



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
Ciencias Odontológicas Básicas: Biomateriales Dentales**

***Radiomarcaje y biodistribución del péptido BSP-4-23  
en ratones BALB/c***

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA  
**C.D. Isarai Mendieta Barrañón**

TUTORA  
**Dra. Janeth Serrano Bello / LABORATORIO DE BIOINGENIERÍA DE  
TEJIDOS, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA-UNAM**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Janeth Serrano Bello por el tiempo, dedicación y pasión que siempre comparte como docente. Gracias por el apoyo, entrega y profesionalismo para realizar este proyecto, por guiarme y compartirme sus conocimientos y, sobre todo por inspirar y motivar en la investigación.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y al Laboratorio de Biomateriales Dentales del Posgrado de Odontología de de la DEPeI de la UNAM por el apoyo con la infraestructura necesaria para realizar este proyecto.

Al Dr. Gerardo Julián Ramírez Nava, la Dra. Alejandra Ancira Cortez y a la Dra. Clara Leticia Santos Cuevas del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) del Departamento de Materiales Reactivos de la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud, por el apoyo, disposición, conocimientos e infraestructura para culminar el tiempo y forma este proyecto.

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México por ser parte de mi formación y crecimiento personal y profesional, además de permitirme desarrollar como deportista.

Al apoyo por parte del CONACyT a través del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación de tesis.

Al proyecto DGAPA-UNAM-PAPIIT-IN221020 y al proyecto DGAPA-UNAM-PAPIIT-IA207218 por el apoyo para llevar a cabo este trabajo.

*Quiero dedicar este trabajo a mis padres y hermanos  
que cada día me inspiran y motivan con  
sus palabras y compañía para  
continuar cumpliendo cada  
uno de mis sueños.*

*“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”.*

**-Marie Curie (1867 – 1934)**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
I. MARCO TEÓRICO .....	9
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
III. HIPÓTESIS .....	32
IV. OBJETIVOS.....	32
V. METODOLOGÍA Y DISEÑO .....	33
VI. RESULTADOS .....	39
VII. DISCUSIÓN.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	52
IX. PERSPECTIVAS .....	53
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad esquelética multifactorial y sistémica caracterizada por disminuir la Densidad Mineral Ósea (DMO), provocando una mayor fragilidad y derivando en fracturas. Actualmente, existen medicamentos aprobados por la FDA que aumentan la DMO, pero no disminuyen el riesgo de complicaciones, además de limitarse a un uso máximo de 24 meses debido a que ha reportado una pérdida ósea abrupta. Por ello, una alternativa es evaluar péptidos que se encuentren involucrados en el proceso de la remodelación ósea. Se estudió la biodistribución de BSP-4-23 mediante su radiomarcaje con  $^{99m}\text{Tc}$ . Se realizó marcaje indirecto con HYNIC para así asegurar el correcto ensamblaje del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23. Así mismo, con la HPLC y espectroscopia UV-Vis se confirmó que el porcentaje de pureza radioquímica (PRQ) fuera  $>95\%$  y, por tanto, adecuada para su posterior evaluación de la biodistribución en ratones BALB/c. Los ratones fueron administrados v.i. con el radioconjugado y evaluados a diferentes tiempos (0.5, 3 y 24 h). Se obtuvieron imágenes radioisotópicas donde se pudo observar que el radiomarcado perfundió de manera esperada los órganos principales (corazón, hígado, riñones, bazo) disminuyendo considerablemente el %/DI/g desde las 3.0 h posteriores a la administración. Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la técnica de marcaje indirecto con  $^{99m}\text{Tc}$  y HYNIC junto con los parámetros de reacción, la concentración de ligandos, la cantidad de  $\text{SnCl}_2$  y el pH, se puede asegurar una pureza del 99% en el bioconjugado. Así mismo, la biodistribución que siguió el radiomarcado fue en órganos con alto flujo sanguíneo, eliminándose principalmente por la vía renal. Con base en los datos obtenidos sobre la biodistribución de la BSP-4-23 nos da un nuevo panorama para continuar el estudio en un modelo de osteoporosis en rata.

## ABSTRACT

Osteoporosis is a multifactorial and systemic skeletal disease characterized by a decrease in Bone Mineral Density (BMD), causing greater fragility and resulting in fractures. Currently, there are FDA-approved medications that increase BMD but do not reduce the risk of complications, in addition to being limited to maximum use of 24 months because of the abrupt bone loss reported. Therefore, an alternative is to evaluate peptides involved in the bone remodeling process.

The biodistribution of BSP-4-23 was evaluated by radiolabelling with  $^{99m}\text{Tc}$ . Labeling was done with HYNIC to ensure the correct assembly of  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23. The radiochemical purity was  $>95\%$ , adequate for evaluating the biodistribution in BALB/c mice.

Mice administered i.v. with the radioconjugate and evaluated at different times (0.5, 3, and 24 h), Radioisotopic images showed that the radiolabel perfused the heart, liver, kidneys, and spleen. They were considerably decreasing the %/DI/g from 3.0 h after administration.

In conclusion, the  $^{99m}\text{Tc}$  and HYNIC labeling technique and the reaction parameters, ligand concentration, amount of  $\text{SnCl}_2$ , and pH, can ensure a correct radioconjugate with 99% purity.

The biodistribution followed in organs with high blood flow, eliminated mainly through the kidneys. The data obtained on the biodistribution of BSP-4-23 gives us a new perspective to continue the study in a rat model of osteoporosis.



## INTRODUCCIÓN

La osteoporosis se define como una enfermedad multifactorial y generalizada del sistema esquelético, se caracteriza por la pérdida de densidad mineral ósea y el deterioro de su microestructura, comprometiendo la resistencia y ocasionando una mayor fragilidad a nivel óseo<sup>(1)</sup>. Hoy en día no se ha logrado desarrollar tratamientos que sean efectivos y sin complicaciones para esta enfermedad, por lo cual, una alternativa muy prometedora es trabajar con péptidos involucrados en el proceso de mineralización ósea<sup>(1)</sup>. Una de las proteínas más estudiadas por su relación en la formación y remodelación del tejido óseo, es la Sialoproteína Ósea o BSP por sus siglas en inglés. Anteriormente, se han realizado estudios de Simulación de Dinámica Molecular (SDM) sobre esta proteína, a partir de los cuales, se detectaron ciertas secuencias de aminoácidos que se involucran con cristales de hidroxapatita (HA), atrapan iones de  $Ca^{2+}$ , además promueven la adhesión celular al interactuar con integrinas y otros ligandos. Estas secuencias corresponden a las posiciones 4-23 y 125-144 dentro de la cadena primaria de aminoácidos de la BSP<sup>(2)</sup>. Debido al conocimiento previo que se tiene sobre la BSP, en el presente trabajo se evaluó la biodistribución del péptido tras su radiomarcaje de manera indirecta con el agente quelante bifuncional HYNIC y con el radionúclido  $^{99m}Tc$  a tiempos de 0.5, 3.0 y 24 h. Se ajustaron los parámetros de reacción para obtener una pureza radioquímica (PRQ) del radioconjugado  $>90\%$ <sup>(3)</sup>. Se emplearon como modelos de estudio a ratones BALB/c con la finalidad de conocer el comportamiento del péptido BSP-4-23 de manera *in vivo*. Con base en los resultados obtenidos en este estudio, se demostró que el radiomarcado  $^{99m}Tc$ -HYNIC-BSP-4-23 se une de manera correcta teniendo una PRQ del 99%. Aunado a esto, al seguir una biodistribución en los órganos principales y presentar una excreción vía renal, se aporta conocimiento científico sobre comportamiento y biodistribución del péptido BSP-4-23 que contribuye en la búsqueda de un nuevo tratamiento más efectivo y menos costoso que ayude a mejorar la calidad de vida de los pacientes con osteoporosis, planteando como perspectiva que un futuro mediano se pueda probar dicho péptido en un modelo de osteoporosis en rata.

## I. MARCO TEÓRICO

En la Conferencia de Desarrollo del Consenso de 1993, la osteoporosis se definió como una enfermedad esquelética multifactorial y sistémica caracterizada por una baja masa ósea (osteopenia) y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que resulta en el incremento de fragilidad y, por lo tanto, un alto riesgo de fracturas<sup>(1,4-8)</sup> (Figura 1).

La osteoporosis y las fracturas osteoporóticas son una causa importante de discapacidad y mortalidad<sup>(6)</sup>, se sabe que es la enfermedad metabólica más frecuente a nivel mundial. A los 50 años, el riesgo de por vida de una fractura es del 22% para hombres y del 46% en mujeres<sup>(7)</sup>, además, se estima que 9 millones de personas sufren fracturas osteoporóticas cada año, sin embargo, su prevalencia real es difícil de establecer, debido a que es una enfermedad asintomática hasta la aparición de complicaciones, lo que hace difícil la identificación de las personas que padecen la enfermedad<sup>(9)</sup>.

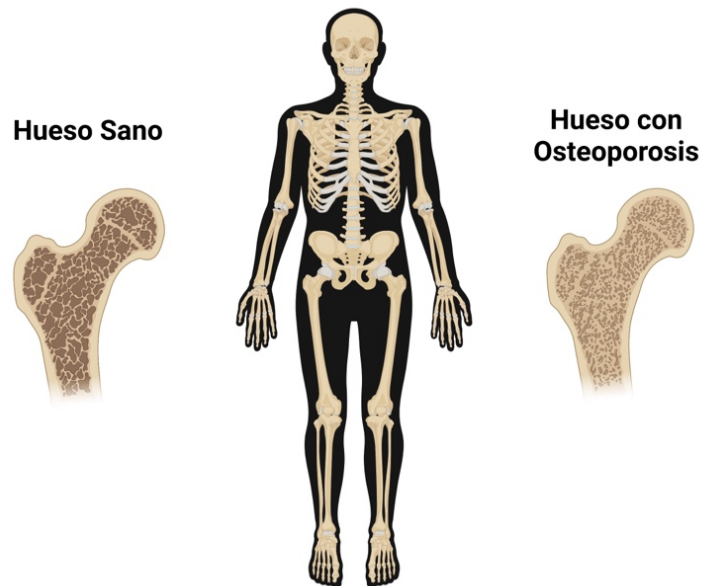


Figura 1. La osteoporosis causa daño en el sistema esquelético resultando en una mayor fragilidad y posibles fracturas óseas. FUENTE: Propia.

La Osteoporosis es causada por un desequilibrio en la remodelación ósea, la cual, es un proceso continuo en el que el reclutamiento de los osteoclastos es seguido por la reabsorción de una cantidad de hueso mineralizado, una fase de inversión en la que los osteoclastos experimentan apoptosis y los osteoblastos son reclutados en el sitio, y finalmente la síntesis y mineralización de matriz ósea dentro de la cavidad de reabsorción, lo que resulta en la renovación del esqueleto aproximadamente cada 10 años<sup>(10,11)</sup> (Figura 2). La resorción ósea excesiva o la formación inadecuada de hueso nuevo durante la remodelación ósea pueden provocar osteoporosis. Así, los osteoblastos y osteoclastos juegan un papel importante en la remodelación ósea al coordinar una amplia variedad de moléculas<sup>(1)</sup>.

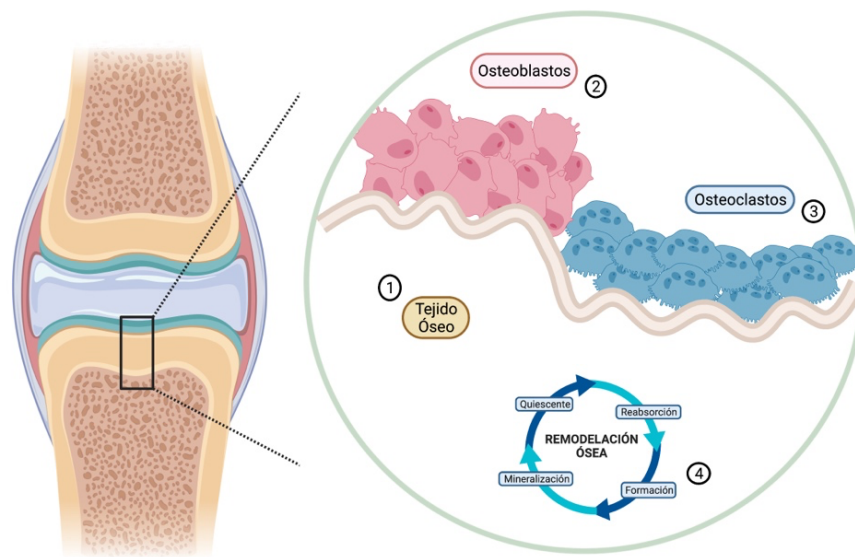


Figura 2. Ciclo de remodelación ósea. 1. Tejido óseo 2. Osteoblastos encargados de la formación de tejido mineralizado 3. Osteoclastos, células encargadas de la reabsorción ósea 4. Etapas de la remodelación ósea. FUENTE: Propia

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto criterios de la osteoporosis basados en la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) y la Densidad Mineral Ósea (DMO) cuando esta última se encuentra en 2,5 o más

Desviaciones Estándar (DE) por debajo de la media de los adultos jóvenes y que se considera la herramienta estándar para la evaluación de esta enfermedad<sup>(1,7,12)</sup>.

Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento con radiación ionizante, también conocida como radioterapia, puede causar daño óseo aumentando el riesgo de fracturas tardías que resulta de los defectos directos e indirectos de la irradiación sobre el hueso, convirtiéndose en una preocupación a nivel mundial<sup>(13,14)</sup>.

La radioterapia, es un tratamiento común para pacientes con tumores malignos debido a su capacidad para inducir la citotoxicidad de las células cancerosas<sup>(13,15)</sup>. Muchos de los pacientes con cáncer que reciben radioterapia son adultos mayores y, por lo tanto, el riesgo de presentar alguna complicación ósea como fracturas por osteoporosis aumenta de manera considerable<sup>(13)</sup>.

Asimismo, se sabe que aproximadamente dos tercios de los pacientes con tumores malignos sólidos (cáncer de mama, próstata, cuello uterino, pulmón, cabeza y cuello y sarcoma de tejidos blandos) reciben radioterapia como parte de su tratamiento<sup>(13)</sup>. La osteoporosis es una complicación común de los tratamientos adicionales durante la radioterapia, como las manipulaciones endócrinas en el cáncer de mama y próstata. Estos tratamientos adicionales durante la radioterapia aumentan el riesgo de disminución de la DMO y aumentan el riesgo de fractura asociado a la radiación<sup>(14,16,17)</sup> (Figura 3).

