



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS**

**“Radiopéptidos Marcados con  $^{18}\text{F}$  para el Diagnóstico Temprano y Específico de Lesiones TumORAles Mediante Tomografía por Emisión de Positrones”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)**

PRESENTA:

**Víctor Manuel Lara Camacho**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez.

MIEMBRO DE COMITÉ TUTOR: Dra. Mercedes Rodríguez Villafuerte.

MIEMBRO DE COMITÉ TUTOR: Dr. Luis Benítez Bribiesca.



posgrado en ciencias físicas  
u n a m

MÉXICO, D.F.

2010



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.

## Resumen

En este proyecto de tesis se trabajó con los péptidos [Tyr<sup>3</sup>]-Octreótido y c(RGDyK) conjugados al agente quelante bifuncional HYNIC. Estas biomoléculas fueron marcadas con el radionúclido emisor de positrones <sup>18</sup>F, que tiene una vida media de 110 minutos. La producción de <sup>18</sup>F se llevó a cabo en el ciclotrón de la Facultad de Medicina de la UNAM vía la reacción nuclear <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F utilizando un blanco de agua enriquecida isotópicamente con <sup>18</sup>O al 97%.

Para el radiomarcado, el <sup>18</sup>F se convirtió primero a la forma química de 4-fluorobezaldehído ([<sup>18</sup>F]FB-CHO) utilizando 4-formil-N,N,N-trimetilanilinio triflato como precursor. La purificación radioquímica del [<sup>18</sup>F]FB-CHO se hizo por Sep-Pak C18 eluido con EtOH, solvente miscible en agua e inyectable. La pureza química y radioquímica se evaluó por cromatografía de líquidos.

Los péptidos conjugados con HYNIC se obtuvieron del Departamento de Materiales Radioactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Para el radiomarcado éstos se hicieron reaccionar con [<sup>18</sup>F]FB-CHO y se incubaron por 25 minutos a una temperatura de 50°C. La purificación del producto final se llevó a cabo por cromatografía de líquidos para obtener [<sup>18</sup>F]FB-CH=N-HYNIC-R, donde R es el péptido.

Después de obtener los péptidos marcados con una pureza radioquímica >95%, se evaluó la biodistribución del [<sup>18</sup>F]FB-CH=N-HYNIC-RGD con estudios de microPET en ocho ratones atómicos inoculados en el lomo con la línea celular C6 (glioblastoma). Las imágenes adquiridas de los sujetos experimentales muestran la captación del radiofármaco por la lesión tumoral. La especificidad de los radiopéptidos fue evaluada por medio del método de bloqueo de receptores, encontrando cinco veces más concentración en el ratón con receptores no bloqueados comparado con el ratón con receptores bloqueados.

## Abstract

In this thesis project the [Tyr<sup>3</sup>]-Octreotide and c(RGDyK) peptides, conjugated to the chelating agent HYNIC, were labeled with the positron-emitting radionuclide <sup>18</sup>F, with a half life of 110 min. The <sup>18</sup>F production was performed by the nuclear reaction <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F using an isotopically enriched water target with <sup>18</sup>O (97%). Irradiations were carried out in the cyclotron accelerator of the Faculty of Medicine-UNAM.

For the radiolabeling process, the <sup>18</sup>F was first converted to the chemical form of 4-fluorobezaldehyde ([<sup>18</sup>F]FB-CHO), using 4-formyl-N,N,N-trimethylanilinium triflate as chemical precursor. The radiochemical purification of [<sup>18</sup>F]FB-CHO was done by Sep-Pak C18 eluted with EtOH. The chemical and radiochemical purities of the product were evaluated using high performance liquid chromatography (HPLC).

HYNIC-peptides conjugates were obtained from the Radioactive Materials Department of the Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. For the radiolabeling process [<sup>18</sup>F]FB-CHO was added to the peptides-conjugates and the mixtures were incubated for 25 min at 50°C. The final purification of product ([<sup>18</sup>F]FB-CH=N-HYNIC-R, where R is the peptide of interest) was performed by HPLC.

Radiopeptides were obtained with a radiochemical purity >95%. The biodistribution of [<sup>18</sup>F]FB-CH=N-HYNIC-RGD was evaluated in C6 (glioma) xenografts in nude mice using a microPET system. Images of the tumor-bearing mice 60 min after injection of tracer showed a contrasting tumor reflecting  $\alpha_v\beta_3$ -targeted tracer accumulation. Receptor-specific-mediated uptake of the tracer was demonstrated by injecting unlabeled c(RGDfK) prior to tracer injection. The blocked tumor showed a fivefold decrease in tracer uptake compared with the unblocked tumor.

## **Dedicatoria**

A mis padres Víctor Ruperto y Gloria por todo su amor y apoyo brindado  
Y a mis hermanos Guadalupe, Alejandro, Miriam y Rubén.

Sinceramente

Víctor Manuel Lara Camacho.

## Agradecimientos Institucionales

### **Por las becas recibidas durante el desarrollo de esta tesis a:**

CONACyT a través del programa de becas de estudios de posgrado nacionales, en el periodo Agosto 2008-Julio 2010.

