simon R. Cherry, *Physics in Nuclear Medicine*. Elsevier, 2012.

- [22] Roldán E. et al., “). Conceptos básicos del 18F-FDG PET/CT . Definición y variantes normales,” *Gac Méd Méx*, vol. 144, no. 2, p. 10, 2008.
- [23] Gutfilen B., “Copper-64 a real theranostic agent,” *Dep. Radiol. Univ. Fed. do Rio Janeiro*, 2018, doi: 10.2147/DDDT.D170879.
- [24] Pozzi O., “Desarrollo de nuevos radioisótopos emisores de positrones, Cobre-64,” *Cent. Atómico Ezeiza, CNEA*, p. 1.
- [25] Carolyn J. Anderson and Ricardo Ferdani, “Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: Advances in preclinical and clinical research.,” *Cancer Biother Radiopharm*, vol. 24, no. 4, pp. 379–393, 2009.
- [26] D. Sarko et al., “Bifunctional Chelators in the Design and Application of Radiopharmaceuticals for Oncological Diseases,” *Curren Med. Chem.*, vol. 19, pp. 2667–2688, 2012.
- [27] Elisa Leyva Ramos et al., “Agentes quelantes bifuncionales utilizados en la síntesis de radiofármacos,” *Rev. Mex. Ciencias*, vol. 44, no. 1, p. 17, 2012.
- [28] Boom Ting Kung et al., “An update on the role of 18F-FDG-PET/CT in major infectious and inflammatory diseases,” *Am J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 9, no. 6, pp. 255–273, 2019.
- [29] Eglé Kazakauskaitė et al., “Positron Emission Tomography in the Diagnosis and Management of Coronary Artery Disease,” *Med.*, vol. 54, no. 3, 2018, doi: 10.3390/medicina54030047.
- [30] Charles Marcus et al., “Brain PET in the Diagnosis of Alzheimer’s Disease,” *Clin Nucl Med*, vol. 39, no. 10, pp. 413–426, 2014, doi: 10.1097/RLU.0000000000000547.
- [31] Dennis J. Slamon et al., “Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2,” *N Engl J Med*, vol. 344, pp. 783–792, 2001, doi: 10.1056/NEJM200103153441101.
- [32] Nicholas Rober et al., “Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer,” *J Clin Oncol*, vol. 24, no. 18,

pp. 2786–2792, 2006, doi: 10.1200/JCO.2005.04.1764.

- [33] Helena M. Earl et al., “6 versus 12 months of adjuvant trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (PERSEPHONE): 4-year disease-free survival results of a randomised phase 3 non-inferiority trial,” *Lancet*, vol. 393, no. 10191, pp. 2599–2612, 2019, doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30650-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30650-6).
- [34] Swain S. et al., “Pertuzumab, Trastuzumab an Docetaxel in HER2 positive metastatic breast cancer,” *N Engl J Med*, vol. 372, pp. 724–734, 2015.
- [35] Cai W. et al., “Quantitative PET for EGFR expression in xenograft-bearing mmice using ^{64}Cu labeled cetuximab, a chimeric anti-EGFR monoclonal antibody,” *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 34, no. 6, pp. 850–858, 2007.
- [36] Paudyal B., “Positron emisión tomography imaging and biodistribution of vascular endothelial growth factor with $^{64}\text{-Cu}$ labeled bevacizumab in colorectal cancer xenografts.,” *Cancer sci.*, vol. 102, no. 1, pp. 117–121, 2010, doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01763.x.
- [37] Woo S. K., “Development of ^{64}Cu -NOTA-trastuzumab for HER2 Targeting: A radiopharmaceutica with improved pharmacokinetics for human studies,” *J. Nucl. Med.*, vol. 60, pp. 26–33, 2019.
- [38] Manrique J. and Ávila M., “A simple and efficient method of nickel electrodeposition for the cyclotron production of ^{64}Cu ,” *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 89, pp. 37–41, 2014, doi: 10.1016/j.apradiso.2014.01.024.
- [39] Ávila M., “Simultaneous production of high specific activity ^{64}Cu and ^{61}Co with 11.4 MeV protons on enriched ^{64}Ni nuclei,” *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 65, pp. 1115–1120, 2007, doi: 10.1016/j.apradiso.2007.05.012.
- [40] Sofia Maximiano, Paulo Magalhaes, Mara Pereira, Manuel Morgado, “Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer,” *Biodrugs*, p. 12, 2016, doi: 0.1007/s40259-016-0162-9.
- [41] European Medicines Agency, “Summary of product characteristics: Herceptin.” https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/herceptin-epar-product-information_en.pdf (accessed Jan. 14,

2020).