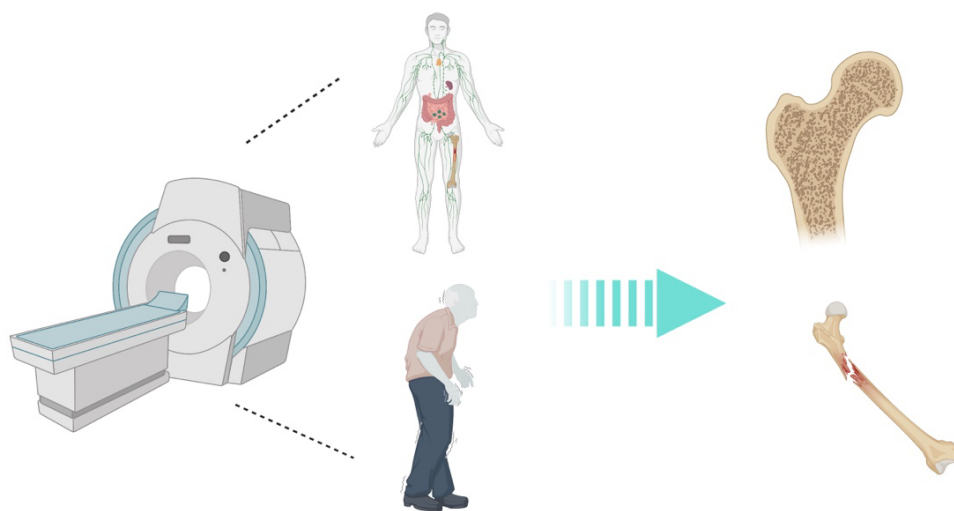


Figura 3. El tratamiento con radiación ionizante en pacientes adultos disminuye la DMO aumentando el riesgo de fracturas. FUENTE: Propia. (DMO; Densidad Mineral Ósea)

Actualmente, se cuenta con herramientas y avances tecnológicos que permiten una mayor precisión en la administración de radioterapias delimitando la zona a irradiar, sin embargo, es inevitable que algunos tejidos normales fuera del volumen de tratamiento reciban una dosis de radiación significativa durante la terapia<sup>(15,18)</sup>.

El hueso es uno de los tejidos normales irradiados con mayor frecuencia y la irradiación de éste daña directamente la supervivencia de las células óseas (osteoblastos y osteoclastos) e influye en su diferenciación de una manera dependiente de la dosis conduciendo a múltiples enfermedades, incluyendo fracturas y pérdida de la función de la médula ósea, afectando en la calidad de vida de los pacientes<sup>(19,20)</sup>. El aumento de riesgo de fractura es un efecto secundario significativo de la radioterapia, especialmente en pacientes con neoplasia torácicas y pélvicas<sup>(15)</sup>. Las fracturas pélvicas, incluidas las fracturas

de cadera, son una fuente importante de morbilidad y mortalidad en mujeres mayores<sup>(14,21-23)</sup>.

En un estudio realizado con radiación en roedores, mediante tomografía micro computarizada ( $\mu$ CT) se pudo observar que disminuyó severamente la masa ósea trabecular y deterioró la estructura ósea<sup>(16,18,24)</sup>. Un análisis histomorfométrico reveló que la radiación disminuyó principalmente el número de osteoblastos y perjudicó su actividad de síntesis de matriz ósea<sup>(15)</sup>. Aunado a esto, el tratamiento quirúrgico con injerto óseo convencional ha tenido un éxito limitado<sup>(17)</sup>, resultando en un desafío clínico actual en donde no existe una terapia preventiva o curativa para el daño óseo inducido por la radiación ionizante<sup>(15,21)</sup>.

Actualmente, el costo total de la osteoporosis y fracturas relacionadas a esta enfermedad son sumamente elevados y se espera que estos costos aumenten para el 2050<sup>(5)</sup>. Esto plantea desafíos importantes para los sistemas de salud, especialmente porque la mayoría de los pacientes con osteoporosis no reciben tratamiento. En consecuencia, la osteoporosis es un problema de salud a nivel mundial que conlleva una carga financiera creciente sobre los servicios de salud<sup>(6)</sup>.

Asimismo, los tratamientos farmacológicos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) que aumentan la DMO moderadamente y reducen, pero no eliminan, el riesgo de fractura<sup>(25)</sup>, se pueden clasificar en dos categorías. Los medicamentos antirresortivos, una clase de fármacos que incluye la calcitonina, estrógenos, suplementos de calcio, vitamina D y los bisfosfonatos que contienen nitrógeno y el inhibidor del ligando RANK y uno menos utilizado y generalmente reservado para pacientes con osteoporosis severa, es el agente anabólico teriparatida (PTH humana 1-34)<sup>(6)</sup>. Sin embargo, la terapia con bisfosfonatos ha causado eventos adversos graves como fracturas atípicas del fémur, osteonecrosis de la mandíbula y cáncer de esófago<sup>(26-30)</sup>.

La terapia con teriparatida (PTH humana 1-34) es la única aprobada por la FDA que estimula la formación de hueso nuevo, aumenta la DMO y reduce la incidencia de fracturas<sup>(31)</sup>. Sin embargo, dicha terapia se limita a un máximo de 24 meses debido a problemas relacionados con el desarrollo de sarcomas osteogénicos en roedores<sup>(31)</sup>. Si bien los bisfosfonatos y la teriparatida son dos de las terapias más potentes disponibles actualmente, en los intentos por mejorar la eficacia mediante la administración de agentes anabólicos y bisfosfonatos en conjunto, no han tenido éxito, éstos están asociados a una pérdida ósea abrupta cuando estos se suspenden; estudios previos han demostrado que la pérdida ósea ocurre dentro de los 6 a 12 meses posteriores a la suspensión de la teriparatida, aumentando el riesgo de fracturas<sup>(27,31,32)</sup>.

Por lo anteriormente citado, es importante probar nuevos medicamentos que disminuyan las reacciones adversas, una alternativa prometedora es evaluar la respuesta que presentan péptidos involucrados en el proceso de mineralización para ser probados como terapia alternativa.

Una de las proteínas relacionadas con la nucleación de cristales de hidroxiapatita (HA) de mayor interés es la sialoproteína ósea (BSP) (Figura 4)<sup>(33)</sup>. Fue reportada por primera vez en 1972, y se purificó a partir de hueso bovino con una masa molecular relativa (Mr) de 59,000, un alto contenido de ácido siálico y rica en oligosacáridos<sup>(2,34)</sup>.

La BSP es una glicoproteína de ~ 68 kDa codificada por el gen IBSP que se encuentra localizado en el cromosoma 4 en humanos<sup>(35,36)</sup>. Además, la proteína BSP puede unirse a distintos ligandos como colágena, metaloproteinasas, integrinas e hidroxiapatita, presenta una carga global negativa y con un alto grado de fosforilación<sup>(2,37-40)</sup>.

## Radiomarcaje y Biodistribución del péptido BSP-4-23 en ratones BALB/c.

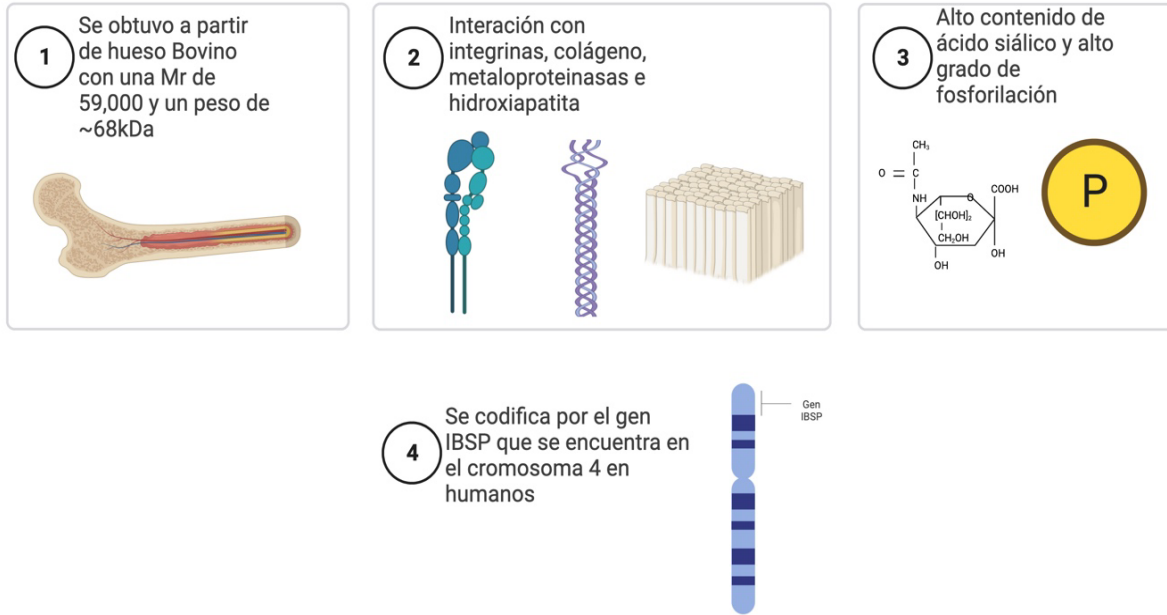


Figura 4. Características de la Sialoproteína Ósea (BSP). FUENTE: Propia.

Debido a lo anterior, esta proteína se señala como promotora de la formación de tejido mineralizado. Existen estudios de Simulaciones de Dinámica Molecular (SDM), en los cuales se ha demostrado que ciertas secuencias de la BSP tienen la capacidad de interactuar con la HA, además de atrapar a iones  $\text{Ca}^{2+}$ (41,42).

A partir de los estudios de SDM realizadas en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología de la UNAM, con distintos péptidos de BSP, se lograron identificar regiones involucradas en el proceso de nucleación de HA que se encuentran dentro de la secuencia primaria de aminoácidos. Los parámetros que se analizaron en el trabajo antes mencionado fueron radio de giro (Rg), distancia cuadrática media de las fluctuaciones (RMSF), estructura secundaria, formación de puentes de hidrógeno y unión a



iones de  $\text{Ca}^{2+}$ (2). Por tal motivo, en este trabajo se propone el uso de la secuencia de 4-23 debido al número de residuos de aminoácidos y por añadidura del costo.

## RADIOFÁRMACOS

En 1920 George Havesy creó el principio de los trazadores radiactivos, lo que en 1927 permitió elucidar el dinamismo de los componentes orgánicos que revolucionó a la bioquímica básica y que posteriormete se tradujo en la medicina nuclear<sup>(43)</sup>.

Dentro del desarrollo de la Medicina Nuclear surge la necesidad de sintetizar moléculas marcadas de mejores características químicas, biológicas y nucleares, nace la radiofarmacia, que en medicina nuclear lleva por objetivo la producción y uso de compuestos radiactivos para el diagnóstico y terapia de importantes enfermedades diseminadas en la población mundial<sup>(43)</sup>.

Un radiofármaco es toda sustancia conteniendo un átomo radiactivo dentro de su estructura y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, puede ser administrado en los seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos<sup>(3,43-45)</sup>.

De acuerdo con los criterios de diseño, pueden dividirse en tres generaciones. Los agentes de primera generación, son especies moleculares marcadas y liberadas a ciertos órganos blanco por un mecanismo de localización de sustrato no específico<sup>(3,44,45)</sup>.

Los agentes de segunda generación, surgieron en los años 80's como resultado del desarrollo de compuestos de coordinación, con el radiometal unido a ligandos en una geometría bien definida, la cual se podría modificar para influenciar la localización *in vivo* de sitios específicos. Su biodistribución es regulada por sus propiedades fisicoquímicas como la carga total, peso molecular, estructura y lipofilia<sup>(45)</sup>. Del desarrollo de este tipo de compuestos

surgió el concepto de agentes quelantes bifuncionales (BFCA), los cuales son ligandos que no solo quelan al radiometal, sino que pueden ser modificados con grupos funcionales para controlar la biodistribución del complejo final<sup>(45)</sup>.

Los radiofármacos de tercera generación, están dirigidos a blancos o receptores específicos, con una capacidad única para controlar la unión *in vivo* a sitios receptores y enzimas. Se componen de tres partes: el radiometal, el BFCA y el fragmento bioactivo<sup>(3)</sup>.

En el caso de los radiofármacos que emplean al <sup>99m</sup>Tc como radiometal, se consideran dos tipos:

Los que tienen tecnecio como el átomo central en torno al cual otros componentes son ordenados donde los ligandos que se coordinan a su alrededor pueden ser monodentados o multidentados, diseñados para estabilizar al tecnecio en su estado de oxidación y conferir propiedades como lipofilia, carga iónica o tamaño molecular que pueden alterar la farmacocinética.

El segundo tipo de compuestos tienen tecnecio unido a una molécula transportadora la cual lo lleva a un sitio específico del cuerpo. Los compuestos marcados con <sup>99m</sup>Tc que emplean transportadores dirigidos a receptores específicos como péptidos, anticuerpos y complejos unidos covalentemente al tecnecio por la vía de un agente quelante bifuncional, son considerados como radiofármacos de tercera generación<sup>(45)</sup>.

En los radiofármacos de tercera generación, la biomolécula es por lo general un péptido, un anticuerpo u otra molécula dirigida a un receptor específico *in vivo*. La molécula de enlace es una cadena hidrocarbonatada de longitud variable, la cual modifica la farmacocinética y las distancias entre la región quelada de tecnecio y la región de enlace-receptor. El agente quelante bifuncional cumple dos objetivos principales: coordinar al tecnecio y proporcionar un soporte molecular que puede ser modificado con grupos funcionales para la unión a la molécula blanco<sup>(3,44)</sup>.

En medicina nuclear se emplean radiofármacos en exploraciones diagnósticas y en radioterapia de blancos moleculares<sup>(46)</sup>. Los radiofármacos que se utilizan para el diagnóstico en humanos deben presentar ciertas características deseables<sup>(47)</sup>. Algunas de estas características es el proporcionar una dosis mínima de radiación al paciente, la cual debe ser detectada fácilmente, además debe tener vida media compatible con el tiempo requerido para rastrear el fenómeno biológico estudiado, así mismo la vida media efectiva también debe ser corta, ya que el metabolismo es muy rápido, el tiempo en el cuerpo debe ser lo más corto posible, de preferencia, debe emitir un rayo  $\gamma$  monocromático con energía entre 100 y 300 KeV y no emitir partícula  $\beta$  o  $\alpha$ , por otro lado, debe estar disponible fácilmente, ser económico y conservarse sin contaminarse<sup>(48)</sup>.

El tecnecio es un metal de transición color gris plateado que pertenece al grupo VIIB y su número atómico es 43. Pueden existir ocho estados de oxidación ( $1^-$  a  $7^+$ ), los cuales resultan de la pérdida de electrones de los orbitales 4d y 5s o de la ganancia de un electrón en el orbital 4d. La estabilidad de los estados de oxidación depende del tipo de ligante y el ambiente químico. Los estados  $7^+$  y  $4^+$  son los más estables y están presentes como pertechnetatos. Estados de oxidación bajos como  $1^-$ ,  $1^+$ ,  $2^+$  y  $3^+$  son por lo general estabilizados por el acomplejamiento con diversos ligantes<sup>(49)</sup>. El  $Tc^{99}$  se considera como el radionúclido “ideal” para marcar fármacos debido a sus características presentadas en la tabla 1<sup>(48,49)</sup>.

Dentro de la práctica clínica de Harper y Kathryn con el tecnecio en la Universidad de Chigado, reportaron que el ión pertechnetato ( $^{99m}TcO_4^-$ ) se acumula en tiroides, glándulas salivales, estómago y plexos coroideos<sup>(50)</sup>.

<b>CARACTERÍSTICAS DEL Tc<sup>99</sup></b>
Fácil obtención a partir del generador <sup>99</sup> Mo/ <sup>99m</sup> Tc
Ausencia de emisión β y su emisión γ de energía baja de 140 KeV, que presenta una adecuada penetración en los tejidos
Vida media corta de 6 horas
Eficiencia con que se detecta
Facilidad y rapidez con que se puede unir o acomplejar a diversas sustancias, drogas o fármacos
Las cantidades en MBq empleadas permiten hacer estudios dinámicos y estáticos

Tabla 1. Características presentes en el radionúclido Tc<sup>99</sup>.

El <sup>99m</sup>Tc se obtiene y produce a partir de generadores <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc, que emplean una columna cromatográfica cargada con alúmina, en donde el <sup>99</sup>Mo es adsorbido y el (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) es eluído mediante solución salina (Figura 5)<sup>(51)</sup>.

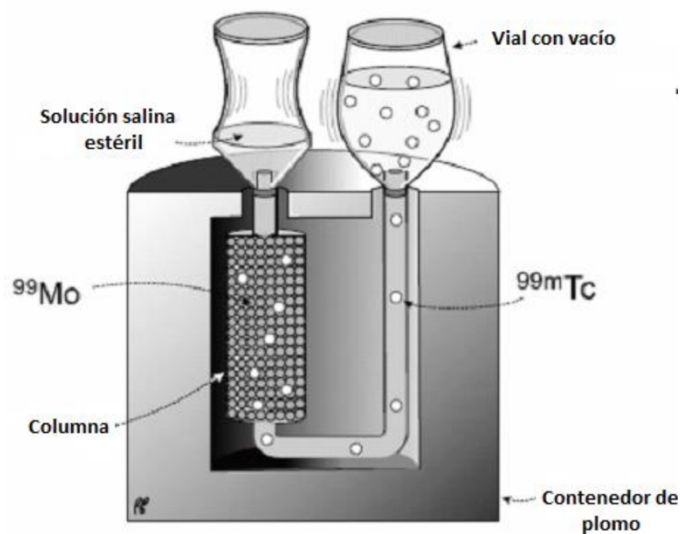


Figura 5. Generador de <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc.  
FUENTE: Robles, M. et. al.

El compuesto obtenido a partir del generador de molibdeno es pertecneciato de sodio ( $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ ), cuyo anión tiene un estado de oxidación 7+. Por otro lado, el cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2$ ) es uno de los agentes reductores que se utiliza con mayor frecuencia para convertir un número de enlaces disulfuro de una proteína en tioles libres, los cuales pueden enlazar al tecnecio de forma eficiente. El tiempo de reacción debe ser corto y la pureza radioquímica debe ser preferiblemente superior al 95%<sup>(46,52)</sup>.

Los compuestos de  $^{99m}\text{Tc}$  reducidos son químicamente reactivos y se combinan con una amplia variedad de agentes quelantes que donan un par de electrones para formar un enlace covalente coordinado con el  $^{99m}\text{Tc}$ <sup>(53)</sup>.

## RADIOMARCAJE DE PÉPTIDOS

El radiomarcaje se define como la unión de un compuesto a una sustancia radiactiva o radionúclidos como lo son el Yodo, Tecnecio, Galio, entre otros<sup>(49)</sup>. Las técnicas que se utilizan para el marcaje de péptidos con radionúclidos se dividen en dos procedimientos: el marcaje directo y el marcaje indirecto o marcaje por preformación del quelante bifuncional (BFCA) que se localiza entre el radionúclido y un fragmento bioactivo que puede ser un péptido, ácidos nucleicos y oligonucleótidos (Figura 6)<sup>(46,47)</sup>.

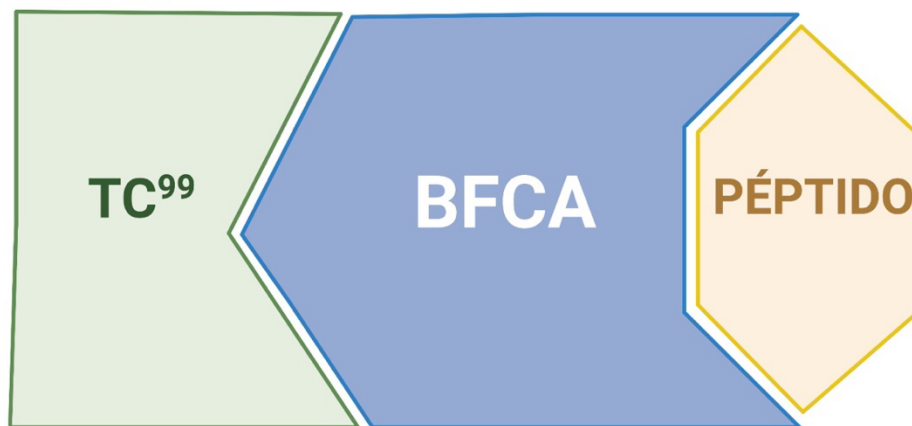


Figura 6. Ilustración del marcaje indirecto por preformación con un quelante bifuncional (BFCA) que asegura la unión entre el radionúclido y al fragmento bioactivo. FUENTE: Propia

Los agentes quelantes o bifuncionales unidos a los péptidos para la formación de complejos radiactivos se pueden dividir principalmente en dos clases; Los que incluyen ácidos carboxílicos, aminas o hidroxilos como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y el ácidohidrazinopiridin-3-carboxílico (HYNIC)<sup>(54)</sup>.

El ácido hidrazinonicotínico (HYNIC) (Figura 7) se utilizó por primera vez por Michael J. A. et. al.<sup>(55)</sup>. Desde entonces se ha utilizado para marcar péptidos y otras moléculas de interés biológico<sup>(3)</sup>.

El HYNIC es un agente de acoplamiento para marcaje de péptidos con  $^{99m}\text{Tc}$  que pueden lograr actividades altamente específicas sin afectar la capacidad de unión al receptor de la secuencia de aminoácidos<sup>(54)</sup>. Este núcleo forma complejos de la forma  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-péptido, donde el grupo HYNIC es un sitio de coordinación mientras que los sitios restantes son completados por varios coligandos como tricina (tris-Hidroximetil)metilglicina) o etilendiamino-N,N'-ácido diacético (EDDA) (Figura 8). La tricina es particularmente favorable para la reducción inicial y el acomplejamiento al tecnecio; sin embargo conduce a la formación de especies marcadas con baja estabilidad, por otro lado, el EDDA produce complejos mas estables y con menos isómeros<sup>(56)</sup>.

El procedimiento ideal para el radiomarcaje de proteínas con  $^{99m}\text{Tc}$ , incluye realizar este procedimiento bajo condiciones que garanticen que la actividad biológica de los péptidos y permanezcan sin cambios, así como lograr la incorporación irreversible del radionúclido<sup>(48)</sup>.

Otras sustancias que pueden estar presentes son estabilizadores, agentes dispersantes, y buffers. La formulación involucra la adición de una solución ácida de cloruro de estaño a la solución que contiene al ligante a un pH definido. El exceso de ligante mantiene al estaño soluble a través de la formación del complejo<sup>(48,56)</sup>.

El agente complejante está por lo general presente en exceso respecto al estaño, con el propósito de asegurar que todo el estaño (SN II y IV) formará el complejo minimizando la competencia entre el tecnecio reducido y estaño por el ligando durante el marcaje. En el acomplejamiento se captura al estaño previniendo así la hidrólisis a altos valores de pH; no obstante no se puede evitar que sufra reacciones de oxidación-reducción<sup>(56)</sup>.

El BFCA ideal es aquel que puede formar un complejo con el radionúclido estable en una pureza a muy bajas concentraciones del conjugado péptido-BFCA<sup>(46,48,57)</sup>.

La presencia de oxígeno y radicales libres pueden provocar que en la preparación quede pertechnetato ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) como impureza. Este se distribuye biológicamente en mucosas y puede observarse radiactividad en estómago y e intestino no deseadas, en una solución saturada con oxígeno será mayor la cantidad de  $\text{Sn}^{2+}$  que se necesite para efectuar la reducción. En presencia de oxígeno, el  $\text{SnCl}_2$  se oxida y no reduce al  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ <sup>(43)</sup>.

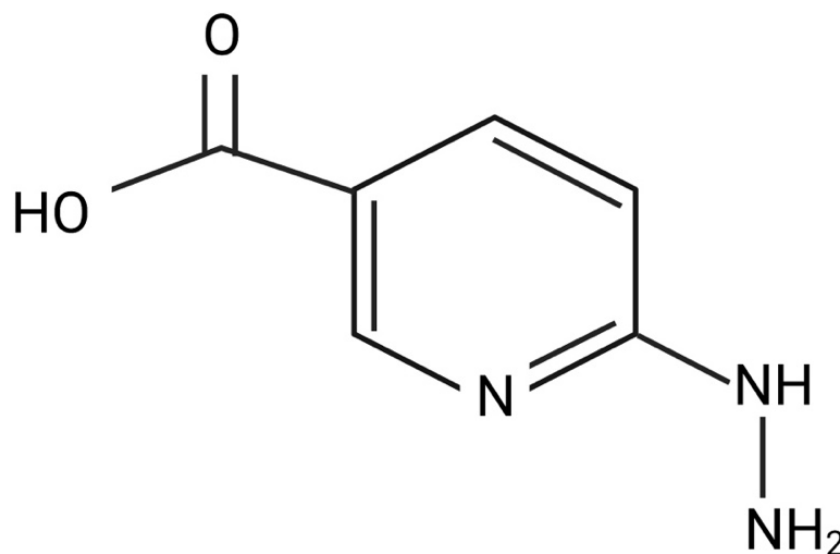


Figura 7. Estructura del agente quelante bifuncional Hidrazinonicotinamida (HYNIC). FUENTE: Escobar Alarcón L. et. al

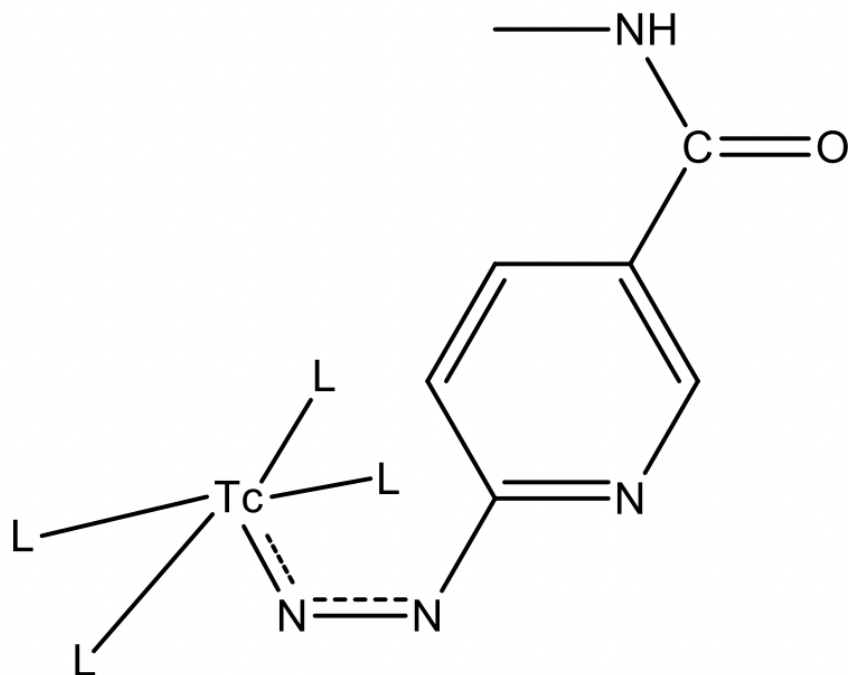


Figura 8. Estructura del  $^{99m}\text{Tc}$  unido al agente quelante bifuncional HYNIC. FUENTE: Robles Matias et. al.

Este método presenta la ventaja que combina la facilidad del marcado directo con la química bien definida del marcaje por preformación del quelante, por lo que el marcaje indirecto es la técnica más práctica para el desarrollo de radiofármacos basados en péptidos blanco-específicos<sup>(46,48)</sup>. En la figura 9 se muestran los elementos para llevar a cabo el correcto marcaje del péptido de interés con el agente bifuncional HYNIC y el tecnecio.



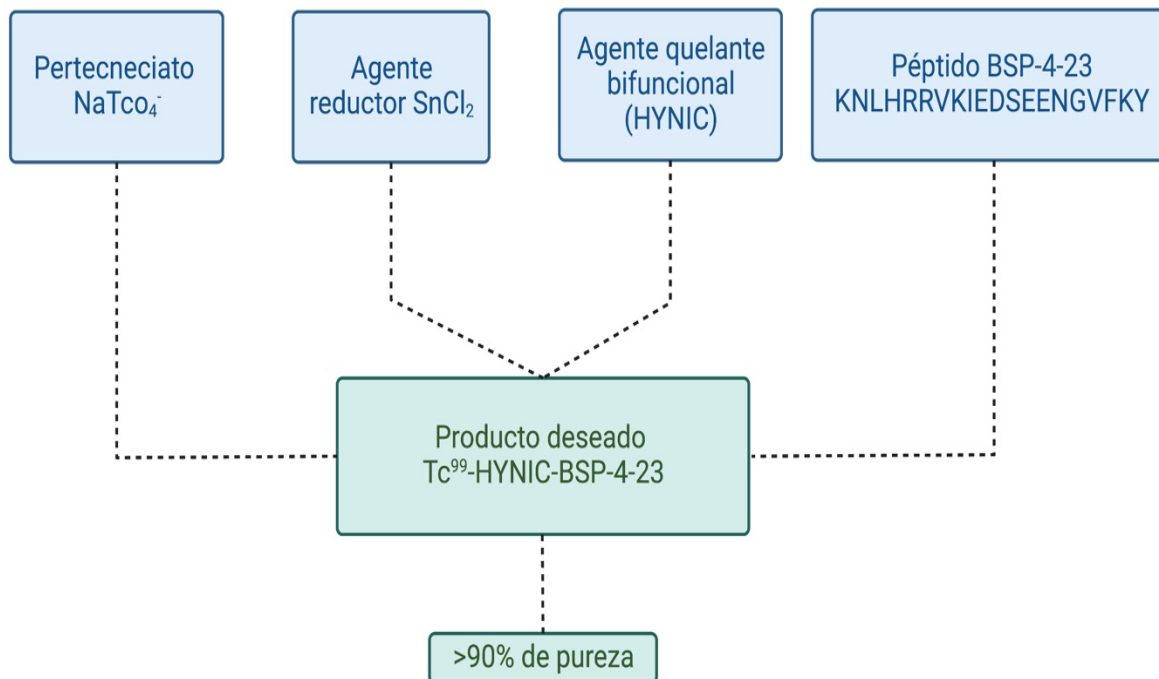


Figura 9. Reacciones químicas que se llevan a cabo en el proceso de radiomarcaje indirecto con  $Tc^{99}$ . FUENTE: Propia.

## PUREZA RADIOQUÍMICA DEL RADIOCONJUGADO

Las pruebas de pureza radioquímica son fundamentales para garantizar el control de calidad de los radiofármacos en la rutina diaria de cualquier departamento de medicina nuclear<sup>(58)</sup>. Un buen radiofármaco debe tener una alta pureza radioquímica (>90%)<sup>(48)</sup>.

La pureza radioquímica del producto radiomarcado se determina por lo general con técnicas cromatográficas como la cromatografía en capa fina o mediante cromatografía de líquidos de alta solución (HPLC) acoplada a un detector de radiactividad<sup>(3)</sup>.

La cromatografía de capa fina es la técnica más simple para el análisis de péptidos la cual emplea diversos sistemas de solventes y de detección. En particular, los péptidos libres pueden ser examinados en solventes ácidos como el ácido acético diluido o bajo condiciones básicas<sup>(3)</sup>.