- [42] Zagouri F et al., "Intrathecal administration of trastuzumab for the treatment of meningeal carcinomatosis in HER2- positive metastatic breast cancer: a systematic review and pooled analysis.," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 139, pp. 13–22, 2013.
- [43] Patil A et al., "Therapeutic approach to the management of HER2-positive breast cancer metastatic to the brain.," *Cancer Lett*, no. 358, pp. 93–99, 2015.
- [44] Ankit I. Adam M. and John H., "Therapeutic approaches for HER2-positive brain metastases: Circumventing the blood-brain barrier," *Cancer treat rev.*, vol. 39, no. 3, pp. 261–269, 2013, doi: 10.1016/j.ctrv.2012.05.006.
- [45] Quin Ren et al., "Improved Immuno-PET Imaging of HER2-Positive Tumors in Mice: Urokinase Injection-Triggered Clearance Enhancement of ⁶⁴Cu-Trastuzumab," *Mol. Pharm.*, vol. 16, pp. 1065–1073, 2019.
- [46] Tamura K. et al., "⁶⁴Cu-DOTA-Trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer," *J. Nucl. Med.*, vol. 54, pp. 1869–1875, 2013, doi: 10.2967/jnumed.112.118612.
- [47] Alirezapour B. et al., "Optimized preparation and preliminary evaluation of [⁶⁴Cu]–DOTA–trastuzumab for targeting ErbB2/Neu expression," *J Radioanal Nucl Chem*, vol. 295, pp. 1261–1271, 2013, doi: 10.1007/s10967-012-1939-z.
- [48] Boekhout A.H., Beijnen J.H. and Schellens H.M., "Trastuzumab," *Oncologist*, vol. 16, pp. 800–811, 2011, doi: 10.1634/theoncologist.2010-0035.
- [49] Kwon L., Scollard D., Reilly R., "⁶⁴Cu-Labeled Trastuzumab Fab-PEG24-EGF Radioimmunoconjugates Bispecific for HER2 and EGFR –Pharmacokinetics, Biodistribution, and Tumor Imaging by PET in Comparison to Monospecific Agents," *Mol. Pharm.*, vol. 14, no. 2, pp. 492–501, 2017, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00963.
- [50] Bruno R. et al., "Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2+ metastatic breast cancer," *Cancer chemother pharmacol*, vol. 56, pp. 361–369, 2005, doi: 10.1007/s00280-005-1026-z.
- [51] Brian J. McParland, *Nuclear medicine radiation dosimetry. Advanced*

theoretical principles. Springer, 2010.

- [52] Donaldson HH, *The rat reference tables and data for the albino rat and the norway rat*, 2nd ed. Philadelphia, 1924.
- [53] Adelstein S. J. et al., "Report 67," *J. Int. Comm. Radiat. units Meas.*, vol. 2, no. 1, 2002, doi: 10.1093/jicru/2.1.Report67.
- [54] R. S. S. Craig R. White, "Allometric scaling of mammalian metabolism," *J. Exp. Biol.*, vol. 208, pp. 1611–1619, 2005, doi: 10.1242/jeb.01501.
- [55] Geoffrey B. et al., "Allometric scaling of metabolic rate from molecules and mitochondria to cells and mammals," *Los alamos Natl. Lab.*, vol. 99, pp. 2473–2478, 2002, doi: 10.1073pnas.012579799.
- [56] Leveque D., Gigou L. and Bergerat J.P., "Clinical pharmacology of trastuzumab," *Curr. Clin. Pharmacol.*, vol. 3, pp. 51–55, 2008.
- [57] Leyland B. et al., "Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel," *J. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 21, pp. 3965–3971, 2003, doi: 10.1200/JCO.2003.12.109.
- [58] Baselga J. et al., "Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule," *J Clin Oncol*, vol. 10, pp. 2162–2171, 2005.
- [59] Bernadou G. et al., "Influence of tumour burden on trastuzumab pharmacokinetics in HER2 positive non-metastatic breast cancer.," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 81, pp. 941–948, 2016, doi: 10.1111/bcp.12875.
- [60] ICRP, "ICRP 60, 1990 Recommendations of the international commission on radiological protection," *Ann. ICRP*, vol. 6, no. 1, p. 211, 1981, doi: 10.1016/0146-6453(81)90127-5.
- [61] ICRP, "Publicación 103 Las Recomendaciones 2007 de la Comisión Internacional de Protección Radiológica," 2007.
- [62] W. G. Snyder W, Ford M, "Estimates of Specific Absorbed Fractions for Photon Sources Uniformly Distributed in Various Organs of a Heterogeneous Phantom [MIRD Pamphlet No. 5 (revised)]," *Soc. Nucl. Med.*, 1978.
- [63] Kirschner et al., "Radiation dosimetry of ¹³¹I-19-iodocholesterol," *J. Nucl.*

Med., vol. 14, no. 9, pp. 713–717, 1973.

- [64] S. Miho, F. Yohihito, and W. Hiroshi, “Noninvasive estimation of human radiation dosimetry of ¹⁸F-FDG by whole-body small animal PET imaging in rats,” *Appl. Radiat. Isot.*, p. 5, 2022, doi: 10.1016/j.apradiso.2021.110071.
- [65] ICRP, “Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: Reference values – ICRP publication 89.,” 2002.
- [66] Mortimer J. et al., “Functional imaging of human epidermal growth factor receptor 2- positive metastatic breast cancer using ⁶⁴DOTA-Trastuzumab PET,” *J. Nucl. Med.*, vol. 55, pp. 23–29, 2014, doi: 10.2967/jnumed.113.122630.
- [67] Lee I. et al., “A preliminary clinical trial to evaluate ⁶⁴Cu-NOTA-Trastuzumab as a positron emission tomography imaging agent in patients with breast cancer,” *Res. Sq.*, p. 9, 2020, doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-48411/v2>.
- [68] Administration of Radioactive Substances Advisory Committee, “Notes for guidance on the clinical administration of radiopharmaceuticals and use of sealed radioactive sources.,” *Nucl Med Commun*, p. 77, 2022.