La cromatografía de fase reversa por HPLC emplea una fase estacionaria hidrofóbica y se utiliza una fase móvil de agua/solvente orgánico. Esta técnica se ha convertido en un método de separación de alta resolución muy importante para el análisis de péptidos, proteínas y ácidos nucleicos<sup>(3)</sup>. La separación de biomoléculas depende de la interacción hidrofóbica reversible entre las moléculas que se encuentran en el eluyente y la fase estacionaria, las cuales establecen un equilibrio. Su distribución se ve influenciada por las propiedades de la fase estacionaria, la hidrofobia de la muestra y la composición del eluyente<sup>(3)</sup>. Las condiciones iniciales favorecen un equilibrio donde el 100% de la muestra está unida y dado que los péptidos tienen aminoácidos con áreas hidrofílicas e hidrofóbicas así como una longitud variable, se establece múltiples uniones con la fase estacionaria. La mayoría de las biomoléculas son lo suficientemente hidrofóbicas para establecer una fuerte unión bajo condiciones acuosas y con una baja concentración del solvente orgánico<sup>(3)</sup>.

La elución se puede llevar a cabo utilizando un sistema isocrático, sin embargo, se emplea frecuentemente un sistema de gradiente con el propósito de minimizar el tiempo<sup>(3)</sup>. Inicia cuando la cantidad de solvente orgánico se va incrementando y por ende las condiciones hidrofóbicas. A medida que la muestra recorre la columna, unión y elución se van presentando. Aquellas moléculas con mayor carácter hidrofóbico permanecerán fuertemente unidas y serán eluidas al último<sup>(3)</sup>.

Para establecer las condiciones que favorezcan la unión se emplea una solución acuosa que contenga a un agente par iónico (TFA), con el fin de mejorar la interacción hidrofóbica y un solvente orgánico a baja concentración. El TFA se une mediante interacción iónica con los grupos cargados evitando que influyan en el carácter hidrofóbico<sup>(3)</sup>.

Debido a que la mayoría de proteínas y péptidos son ligeramente básicos el agente par iónico utilizado es por lo regular un ácido como el ácido trifuro acético (TFA)(3).

La composición de la fase estacionaria está basada en una matriz hidrofílica de sílica cubierta por una fase hidrofóbica de cadenas de carbono (ligandos de C18). Matrices con alta porosidad proporcionan superficies de área largas para una alta capacidad de unión<sup>(3)</sup>. La fase estacionaria se empaca dentro de una columna, la cual establecerá un equilibrio con el eluyente que llenará los poros de la matriz y los espacios entre las partículas estableciendo las interacciones antes mencionadas<sup>(3)</sup>.

Esta técnica consiste en la separación de los compuestos radiactivos mediante la elución de los componentes por una fase móvil y la fase estacionaria, permitiendo determinar el tiempo de retención de la muestra y eficiencia radioquímica con un contador de pozos tipo centelleo que detecta los fotones emitidos por el <sup>99m</sup>Tc durante la fase estacionaria<sup>(59,60)</sup>.

La espectroscopia UV-Vis se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (en el rango de longitudes de onda ultravioleta y visible) que puede absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente<sup>(61)</sup>. La absorción molecular en la región ultravioleta y visible del espectro depende de la estructura electrónica de una molécula<sup>(62)</sup>.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en:

- a) La propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV
- b) Para la formación de derivados químicos
- c) La capacidad que tienen las proteínas de unir cierto colorantes<sup>(62)</sup>.

La absorción óptica de las proteínas se mide a 280 nm o 254 nm, oligonucléotidos a 260nm y péptidos a 215 nm<sup>(3)</sup>. A esta longitud de onda, la absorción de las proteínas se debe principalmente a los aminoácidos triptófano,

tirosina y cisteína. Por lo tanto, diferentes proteínas pueden tener diferentes coeficientes de absorción e incluso la longitud de onda de máxima absorción puede diferir<sup>(62-64)</sup>.

La espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica vibracional utilizada para evaluar la composición química o huella dactilar molecular de una muestra<sup>(65)</sup>.

Se basa en la absorción de luz infrarroja por las moléculas que componen el material, donde todas las moléculas con un momento dipolo resultante diferente a cero absorberán la radiación infrarroja proporcionando información de la estructura específica de biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos a través de una serie de bandas identificables de grupos funcionales en la región electromagnética del infrarrojo medio<sup>(66)</sup>.

FT-IR se puede utilizar tanto en análisis cualitativos como en cuantitativos de materiales orgánicos e inorgánicos. Registra una información espectroquímica compuesta por intensidades de absorción para cada número de onda del espectro infrarrojo medio ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ). Las bandas infrarrojas llevan información vibratoria utilizada para filtrar y escanear muestras en varios segmentos<sup>(65)</sup>.

El espectro de huellas dactilares para las muestras biológicas, también llamadas región de “huella biológica”, oscila entre  $1800$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  y contiene información de biomoléculas clave como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos<sup>(65)</sup>.

En la figura 10 se pueden observar los cambios en la firma IF de las biomoléculas que están asociados con cambios de concentración (cambios de intensidad de banda) y cambios en la configuración molecular y los grupos funcionales vecinos (cambios de banda hacia números de onda más altos o bajos)<sup>(65)</sup>.

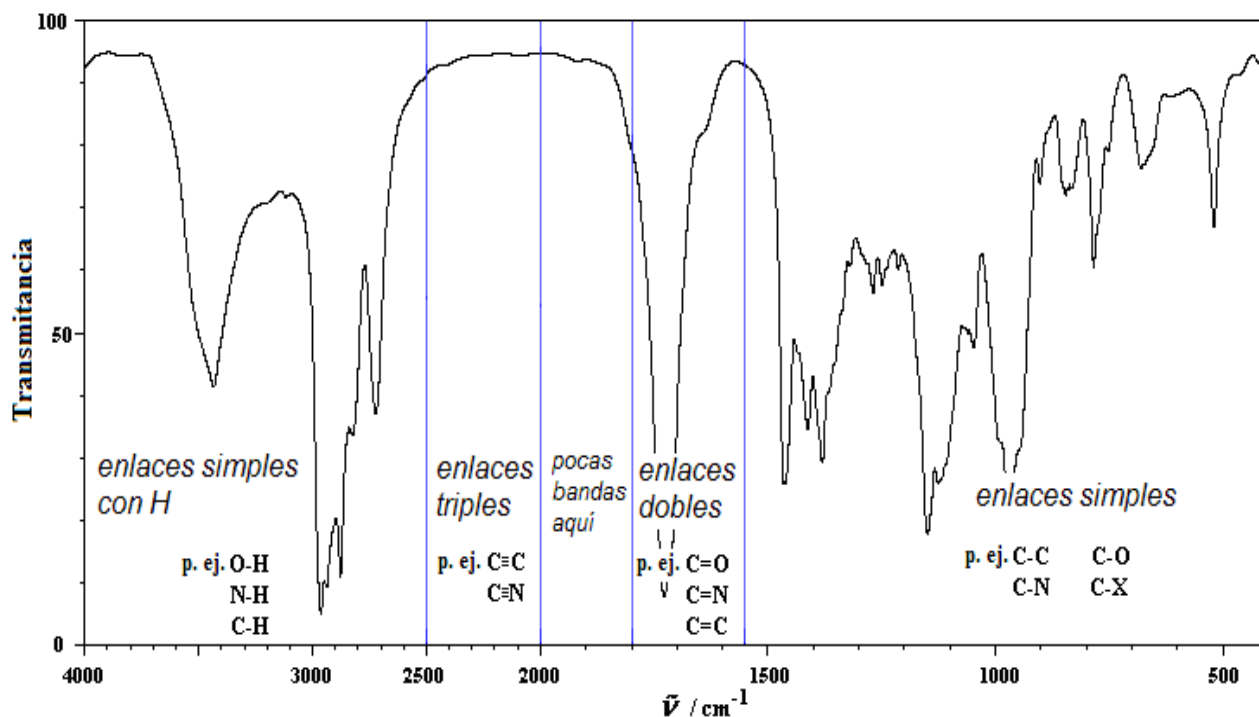


Figura 10. Espectro IR de las diferentes bandas características de algunos grupos típicos y en qué regiones aparecen. FUENTE: Camilo L. M. et. al.

Es bien sabido que los cambios estructurales secundarios de las proteínas se pueden detectar mediante espectroscopia FT-IR. Las bandas espectrales de amida se utilizan más comúnmente para esta caracterización de proteínas, en particular las bandas amida I ( $1650 \text{ cm}^{-1}$ ) y amida II ( $1545 \text{ cm}^{-1}$ ). La banda amida I entre  $1600$  y  $1700 \text{ cm}^{-1}$  consiste principalmente en vibraciones de estiramiento en C=O y grupos C-N, y su posición máxima está determinada por la conformación de la columna vertebral y el patrón de unión de hidrógeno, mientras que la banda amida II entre  $1510$  y  $1580 \text{ cm}^{-1}$  consiste principalmente en la flexión N-H pero también vibraciones de estiramiento en C-N y C-C<sup>(67)</sup>.

## BIODISTRIBUCIÓN

Debido a la necesidad de contar con datos estimados a la localización biológica de un compuesto radiofármaco, se estudia como un instrumento de seguridad antes de ser inyectado a un paciente, con la finalidad de evaluar la velocidad de acumulación del radiofármaco en el tejido diana y su depuración del tejido u órgano de interés, debe reflejar los procesos fisiológicos, fisiopatológicos y bioquímicos para que puedan ser analizados. Dichos controles se realizan generalmente en ratones o ratas de laboratorio que ofrecen un buen modelo en el comportamiento de los fármacos<sup>(46)</sup>.

Durante la etapa de desarrollo e investigación de un nuevo radiofármaco, se realiza el estudio de afinidad biológica refiriendo la actividad en cada uno de los órganos y en sangre total a la dosis inyectada<sup>(43)</sup>.

La biodistribución se define como la fracción de la actividad administrada que se localiza en los diferentes tejidos, órganos o sistemas del organismo<sup>(68)</sup>. La biodistribución de un radiofármaco debe ser tal que después de su administración ingrese a la circulación sanguínea y siga una cinética simple e interpretable cuantitativamente<sup>(46)</sup>.

Un radiofármaco no se dirige estrictamente a un “órgano blanco”. Puede marcar un órgano, o tejido, o evento metabólico, o un territorio constituido por varios de los anteriores; a eso le llamamos espacio de biodistribución, depende obviamente de las características del radiofármaco, pero también y en gran medida de la forma en que se administró. El mismo radiofármaco, administrado oralmente, vía intravenosa, subdérmica o inhalado etc. Puede “marcar” espacios de distribución totalmente distintos, y deberán interpretarse de manera muy diferente los datos detectados<sup>(69)</sup>.

## IMAGEN PLANAR

En la imagen planar, existen dos componentes: El fondo y la señal. Una buena imagen posee bajo fondo y alta señal<sup>(70)</sup>. La señal está formada por los fotones provenientes de las estructuras donde se acumula el radiofármaco. Son fotones no degradados. Estos fotones son los que conforman la imagen verdadera<sup>(70)</sup>. El fondo está constituido por el radiofármaco presente en la sangre y toda área corporal que no concentre el radiofármaco, así como los fotones dispersos que entran dentro de la ventana energética elegida. Los primeros factores, disminuyen el contraste de la imagen. Los fotones dispersos, disminuyen la resolución<sup>(70)</sup>.

## RAYOS X

Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética ionizante que debido a su pequeña longitud de onda (1 o 2 Angstroms), tienen la capacidad de interactuar con la materia<sup>(71)</sup>. A diferencia de la luz, los rayos X tienen mayor energía y pueden atravesar la mayoría de los objetos, incluso el cuerpo<sup>(72)</sup>. El rango de esta radiación va desde los rayos gamma, de alta energía y baja longitud de onda, hasta las ondas de radio de baja energía y longitud de onda elevada, pasando por la luz visible. Los rayos X tienen longitudes de onda más cortas y energías mayores que la luz visible y la radiación ultravioleta<sup>(73)</sup>.

Los componentes fundamentales que conforman el equipo radiológico convencional son: el tubo de Rayos X, el generador de radiación y el detector de radiación. Sin embargo, dependiendo de la aplicación específica se utilizan otros elementos adicionales<sup>(71)</sup>.

La utilidad de las radiografías para el diagnóstico se debe a la capacidad de penetración de los rayos. Los rayos X son disparados del tubo de rayos hacia una placa y se atenúan a medida que pasan a través del cuerpo del paciente, jugando un papel importante los procesos de absorción y dispersión<sup>(71)</sup>.

Los rayos X se generan en los sistemas convencionales de radiología para fines de diagnóstico médico dentro de una ampolla al vacío en donde se alinean un cátodo (asociado a un filamento incandescente que actúa como fuente de electrones) y un ánodo (asociado a un foco en donde se genera la radiación por el impacto de los electrones emitidos por el cátodo)<sup>(74)</sup>.

El sistema se alimenta de una fuente de alto voltaje y se sitúa en el interior de una estructura metálica aislante que presenta un diafragma por donde sale el haz de rayos X generado. El objetivo del diafragma o colimador es controlar la anchura del haz de rayos X producido, de modo que se emplee la mayor cantidad de radiación ortogonal al objeto a radiografiar y se disminuya la radiación no ortogonal o dispersa<sup>(74)</sup>.



## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A diferencia de la gran mayoría de las enfermedades crónicas, los tratamientos aprobados para la osteoporosis generalmente se limitan al uso de un solo medicamento a una dosis fija y una frecuencia de dosificación. Y aunque las opciones terapéuticas en el tratamiento de esta enfermedad se han expandido enormemente en las últimas dos décadas, ninguna terapia aprobada actualmente es capaz de restaurar la integridad esquelética en la mayoría de los pacientes con enfermedad establecida, por lo tanto, es importante proponer nuevas alternativas de tratamiento que sean más eficaces y seguras para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Por tal motivo, se propone investigar la biodistribución que presenta el péptido BSP-4-23, con la finalidad de generar conocimiento científico sobre el comportamiento del péptido y en un futuro probarlos en un modelo de osteoporosis.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El radiomarcaje del péptido BSP-4-23 con el radionúclido  $^{99m}\text{Tc}$  permitirá conocer su biodistribución en ratones BALB/c?

## III. HIPÓTESIS

El radiomarcaje del péptido BSP-4-23 con  $^{99m}\text{Tc}$  permitirá conocer su biodistribución en ratones BALB/c.

## IV. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar cuál es la biodistribución que sigue el péptido BSP-4-23 en ratones BALB/c.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar el radiomarcaje de péptido BSP-4-23 con  $^{99m}\text{Tc}$ .
- 2.- Determinar la pureza radioquímica del radioconjugado BSP-4-23/ $^{99m}\text{Tc}$ .
- 3.- Evaluar la biodistribución del péptido BSP-4-23/ $^{99m}\text{Tc}$  en ratones BALB/c.

## V. METODOLOGÍA Y DISEÑO

### MARCAJE DEL PÉPTIDO

La secuencia de interés fue conjugada a succinimidil-N-BOC-HYNIC. La función de esta secuencia fue llevar a cabo el correcto marcado del conjugado final con  $^{99m}\text{Tc}$ . Los pasos realizados fueron:

1. Se preparó una solución 1:1 molar de péptido: succinimidil en medio básico (pH  $\sim$  9.0).
2. Se incubó la mezcla a  $\sim$  95°C durante 30 min.
3. Se purificó la mezcla por extracción en fase sólida con un cartucho sep-pack C-18 con ACN al 20% y 50 %.
4. Se desprotegió la fracción de HYNIC del grupo BOC con TFA.
5. Finalmente, el conjugado formado se purificó eliminando los solventes residuales al vacío.

El conjugado obtenido se empleó para realizar el radiomarcado correspondiente. La metodología empleada fue:

1. Se tomaron  $\sim$ 200  $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$  de HYNIC-péptido.
2. Se adicionó una solución de EDDA/Tricina (10mg/10mg).
3. Se agregó una solución de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  recién eluida, estéril y libre de endotoxinas bacterianas.
4. Inmediatamente se adicionó una solución de  $\text{SnCl}_2$  (10 mg  $\text{SnCl}_2/20 \mu\text{L}$  HCl concentrado/10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  Tipo I).
5. La mezcla se incubó durante 20 min en un baño seco a 95°C.
6. Finalmente, el marcado obtenido se purificó por extracción en fase sólida con un cartucho sep-pack C-18 con una fracción de etanol al 30% y una fracción de agua (Figura 11).

## Radiomarcaje y Biodistribución del péptido BSP-4-23 en ratones BALB/c.

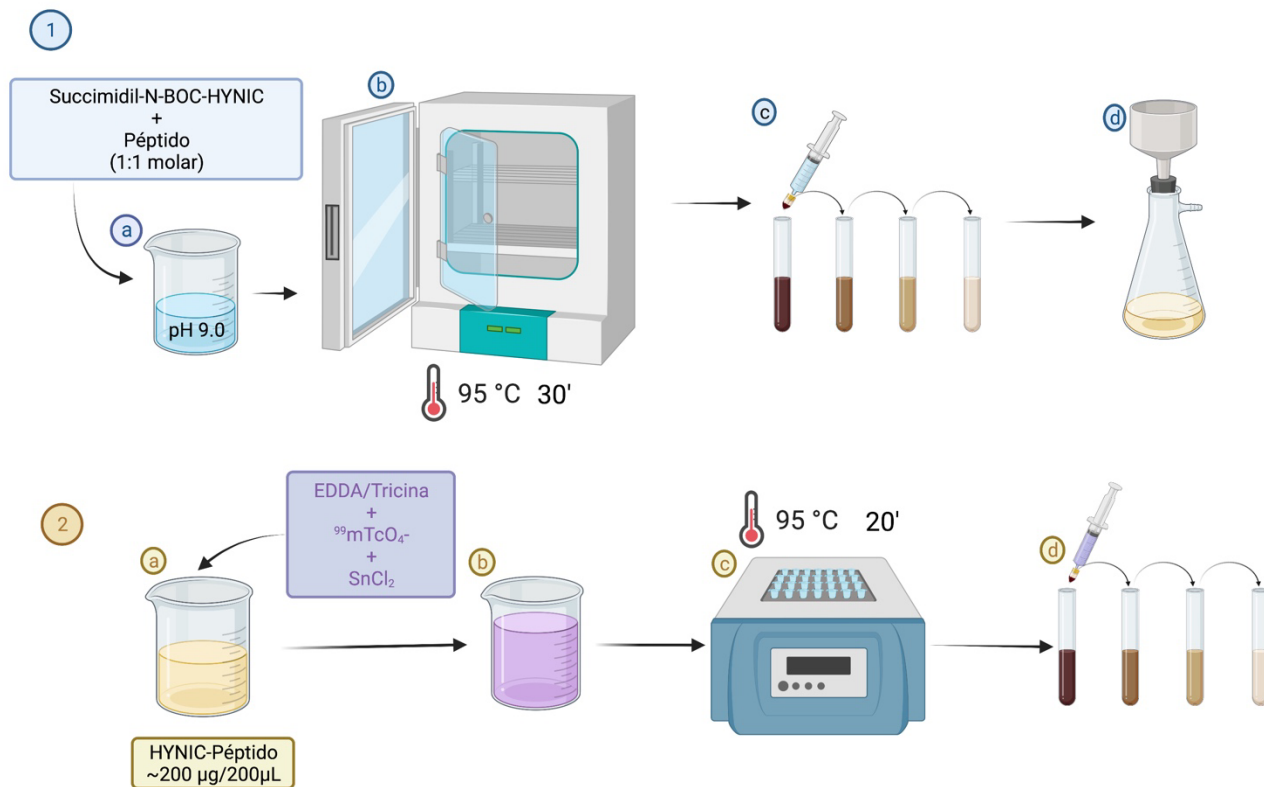


Figura 11. 1a. Se agregó 1:1 molar de péptido-Succimidil a un medio básico con un pH de 9.0; 1b. La solución que se obtuvo se incubó a 95°C durante 30 minutos; 1c. Posterior a ello, se purificó por extracción sólida con un cartucho Sep-Pak C18 con ACN y TFA; 1d. Se procedió a la purificación del conjugado para la eliminación de solventes residuales al vacío. 2a. De la solución que se obtuvo, se tomaron ~200µg/200µL a la cual se le agregó EDDA/Tricina y se adicionó  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , se adicionó  $\text{SnCl}_2$  2c. Se incubó durante 20 minutos en baño seco a 95°C; 2d. La solución final se purificó con un cartucho Sep-Pak C18 con etanol al 30% y agua; ACN: Acetonitrilo; TFA: Ácido trifluoroacético. FUENTE: Propia.

## DETERMINACIÓN DE LA PUREZA RADIOQUÍMICA

El conjugado HYNIC-péptido fue analizado por espectroscopía UV-Vis e FT-IR y HPLC en fase reversa para corroborar el correcto ensamble, así como para descartar la presencia de impurezas (Figura 12).

Los espectros de infrarrojo se adquirieron en un equipo Perkin Elmer (Perkin Elmer System 2000) con una plataforma ATR (Reflexión Total Atenuada) por Transformada de Fourier. Los espectros se obtuvieron con un barrido en el intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ (75).

Los espectros de absorción fueron adquiridos en un espectrófotómetro Perkin-Elmer LambdaBio con barridos en un rango de 200-420 nm en una celda de cuarzo de 1 cm(75).

Para llevar a cabo en análisis de la pureza radioquímica con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se siguió la siguiente metodología:

**Fase móvil A:** Solución acuosa al 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Filtrar a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y desgasificar en un baño ultrasónico durante 3 min(75).

**Fase móvil B:** Solución de acetonitrilo (ACN) al 0.1% de ácido trifluoroacético (ATF). Filtrar a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  resistente a solventes orgánicos y desgasificar en un baño ultrasónico durante 3 min(75).

Condiciones del equipo: Cromatógrafo con sistema de gradientes equipado con un detector de radiactividad gamma y una columna C18, con una velocidad de flujo de 1 mL/min(75).

Procedimiento: Se inyectó al cromatógrafo de 100 a 300 kBq de una muestra del radiofármaco en un volumen de 20 a 50  $\mu\text{L}$ . El cromatógrafo se programó de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 2(75).

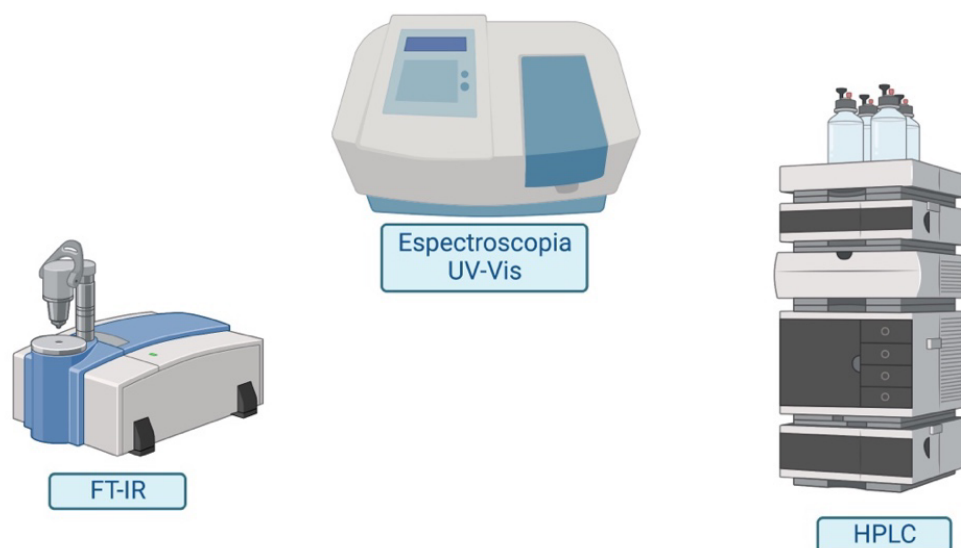


Figura 12. Elementos para corroborar el correcto ensamblaje del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-péptido. FUENTE: Propia.

Tiempo (min)	Fase móvil A (% v/v)	Fase móvil B (% v/v)	Tipo de elución
0 – 3	100	0	Isocrático
3 – 10	100 → 50	0 → 50	Gradiente lineal
10 – 20	50 → 30	50 → 70	Gradiente lineal
20 – 25	30 → 100	70 → 0	Gradiente lineal
25 - 30	100	0	Isocrático

Tabla 2. Condiciones programadas para el cromatógrafo.

Se ha reportado que el tiempo de retención de  $4.5 \pm 1.0$  corresponde al tecnecio libre y el tiempo de retención de  $12 \pm 2.0$  min corresponde al radioconjugado<sup>(75)</sup>.

## MODELO ANIMAL

Para evaluar la biodistribución del péptido BSP-4-23, se utilizaron ratones BALB/c de 25 g de peso, los cuales estuvieron en condiciones de bioterio a una temperatura de 22 °C, con un fotoperiodo de 12 horas y humedad relativa a 50%, alimentación y el agua *ad libitum*.

## BIODISTRIBUCIÓN

Para evaluar la biodistribución que presenta el péptido, se formaron 3 grupos de 2 ratones los cuales fueron administrados en la vena caudal con 20-30  $\mu\text{Ci}$ .

Posterior a ello, se les tomaron imágenes radiosotópicas planares y de rayos X a 0.5 h, 3.0 h y 24 h.

Finalmente, se sometieron a eutanasia (a los mismos tiempos), disecando los siguientes órganos para su evaluación; corazón, pulmón, hígado, páncreas, bazo, riñones, estómago, intestino delgado, intestino grueso, músculo, hueso, cerebro, cráneo y sangre.

Dichos órganos fueron pesados en una balanza analítica y posteriormente analizados en un contador de pozo de centelleo sólido de NaI(Tl) para detectar la actividad de cada uno de ellos. Con lo anterior se obtuvo el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%/DI/g) (Figura 13).

## Radiomarcaje y Biodistribución del péptido BSP-4-23 en ratones BALB/c.

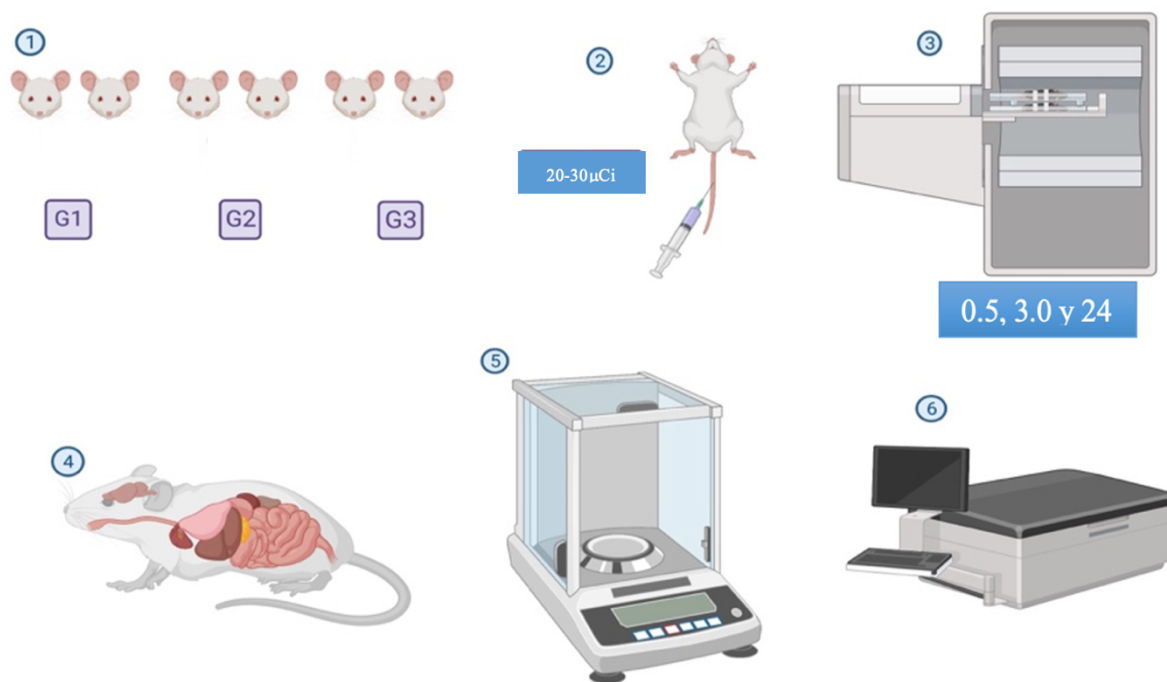


Figura 13. Diagrama de evaluación de la biodistribución en ratones BALB/c. 1. Se realizaron tres grupos de dos ratones cada uno; 2. Fueron administrados en la vena caudal del ratón con una dosis de 20-30 $\mu\text{Ci}$  del radioconjugado a los tiempos 0.5, 3.0 y 24 h; 3. Los ratones fueron evaluados mediante imágenes radioisotópicas planares y de rayos X a los mismos tiempos; 4. Se obtuvieron los diferentes órganos que fueron analizados; 5. En una balanza analítica y 6. Contados de centelleo sólido. FUENTE: Propia.

## VI. RESULTADOS

### MARCAJE DEL PÉPTIDO Y DETERMINACIÓN DE LA PUREZA RADIOQUÍMICA (PRQ)

A partir de los resultados obtenidos de la metodología en fase reversa de HPLC así como de las espectroscopías UV-Vis y FT-IR se analizaron las bandas de los componentes de forma individual y del sistema conjugado.

La caracterización de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 se logró mediante la obtención de cromatogramas en el equipo HPLC, utilizando un sistema de gradientes de fase reversa y una columna C18. Se puede observar en el siguiente radiocromatograma (Figura 14) una señal  $\sim 3$  min antes del radioconjugado en la corrida cromatográfica, esta corresponde a las impurezas y tecnecio libre. Asimismo, se observa un pico con tiempo de retención de  $\sim 12.5$  min que, como se ha reportado en estudios previos(56) en donde analizan péptidos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ , el tiempo de retención a ese tiempo corresponde al sistema conjugado.

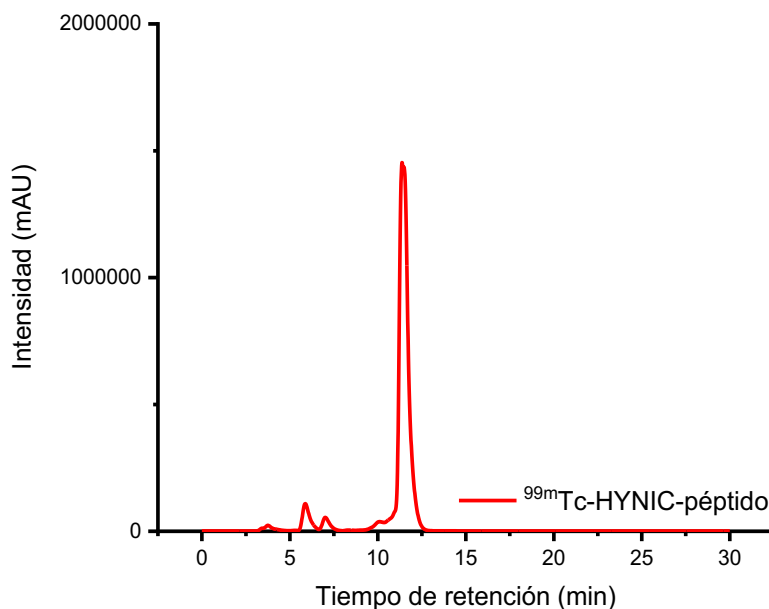


Figura 14. Radiocromatograma de HPLC de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23.



En la siguiente gráfica (Figura 15), se muestra el radioespectro que se obtuvo a partir del espectrofotómetro UV-Vis para evaluar la unión de la secuencia HYNIC-péptido.

De manera cualitativa, se observan diferentes bandas de absorción UV-Vis, la banda negra correspondiente a HYNIC-succinimidil a una longitud de  $\sim 228$  nm, banda roja que corresponde al BSP-4-23 que se encuentra a una longitud de  $\sim 280$  nm y por último, la banda azul que encontramos en  $\sim 220$  nm y  $\sim 280$  nm correspondiente a la unión de HYNIC-BSP-4-23, confirmando una correcta conjugación.

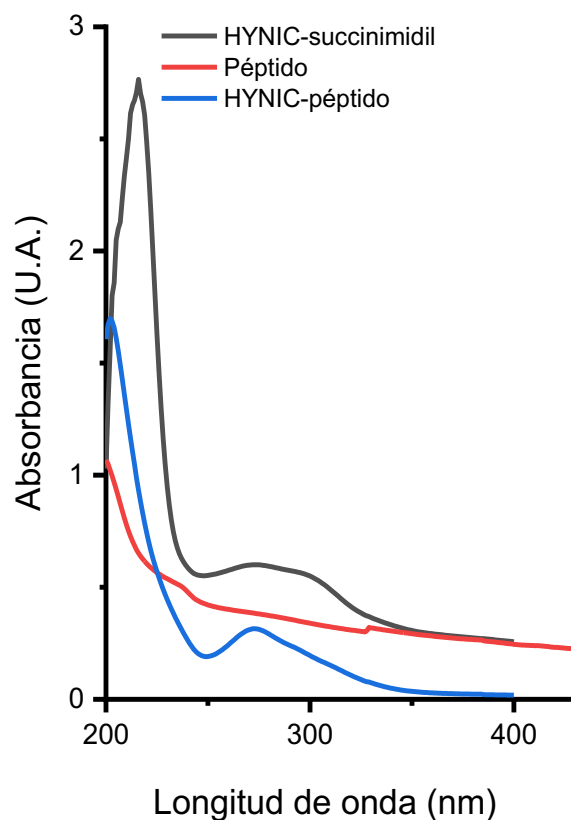


Figura 15. Radioespectros UV-Vis del péptido conjugado y sus componentes libres.

En la figura 16 se muestra el espectro de FT-IR del péptido en el que se pueden observar bandas de vibración características a los diferentes grupos funcionales de la molécula  $-\text{COOH}$  ( $3400$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$ ),  $-\text{NH}_2$  ( $1640$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$ ),  $-\text{CN}$  ( $1360$  a  $1250\text{ cm}^{-1}$ ). Con estos resultados podemos identificar los grupos funcionales presentes en el péptido BSP-4-23.

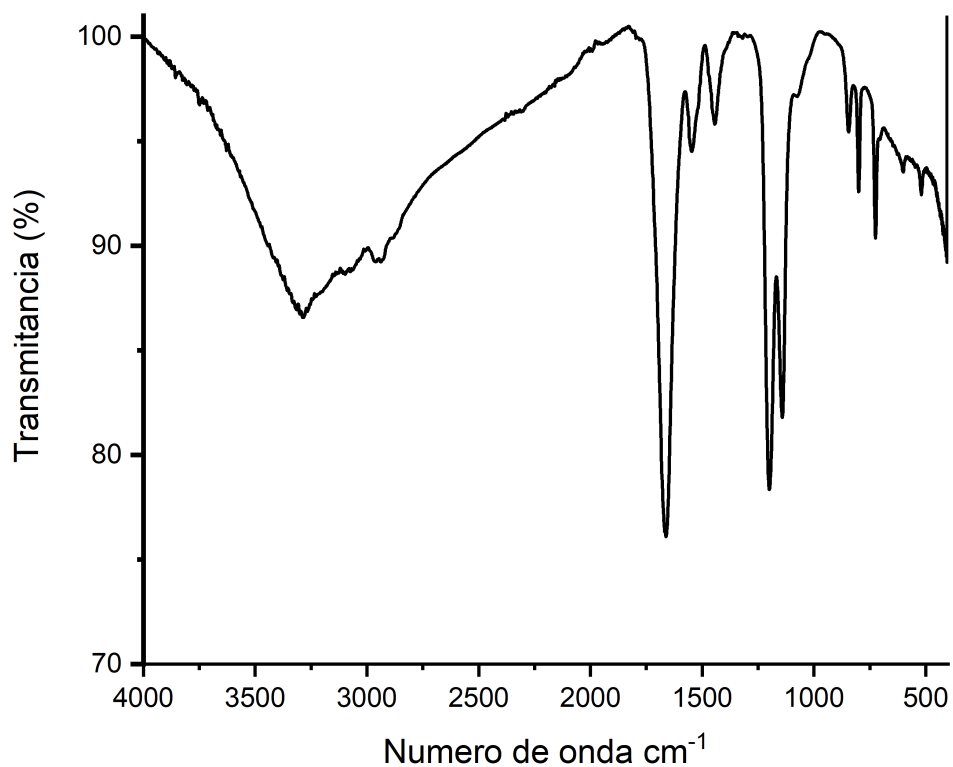


Figura 16. Espectro FT-IR del péptido BSP-4-23.

## BIODISTRIBUCIÓN

Una vez que se confirmó la identidad y el porcentaje de pureza radioquímica del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 se administró el radioconjugado en la vena caudal del ratón, y se evaluaron mediante imágenes radioisotópicas planares y de rayos X a diferentes tiempos (0.5 h, 3.0 h y 24 h).

En la primera evaluación a los 30 minutos mostrada en la figura 17 acompañada de la tabla 3, se puede observar una mayor captación en el hígado y riñones, presentando un porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%/DI/g) de 203.1% y 430.1% respectivamente, lo cual, nos indica su posible eliminación vía renal. Asimismo, se observa una captación en hueso del 16.1% indicando que el  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 se dirige al sistema óseo aún cuando se trata de un modelo sano.

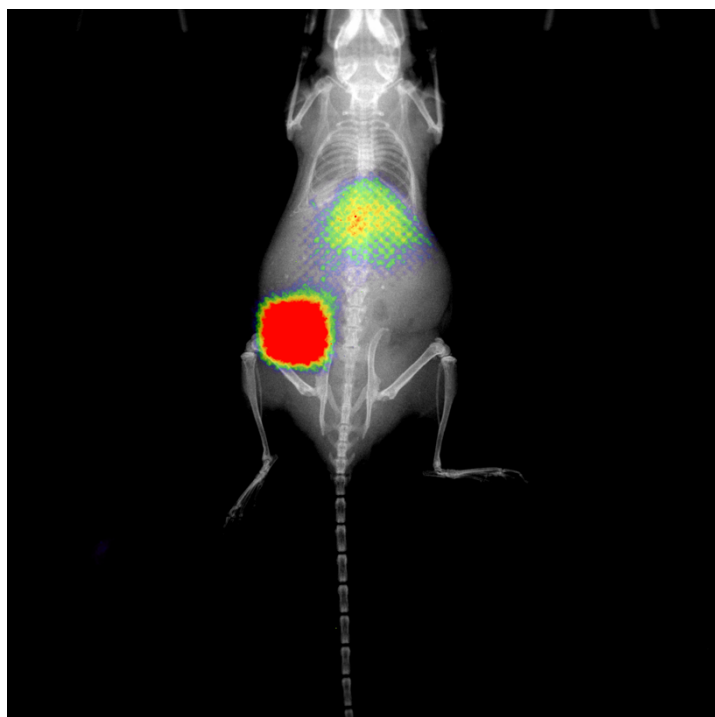


Figura 17. Imagen radioisotópica de la biodistribución del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 a tiempo 0.5 h.

Órganos	%/DI/g
Sangre	2.3
Corazón	63.9
Pulmón	57.4
Hígado	203.1
Páncreas	4.8
Bazo	40.7
Riñones	430.1
Intestino	22.9
Músculo	70.8
Hueso	16.1
Cerebro	5.0
Estómago	48.9
Cráneo	-2.8

Tabla 3. Porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%/DI/g) a tiempo 0.5 h.

Para la segunda evaluación correspondiente a las 3 h mostrada en la figura 18 acompañada de la tabla 4, se muestra una imagen radioisotópica con el radioconjugado a las 3 h de evaluación posteriores a la administración del radioconjugado en la vena caudal así como la evaluación cualitativa del %/DI/g.

Tanto en la imagen como en la tabla se puede observar una disminución en la captación del radiofármaco, sin embargo, el porcentaje de captación en riñón presentado en %/DI/g fue de 303.3% en comparación con el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido en hígado el cual fue de 48.4%, esto nos indica que el radiofármaco está presentando una eliminación predominante por vía renal. Es preciso mencionar que a pesar de ser un modelo sano, el péptido BSP4-23 marcado con el radionúclido  $^{99m}\text{Tc}$ , sigue presente a las 3 h de evaluación.

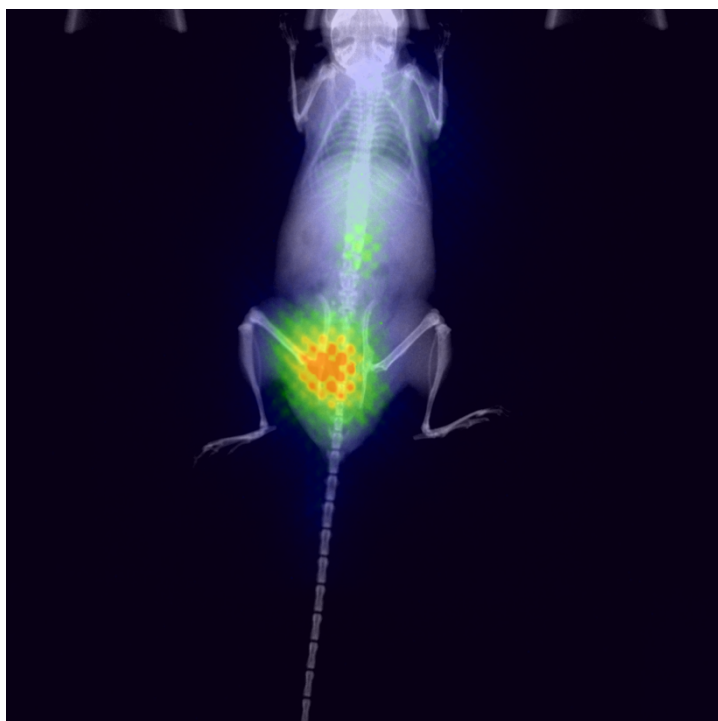


Figura 18. Imagen radioisotópica de la biodistribución del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 a tiempo 3 h.

Órganos	%/DI/g
Sangre	4.4
Corazón	23.3
Pulmón	28.3
Hígado	48.4
Páncreas	9.3
Bazo	35.4
Riñones	303.3
Intestino	16.6
Músculo	4.5
Hueso	1.2
Cerebro	1.4
Estómago	12.4
Cráneo	11.7

Tabla 4. Porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%/DI/g) a tiempo de 3 h.

Finalmente, se observa en la figura 19 la biodistribución del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 analizada en conjunto con la tabla 5 donde se muestra una imagen radioisotópica a las 24 h posteriores a la administración v.i.

En correlación con los datos mostrados en la tabla 5, se observa una disminución considerable del radiofármaco en los órganos evaluados, sin embargo, a pesar la reducción en la captación, los riñones continúan destacando en el %/DI/g con un 79.7%, lo que nos confirma su eliminación predominante por vía renal. Aunado a esto, se puede observar que la captación del radioconjugado en mucosas como el estómago y el intestino son muy bajas, lo que nos ayuda a confirmar la estabilidad del bioconjugado de manera *in vivo*. Además, al disminuir considerablemente el %/DI/g en los órganos con mayor flujo sanguíneo desde la primera evaluación a las 0.5 h hasta las 24 h nos indica que el radiomarcado no es tóxico, por lo tanto, podríamos conserarlo como un buen radiofármaco.

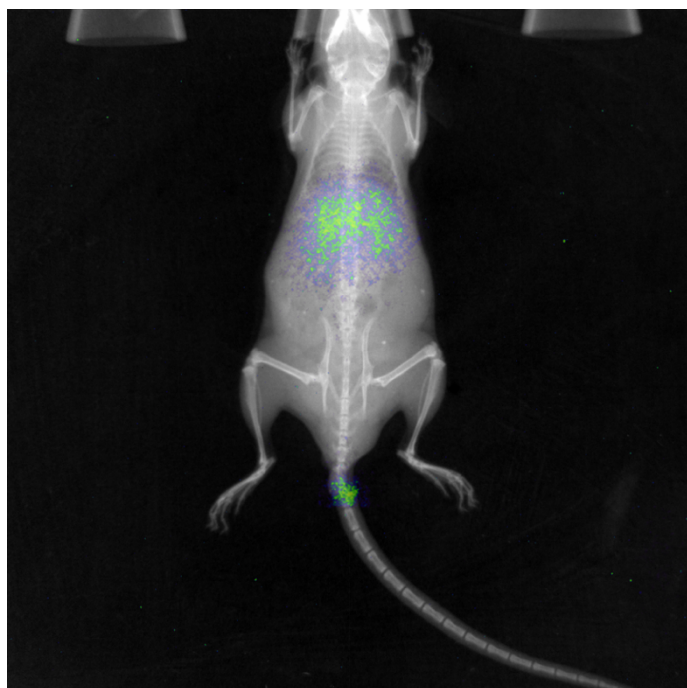


Figura 19. Imagen radioisotópica de la biodistribución del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 a tiempo de 24 h.

Órganos	%/DI/g
Sangre	0.4
Corazón	15.3
Pulmón	16.7
Hígado	38.4
Páncreas	13.6
Bazo	12.6
Riñones	79.7
Intestino	3.2
Músculo	0.9
Hueso	-0.9
Cerebro	0.0
Estómago	11.9
Cráneo	2.9

Tabla 5. Porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%/DI/g) a tiempo de 24 h.

## VII. DISCUSIÓN

En la Conferencia de Desarrollo del Consenso de 1993 la osteoporosis se definió como una enfermedad esquelética, multifactorial y sistémica caracterizada por afectar la microarquitectura del tejido óseo, causando una disminución en la Densidad Mineral Ósea (DMO), lo que resulta en el incremento de fragilidad del tejido mineralizado y, por lo tanto, deriva en un alto riesgo de fracturas óseas<sup>(1,4-8)</sup>.

La osteoporosis y sus complicaciones como las fracturas osteoporóticas, son una causa importante de discapacidad y mortalidad a nivel mundial<sup>(6)</sup>. Se ha estimado que el riesgo de presentar alguna fractura osteoporótica en adultos mayores de 50 años, es del 22% para hombres y siendo mas frecuente en mujeres estimando que el 46% presente alguna complicación por esta enfermedad<sup>(7)</sup>. Por otro lado, debido a que la osteoporosis es una enfermedad asintomática hasta la aparición de complicaciones, su prevalencia real ha sido difícil de establecer<sup>(9)</sup>.

En la actualidad, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ha aprobado tratamientos farmacológicos que han reportando un aumento en la DMO moderadamente y reducen, sin eliminar, el riesgo de presentar alguna fractura osteoporótica<sup>(25)</sup>. Dentro de éstos fármacos encontramos a los antirresortivos (calcitonina, estrógenos, suplementos de calcio, vitamina D y los bifosfonatos) y los que frecuentemente se reservan para los pacientes con la enfermedad más avanzada (agente anabólico teriparátida)<sup>(31)</sup>. Si bien los bifosfonatos y la teriparátida son terapias potenciales aprobadas por la FDA para esta enfermedad, los primeros han reportado complicaciones como fracturas atípicas del fémur, osteonecrosis mandibular y cáncer de esófago. Por otro lado, el agente anabólico teriparatida es el único fármaco aprobado por la FDA que aumenta la DMO en casos de enfermedad avanzada reduciendo la incidencia de fracturas, sin embargo, se limita su uso a un máximo de 24 meses. En un estudio realizado por Leder et. al. en el que evaluaron el tiempo de tratamiento del

agente anabólico teriparatida, los autores reportaron que éste desarrolló sarcomas osteogénicos en roedores<sup>(31)</sup>.

Así mismo, en un intento por mejorar la eficacia farmacológica mediante la administración de agentes anabólicos y bisfosfonatos en conjunto, no se ha tenido éxito, éstos están asociados a una pérdida ósea abrupta cuando se suspende el tratamiento con estos fármacos; estudios previos han demostrado que la pérdida ósea ocurre dentro de los 6 a 12 meses posteriores a la suspensión de la teriparatida, aumentando el riesgo de fracturas causadas por la pérdida ósea<sup>(27,31,32)</sup>.

Por otro lado, en el estudio realizado por Hamilton et. al. lograron identificar que la terapia con radiación ionizante en ratones también disminuye la DMO<sup>(18)</sup>. Asimismo, en el estudio realizado por Chandra et. al. en el que a partir de un estudio histomofométrico en ratas, concluyeron que la radiación ionizante disminuye principalmente el número de osteoblastos perjudicando la DMO<sup>(15)</sup>.

De modo que, con los antecedentes que se tienen sobre la terapia para la osteoporosis, es importante probar nuevos medicamentos que disminuyan las reacciones adversas o complicaciones en pacientes con esta enfermedad. Una alternativa bastante prometedora es evaluar la respuesta que presentan los péptidos involucrados en el proceso de mineralización.

Una de las proteínas que se ha estudiado en las últimas décadas y que está implicada en la nucleación de HA, formación y remodelación ósea, es la Sialoproteína Ósea o BSP por sus siglas en inglés<sup>(33)</sup>. Esta proteína tiene una masa molecular relativa (Mr) de 59,000, un alto contenido de ácido siálico y rica en oligosacáridos. Además, en el trabajo de Martínez Carranza y col. en donde realizaron un estudio de SDM de la BSP, lograron identificar algunas secuencias de aminoácidos que se involucran con cristales de hidroxiapatita, además de atrapar iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y promover la adhesión celular al interactuar con integrinas y otros ligandos; estas secuencias corresponden a las posiciones 4-23 y 125-144 dentro de la cadena primaria de aminoácidos de la BSP<sup>(2)</sup>. Del

mismo modo, en este estudio demostraron que la secuencia 4-23, además de las características antes mencionadas, presenta una predicción para ser fosforilado en la Serina-15 presente en la cadena, siendo consistente con las determinaciones experimentales de aminoácidos fosforilados presentados por Zaia<sup>(76)</sup>.

Con base en los antecedentes reportados sobre las propiedades de la BSP, en el presente trabajo se estudió el comportamiento del péptido mediante la evaluación de su biodistribución, tras un radiomarcado con el radionúclido <sup>99m</sup>Tc a diferentes tiempos (0.5, 3.0, y 24 h), utilizando como modelos de estudio a ratones BALB/c sanos.

El radiomarcaje se define como la unión de un compuesto a una sustancia radiactiva, para este procedimiento se han utilizado algunos radionúclidos como el Yodo, Galio, Tecnecio, entre otros<sup>(50)</sup>.

Un radiofármaco es cualquier producto que, cuando está preparado y listo para su uso con finalidad diagnóstica o terapéutica, contiene uno o más isótopos radiactivos<sup>(77)</sup>. Muchtaridi y col. mencionan que los radionúclidos que se utilizan para el estudio con radiomarcaje o en el diagnóstico en humanos deben presentar ciertas características físico-químicas deseables<sup>(48)</sup>.

El <sup>99m</sup>Tc reúne ciertas características que lo hace considerar como el radionúclido “ideal” para marcar fármacos<sup>(49)</sup>. Algunas de las características relevantes y presentes en este radifármaco, es que tiene una vida media corta de 6 h, se une con facilidad y rapidez a diversas sustancias o fármacos, presenta una adecuada penetración en los tejidos debido a la ausencia de emisión  $\beta$  y emisión  $\gamma$  de energía baja (140 KeV), es de fácil obtención a partir del generador <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc, y además, presenta una alta eficiencia para ser detectado<sup>(48)</sup>.

En medicina nuclear el radionúclido más comúnmente empleado es el <sup>99m</sup>Tc por sus características fisicoquímicas ideales<sup>(46)</sup>. Es importante mencionar que, una de las ventajas de utilizar el <sup>99m</sup>Tc es su tiempo de vida meda ( $T_{1/2}$ ) es de 6 h,



con respecto a otros radionúclidos que presentan una vida media más larga tal como el  $^{111}\text{In}$  el cual presenta un  $T_{1/2}$  de 67 h, de esta manera, el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  es capaz de producir un mayor número de desintegraciones en unas pocas horas y alcanzar dosis absorbidas más altas por unidad de tiempo<sup>(78)</sup>.

De la misma manera, para la obtención del radioconjugado debe realizarse libre de oxígeno, ya que este oxida al  $\text{SnCl}_2$  e impide su función<sup>(43)</sup>. Asimismo, se debe considerar las cantidades presentes de los otros componentes en la preparación ya que cada uno cumple una función importante. El EDDA participa en la unión del complejo HYNIC-péptido al  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , por otro lado, la tricina es un compuesto que ayuda a formar la esfera de coordinación entre el tecnecio y el conjugado. Así, ambos componentes ayudan a darle una estabilidad al radiofármaco<sup>(3,78)</sup>.

En el presente trabajo se utilizó la técnica de marcaje indirecto con el agente quelante bifuncional HYNIC, que como lo mencionan en su trabajo Escobar Alarcón y col.<sup>(54)</sup> el ácidohidrazinopiridin-3-carboxílico, asegura el correcto ensamblaje de cualquier péptido con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , por lo cual se garantiza una estable unión entre el HYNIC, el péptido BSP-4-23 y el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Es importante mencionar que el  $\text{SnCl}_2$  juega un papel fundamental en la reducción del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  además de los parametros de reacción, tomando en cuenta la concentración de ligados (tricina y EDDA), así como el pH de 9, de esta manera se aseguró un correcto ensamblaje, el cual se purificó para lograr un radioconjugado con un porcentaje de pureza radioquímica  $>95\%$ .

La cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa es la técnica más empleada para separar mezclas. Esta técnica emplea un empaque enlazado hidrofóbico con cadenas de diferente longitud, para el caso de este trabajo, fue de 18 átomos de carbono, como fase estacionaria y una fase móvil polar, generalmente agua con algún disolvente orgánico<sup>(3)</sup>.

En los resultados obtenidos en el radiocromatograma a partir de la HPLC con un método de fase reversa, el marcado de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 tuvo un tiempo de retención de  $\sim 12.5$  min. En el trabajo realizado por Conde, E et. al. <sup>(56)</sup> en el que se evaluó la unión de un péptido con HYNIC y  $^{99m}\text{Tc}$ , el radiocromatograma que se obtuvo mostró un tiempo de retención para  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-péptido de  $\sim 12.6$  min, similar al obtenido en este trabajo.

Aunado a esto, en otro trabajo realizado por Mendoza, M et. al. en donde también evaluaron un péptido marcado de forma indirecta con  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC, el tiempo de retención observado en el radiocromatograma fue de  $12.5$  <sup>(79)</sup>. Por lo que, con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo y en concordancia con los obtenidos por Conde, Eduardo y col, así como en el trabajo de Mendoza, M y además, basándonos en los estudios de identidad con radiofármacos realizado por Ying, Ma y col <sup>(80)</sup>, esta correspondencia en los tiempos de retención se considera comunmente suficiente para aceptar la identidad química de la sustancia.

Del mismo modo, se confirmó que las concentraciones ( $\sim 200\mu\text{g}/200\mu\text{L}$  de HYNIC-BSP-4-23;  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  recién eluido;  $10\text{mg SnCl}_2/20\mu\text{L HCl}$  concentrado/ $10\text{mL H}_2\text{O}$ ;  $10\text{mg EDDA}$ ;  $10\text{ mg Tricina}$ ) para llevar a cabo el ensamblaje del radioconjugado permitieron marcar  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 de manera correcta.

El tecnecio libre así como los iones de pertecneciato que no se unen a la molécula del conjugado, quedan en solución y son detectados en la cromatografía líquida de alta resolución <sup>(46)</sup>. En el trabajo de Rien H. Siaens et. al. <sup>(81)</sup> mencionan que durante el etiquetado se formaron algunas impurezas como el tecnecio libre y iones del pertecneciato que no se unen a la molécula del conjugado <sup>(81)</sup>.

En los resultados obtenidos en este trabajo a partir de la metodología de HPLC, las impurezas fueron observadas  $\sim 3$  min, lo cual coincide con los datos

obtenidos en el trabajo Mendoza, M et. al.<sup>(79)</sup> en los que las impurezas del pertecneiato así como el tecnecio libre fueron reportados a los 4.3 min.

En el presente trabajo, estos pudieron eliminarse eficazmente con el cartucho Sep-Pak C-18 y con ello, lograr una pureza del 99%, es decir, se aseguró que la síntesis fuera exclusivamente el radioconjugado listo para ser evaluado de manera *in vivo* en ratones BALB/c.

Mediante espectrometría FT-IT se analizó la molécula del péptido BSP-4-23 con la finalidad de su caracterización, donde se mostraron los grupos funcionales presentes en la molécula. Como era de esperarse, se obtuvieron señales vibratorias en los números de onda 2553; 1643 y 1360 – 1250  $\text{cm}^{-1}$ . Estos resultados coinciden con los obtenidos en el trabajo de Mendoza, M et. al.<sup>(79)</sup>

La segunda parte del estudio, consistió en llevar a cabo la evaluación de la biodistribución del radioconjugado de manera *in vivo* en un modelo animal sano (ratones BALB/c), con la finalidad de identificar los patrones de comportamiento en la distribución y excreción del fármaco. Este procedimiento se evaluó mediante imágenes radioisotópicas a diferentes tiempos (0.5, 3.0 y 24 h) post-administración del radioconjugado en la vena caudal del ratón.

Transcurridos los primeros 30 minutos después de la administración v.i., los resultados mostraron que la acumulación del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23, fue predominantemente en los órganos principales, es decir, el radioconjugado perfundió a los órganos que presentan un mayor flujo sanguíneo (corazón, hígado, bazo, riñones, intestino, músculo y estómago). Asimismo, es de gran importancia mencionar que la mayor captación del radiofármaco se dio en los riñones, lo cuál nos indicaba una eliminación predominante por esta vía, misma que se relaciona con los resultados obtenidos en el trabajo de Conde, E et. al.<sup>(56)</sup> y Santos, C, donde menciona que un péptido con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  sigue esta vía de eliminación<sup>(78)</sup>. También, en esta primera evaluación se tiene una captación,

aunque mínima, presente en hueso, lo cual nos indica que el radioconjugado estudiado en este trabajo tiene un favorable alcance en el sistema óseo.

Del mismo modo, en la evaluación realizada a las 3 h, se puede identificar una clara disminución del radioconjugado en los órganos evaluados, continuando el mayor porcentaje de captación en los riñones, además, todavía presente la captación en el sistema óseo por lo que, a pesar de ser un modelo sano son resultados favorables sobre el comportamiento del péptido y su distribución a una posible ruta.

Por último, en la evaluación de la biodistribución a las 24 h, aunque existió una muy baja captación del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23, continuó mayormente en los riñones, por tal motivo, podemos indicar que la excreción de este radioconjugado se elimina principalmente vía renal coincidiendo con lo que reportó Santos, C. et. al.<sup>(78)</sup>. Aunado a esto, en el trabajo realizado por Harper y Kathryn, en el que reportaron que el ión pertecneciato ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) se acumula en tiroides, plexos coroideos, glándulas salivales y estómago<sup>(50)</sup>, y debido a la poca acumulación del radiomarcado en los órganos antes mencionados en este trabajo, se puede confirmar un correcto ensamblaje del radiofármaco.

Del mismo modo, con los resultados que se obtuvieron se demuestra que el péptido no es tóxico debido que a las 24 h se observa que en la sangre y otros órganos como los pulmones, bazo, intestino y estómago disminuye la captación del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23, y por tanto, este radioconjugado se considera como un buen candidato de fármaco para poderlo probar en un futuro mediato en modelos de rata con osteoporosis<sup>(82)</sup>.

## VIII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados mostrados en el presente trabajo, se demostró que con las condiciones de reacción empleadas en el laboratorio, así como los ajustes en las cantidades del  $\text{SnCl}_2$ , la concentración de los ligandos y el pH se logró marcar de manera correcta el péptido BSP-4-23 con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  unido al quelante bifuncional HYNIC.

Con los resultados a partir de la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa, espectroscopia FT-IR y espectroscopia UV-Vis, se pudo confirmar la identidad del radioconjugado  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP4-23, así como lograr una pureza radioquímica  $>95\%$  del radiofármaco, de esta manera, podemos garantizar la confiabilidad de las técnicas debido a los resultados favorables obtenidos.

Asimismo, fue posible obtener imágenes sobre el comportamiento y biodistribución del radiofármaco en ratones sanos BALB/c, confirmando un correcto ensamblaje del radioconjugado  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 debido a que su biodistribución fue de manera normal, es decir, no se observó radiactividad en tiroides así como muy poca radiactividad en mucosa estomacal y plexos coroideos. Además, los resultados mostraron una mayor captación del radioconjugado en los riñones, por lo que podemos concluir que su excreción es predominantemente por la vía renal.

Con los datos que se obtuvieron en este trabajo, se logró obtener conocimiento científico sobre comportamiento y biodistribución del péptido BSP-4-23 que abrirán la puerta a futuros paradigmas de tratamiento a la osteoporosis y con ello, proponer una alternativa de tratamiento más efectivo y menos costoso para mejorar la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad.

## IX. PERSPECTIVAS

Con los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo sobre el radiomarcage del péptido BSP-4-23 con  $^{99m}\text{Tc}$  y su comportamiento de manera *in vivo*, se abre la posibilidad a nuevas investigaciones empleando una N más grande para que se pueda complementar el estudio con un análisis estadístico.

Así mismo, con los resultados obtenidos a partir de la biodistribución del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-BSP-4-23 se puede considerar como un buen candidato como fármaco y con esto, se podría redireccionar el péptido para probarlo en un modelo de osteoporosis en rata.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ukon Y, Makino T, Kodama J, Tsukazaki H, Tateiwa D, Yoshikawa H, et al. Molecular-Based Treatment Strategies for Osteoporosis: A Literature Review. Vol. 20, International journal of molecular sciences. NLM (Medline); 2019.
2. Martínez Carranza R. IDENTIFICACIÓN DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALCIO Y EL EFECTO DE LAS FOSFORILACIONES EN LA SIALOPROTEÍNA ÓSEA MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS Y SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.
3. Robles Matias M. Optimización del proceso de fabricación de la formulación híbrida y multivalente Bombesina/RGD para la detección oportuna de cáncer de mama. 2013.
4. Dobbs MB, Buckwalter J, Saltzman C. Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist. Iowa Orthop J [Internet]. 1999;19:43–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1888612/>
5. Dontas IA, Yiannakopoulos CK. Risk factors and prevention of osteoporosis-related fractures. Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions. 2007;7(3):268–72.
6. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Calcif Tissue Int. 2019;104(3):235–8.
7. Christell H, Gullberg J, Nilsson K, Heidari Olofsson S, Lindh C, Davidson T. Willingness to pay for osteoporosis risk assessment in primary dental care. Health Econ Rev [Internet]. 2019;9(1). Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6734228/pdf/13561\\_2019\\_Article\\_232.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6734228/pdf/13561_2019_Article_232.pdf)
8. Galindo-Zavala R, Bou-Torrent R, Magallares-López B, Mir-Perelló C, Palmou-Fontana N, Sevilla-Pérez B, et al. Expert panel consensus recommendations for diagnosis and treatment of secondary osteoporosis in children. Pediatric Rheumatology. 2020 Feb 24;18(1).
9. Hermoso De Mendoza MT. Clasificación de la osteoporosis. Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial. An Sist Sanit Navar. 2003;26(SUPPL. 3):29–52.
10. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Seminar Osteoporosis [Internet]. Vol. 393, www.thelancet.com. 2019. Available from: www.thelancet.com

11. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002 May;8(3).
12. Miguel-Carrera J, García-Porrúa C, de Toro Santos FJ, Picallo-Sánchez JA. Prevalence of osteoporosis, estimation of probability of fracture and bone metabolism study in patients with newly diagnosed prostate cancer in the health area of Lugo. *Aten Primaria* [Internet]. 2018;50(3):176–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aprim.2017.03.006>
13. Miller PD. Management of Severe Osteoporosis. *Expert Opinion Pharmacother.* 2016;17(4):473–88.
14. N. Baxter N, B. Habermann E, E. Tepper J, B. Durham S, A. Virgin B. Risk of pelvic fractures in older women following pelvic irradiation. *Obstet Gynecol Surv.* 2006;61(5):325–6.
15. Chandra A, Lan S, Zhu J, Lin T, Zhang X, Siclari VA, et al. PTH prevents the adverse effects of focal radiation on bone architecture in young rats. *Bone.* 2013;55(2):449–57.
16. E Green D, J Adler B, E Chan M, T Rubin C. Devastation of adult stem cell pools by irradiation precedes collapse of trabecular bone quality and quantity. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2012;27(4):747–8.
17. P Cannon C, P Lin P, O Lewis V, W Yasko A. Management of Radiation-Associated Fractures. *J Am Acad Orthop Surg* [Internet]. 2008;16(9):541–9. Available from: Management of Radiation-Associated Fractures
18. Hamilton SA, Pecaut MJ, Gridley DS, Travis ND, Bandstra ER, Willey JS, et al. A murine model for bone loss from therapeutic and space-relevant sources of radiation. *J Appl Physiol.* 2006;101(3):789–93.
19. Aksnes LH, Bruland ØS. Some musculo-skeletal sequelae in cancer survivors. *Acta Oncol (Madr).* 2007;46(4):490–6.
20. Zhang J, Qiao P, Yao G, Zhao H, Wu Y, Wu S. Ionizing Radiation Exacerbates the Bone Loss Induced by Iron Overload in Mice. *Biol Trace Elem Res.* 2020 Aug 5;196(2).
21. Moussazadeh N, Laufer I, Werner T, Krol G, Boland P, H Bilsky M, et al. Sacroplasty for Cancer-Associated Insufficiency Fractures. *Neurosurgery* [Internet]. 2015;76(4):446–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25635890/>
22. Ross PD, SANTORA A, YATES AJ. Epidemiology and Consequences of Osteoporotic Fractures. *The Aging Skeleton.* 1999;359:339–47.
23. Kanis JA, Oden A, Johnell O, de Laet C, Jonsson B, Oglesby AK. The Components of Excess Mortality After Hip Fracture. *Bone.* 2003;32(5):468–73.



24. Wernle JD, Damron TA, Allen MJ, Mann KA. Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model. *J Biomech* [Internet]. 2010;43(14):2738–46. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929010003532>
25. Leder BZ, Tsai JN, Uihlein A v., Burnett-Bowie SAM, Zhu Y, Foley K, et al. Two years of denosumab and teriparatide administration in postmenopausal women with osteoporosis (The DATA Extension Study): A randomized controlled trial. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014;99(5):1694–700.
26. Arboleya L, Alperi M, Alonso S. Efectos adversos de los bisfosfonatos. *Reumatol Clin*. 2011;7(3):189–97.
27. Leder BZ, Tsai JN, Uihlein A v., Wallace P, Lee H, Neer RM, et al. Denosumab and Teriparatide Transitions in Postmenopausal Osteoporosis. *Lancet*. 2019;386(9999):1147–55.
28. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician’s Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis International*. 2014;25(10):2359–81.
29. Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: A viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging*. 2015;10:583–91.
30. Whitaker M, Guo J, Kehoe T, Benson G. Bisphosphonates for osteoporosis - Where do we go from here? *New England Journal of Medicine*. 2012;366(22):2048–51.
31. Leder BZ, Neer RM, Wyland JJ, Lee HW, Burnett-Bowie SAM, Finkelstein JS. Effects of teriparatide treatment and discontinuation in postmenopausal women and eugonadal men with osteoporosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009;94(8):2915–21.
32. Boineau R, Domanski M, Troutman C, Anderson J, Johnson G, McNulty SE, et al. One Year of Alendronate after One Year of Parathyroid Hormone (1–84) for Osteoporosis. *Heart Fail*. 2005;353(6):225–37.
33. McKee MD, Cole WG. Pediatric Bone. In: Glorieux F, Pettifor J, Harald J, editors. *Bone Matrix and Mineralization*. 2012. p. 9–37.
34. Heinegård D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *The FASEB Journal*. 1989;3(9):4232–41.
35. Kim RH, Shapiro HS, Li JJ, Wrana JL, Sodek J. Characterization of the human Bone Sialoprotein (BSP) Gene and its promoter sequence. *Matrix Biology* [Internet]. 1994;14(1):31–40. Available from: [https://doi.org/10.1016/0945-053X\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0945-053X(94)90027-2)

36. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible Structures of SIBLING Proteins, Bone Sialoprotein, and Osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2001;280(2):460–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X00941469>
37. Gordon JAR, Tye CE, Sampaio A v, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* [Internet]. 2007;41(3):462–73. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328207004000>
38. Chen Y, Bal BS, Gorski JP. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(34):24871–8.
39. Stubbs JT, Mintz KP, Eanes ED, Torchia DA, Fisher LW. Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: Delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12(8):1210–22.
40. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(18):8562–5.
41. Vincent K, Durrant MC. A structural and functional model for human bone sialoprotein. *J Mol Graph Model* [Internet]. 2013;39:108–17. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326312001155>
42. Baht GS, O’Young J, Borovina A, Chen H, Tye CE, Karttunen M, et al. Phosphorylation of Ser136 is critical for potent bone sialoprotein-mediated nucleation of hydroxyapatite crystals. *Biochemical Journal*. 2010;428(3):385–95.
43. Pedraza M. Desarrollo del nucleo-equipos 99mTc-IgG humana para la detección “in vivo” de procesos inflamatorios. [México]; 1996.
44. Farstad B. *Radiopharmacy A Technologist’s Guide*. EANM. Austria; 2008.
45. Ferro GAC. *Third Generation Radiopharmaceuticals for Omin and Targeted Therapy*. 4th ed. Vol. 2. *Current Pharmaceutical Analysis*; 2006. 3393–352 p.
46. Papagiannopoulou D. Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications. Vol. 60, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. John Wiley and Sons Ltd; 2017. p. 502–20.
47. OKARVI SM. Recent developments in 99Tcm-labelled peptide-based radiopharmaceuticals. *Nucl Med Commun*. 1999 Dec;20(12).
48. Muchtaridi M, Setyawati LU, Islamiaty RR, Lie KR, Nurhidayah W. The purity identification and radiolabeling of  $\alpha$ -mangostin with technetium-99m. *J Adv Pharm Technol Res*. 11(1):6–12.

49. Borda Olivas B, Belinda Br L, Lovaton T, Mancy Asesor M, Mario Cóndor Escobar lie. FARMACOCINETIGA DE COMPUESTOS MARCADOS CON TECNECIO-99m Y SAMARIO 153. 1997.
50. Harper P v., Lathrop KA, Jiminez F, Fink R, Gottschalk A. Technetium 99m as a Scanning Agent. *Radiology*. 1965 Jul;85(1):101–9.
51. Dash A, Knapp FF (Russ), Pillai MRA. 99Mo/99mTc separation: An assessment of technology options. *Nucl Med Biol*. 2013 Feb;40(2):167–76.
52. Nacional I, Salud DE, de Análisis U, de Evidencias En G, Pública S. Pertecnectato de Sodio Tc99m para el diagnóstico de pacientes con cáncer.
53. Saha G. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 4th ed. USA: Springer; 1998.
54. Escobar Alarcón L., Monroy Guzmán F., Morales Ramírez P., Romero Hernández S. Actividad Científica y Tecnológica en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares [Internet]. [cited 2022 May 18]. Available from: [https://www.inin.gob.mx/documentos/publicaciones/Act\\_Cien\\_y\\_Tec\\_ININ.pdf](https://www.inin.gob.mx/documentos/publicaciones/Act_Cien_y_Tec_ININ.pdf)
55. Michael J. Abrams MJCI tenKate, DASMMHFEGAJFRHRHWS and AJF. Technetium-99m-Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivative for Imaging Focal Sites of Infection in Rats. *The Journal of Nuclear Medicine*. 1990 Dec;31.
56. Conde E. Preparación del radiofármaco 99mTc-HYNIC-[Lis3]-BN. [Toluca]: Universidad Autónoma del Estado de México; 2007.
57. P C, M.D. A. National Human Genome Research Institute [Internet]. [cited 2020 Nov 26]. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Impronta-genetica>
58. de la Fuente A, Zanca R, Boni R, Cataldi AG, Sollini M, Lazzeri E, et al. Miniaturized radiochemical purity testing for 99mTc-HMPAO, 99mTc-HMDP, and 99mTc-tetrofosmin. *J Nucl Med Technol*. 2017 Sep 1;45(3):236–40.
59. Uccelli L, Martini P, Pasquali M, Boschi A. Monoclonal Antibodies Radiolabeling with Rhenium-188 for Radioimmunotherapy. Vol. 2017, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2017.
60. Dhingra VK, Kumar V, Drm D. Meena Negi PhD, Mohit Dhingra MD Quality of radiochemical purity in multiple samples of various fractionated cold kits: Testing a cost & time effective technique [Internet]. Vol. 22, Hell J Nucl Med. 2019. Available from: [www.nuclmed.gr](http://www.nuclmed.gr)
61. De F, Técnica LA, Aplicaciones Y. ESPECTROSCOPIA UV-Vis-NIR.
62. Fernández Reyes Aurora Galván Cejudo E. 27. Métodos para la cuantificación de proteínas.

63. How does the ultraviolet absorption of proteins impact analysis?
64. Maugeri DIP. QUÍMICA BIOLÓGICA TRABAJO DE LABORATORIO N° 1: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DOCENTES: Dante Maugeri y Paula Iribarren Introducción.
65. Lilo T, Morais CLM, Shenton C, Ray A, Gurusinge N. Revising Fourier-transform infrared (FT-IR) and Raman spectroscopy towards brain cancer detection. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022 Jun;38:102785.
66. Mata-Miranda MM, Guerrero-Robles CI, Rojas-López M, Delgado-Macuil RJ, González-Díaz CA, Sánchez-Monroy V, et al. Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica.* 2017 Jan 1;38(1):225–34.
67. Tiernan H, Byrne B, Kazarian SG. ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2020 Nov 5;241:118636.
68. Fernández de K CAMJMJYG. Farmacopea Argentina, Séptima Edición. Vol. III, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.
69. Chain YIL. Radiofármacos en medicina nuclear. Fundamentos y aplicación clínica. 2015.
70. Raúl AUBA, Cabrejas C. Técnicas en Medicina Nuclear: Adquisición, Procesamiento y Presentación de Imágenes Planares. 2000.
71. Raudales Díaz IR. Imágenes diagnósticas: Conceptos y Generalidades.
72. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Rayos X. <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/rayos-x>.
73. Castro M. Los rayos X.
74. García-Lomas Pico LA. Fundamentos Generales de la Radiología Simple. <http://docplayer.es/183521329-Fundamentos-generales-de-la-radiologia-simple.html>.
75. Suplemento para dispositivos médicos, cuarta edición. In: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. cuarta edición. México: FEUM; 2017. p. 918–9.
76. Zaia J, Boynton R, Heinegård D, Barry F. Posttranslational Modifications to Human Bone Sialoprotein Determined by Mass Spectrometry. *Biochemistry.* 2001 Oct 1;40(43):12983–91.
77. Ramos R. Radiomarcaje y Biodistribución mediante SPECT-CT de nanopartículas de seroalbúmina humana con bevacizumab. [Pamplona]: Universidad de Navarra; 2020.

## Radiomarcaje y Biodistribución del péptido BSP-4-23 en ratones BALB/c.

78. Santos C. Efecto del péptido TAT(49-57) sobre la biodistribución y dosimetría de radiofármacos análogos de la Bomesina. [Toluca]: UAEM; 2011.
79. Mendoza M. Marcado, Estabilidad y Evaluación in vitro de Inhibidores de Carboxipeptidasa II. [CDMX]: UNAM; 2016.
80. Ma Y, O. Kiesewetter D, Lang L, Gu D, Chen X. Applications of LC-MS in PET Radioligand Development and Metabolic Elucidation. *Curr Drug Metab.* 2010 Jul 1;11(6):483–93.
81. Siaens RH, Huub ;, Rennen J, Boerman OC, Dierckx R, Slegers G. Synthesis and Comparison of <sup>99m</sup>Tc-Enrofloxacin and <sup>99m</sup>Tc-Ciprofloxacin.
82. AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS. FICHA TÉCNICA Tc99.