Coordinación de Estudios de Posgrado, Subdirección de programas Institucionales a través del programa Fomento a la Graduación. Agosto- Octubre 2010.

El Espacio Común de Educación Superior- Santander a través del programa de becas de Movilidad Nacional Santander ECOES-Santander, durante el periodo Enero-Mayo 2008.

### **Por el apoyo recibido en congresos nacionales e internacionales a:**

Programas de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP 2009 y 2010) por el apoyo a congresos nacionales (Congreso Nacional de Física, Acapulco Guerrero, Octubre 2009) e internacionales ( The 13th International Workshop on Targetry and Target Chemistry, Dinamarca, Julio 2010).

Facultad de Medicina por el apoyo recibido en el congreso internacional ( The 13th International Workshop on Targetry and Target Chemistry, Dinamarca, Julio 2010).

### **Y a las siguientes instituciones, por el material y apoyo brindado a:**

Unidad PET/Ciclotrón de la Facultad de Medicina UNAM.

Departamento de Materiales Radiactivos del ININ.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Facultad de Medicina.

Posgrado en Ciencias Físicas, UNAM.

CONACyT a través del proyecto 121652 “Producción de nuevos radionúclidos y radiofármacos para tomografía por emisión de positrones (PET) dirigidos a blancos moleculares específicos”

## Agradecimientos personales

A mi tutor, el Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez por todo el apoyo y dedicación que me brindó durante este proyecto de tesis. Gracias por dirigir mi trabajo, es un honor haber sido su alumno.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Mercedes Rodríguez Villafuerte y en especial al Dr. Luis Benítez Bribiesca por su enseñanzas y comentarios.

A los miembros sinodales por sus correcciones y valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo: Dr. Enrique Estrada Lobato, Dr. Luis Alberto Medina Vázquez, Dra. Guillermina Ferro Flores, Dr. Luis Benítez Bribiesca y al Dr. Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez.

A la Dra. Guillermina Ferro Flores por los insumos proporcionados para la realización de esta tesis, a la Dra. Consuelo Arteaga de Murphy y Dra. Martha Pedraza López por proporcionarnos los animales experimentales.

A mis compañeros de la Unidad PET: Fis. Amando Flores, M. en C. Adolfo Zarate, Dr. Efraín Zamora, Q.F.B. Gabriela Contreras, Fis. Fernando Trejo y de manera muy especial al I.Q.I. Juan Carlos Manrique Arias por sus enseñanzas y su amistad.

A mis amigos de la Maestría Física Médica: Lizbeth, Alberto, Joel, Eduardo, Frida, Karla, Paola, Everardo, Verónica y en especial a Adriana. También a Ricardo Santillán y a la Fis. Jaqueline Vázquez.

A la Dra. María Ester Brandan y al Dr. José F. Recamier Angelini por todo su apoyo para poder ingresar a esta maestría.

A la Sra. Guillermina Moreno por su amistad, a la Lic. Yanalté Herrero y Nelly Mellado por su apoyo en el PCF.

Y no menos importante, a mis padres y hermanos que siempre me han apoyado.

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Capítulo 1. Aceleradores de Partículas Tipo Ciclotrón</b> .....	5
1.1 Introducción .....	5
1.2 Ciclotrón .....	6
1.3 Producción de radionúclidos mediante ciclotrones.....	9
1.4 Ciclotrones para uso médico.....	13
1.5 Producción de radionúclidos para uso médico .....	14
1.5.1 Radionúclidos convencionales para PET.....	15
1.5.2 Radionúclidos no convencionales para PET.....	16
1.6 Ciclotrón RDS 111.....	17
Bibliografía.....	18
<b>Capítulo 2. Conceptos Biológicos</b> .....	19
2.1 Introducción .....	19
2.2 Receptores celulares .....	19
2.3 Aminoácidos y péptidos .....	20
2.4 Sistema nervioso .....	24
2.4.1 Encéfalo.....	24
2.4.2 Barrera hematoencefálica.....	24
2.4.3 Neoplasias intracraneales .....	25
2.5 Procesos característicos de neoplasias .....	26
Bibliografía.....	28
<b>Capítulo 3. Antecedentes de Radiopéptidos</b> .....	29
3.1 Introducción .....	29
3.2 ¿Qué es un radiofármaco? .....	29
3.3 Radiofármacos para diagnóstico.....	30
3.4 Péptidos radiomarcados .....	30
3.4.1 Bombesina (BN).....	32
3.4.2 [Tyr <sup>3</sup> ]-Octreótido (TOC) .....	34

3.4.3	RGD.....	35
3.5	Radiofármacos en México.....	37
	Referencias.....	37
<b>Capítulo 4. Materiales y Métodos.....</b>		<b>41</b>
4.1	Introducción.....	41
4.2	Producción de [ <sup>18</sup> F]Flúor.....	41
4.3	Síntesis del precursor del 4-[ <sup>18</sup> F]fluorobenzaldehido.....	42
4.4	Síntesis del 4-[ <sup>18</sup> F]fluorobenzaldehido.....	43
4.5	Marcado del péptido.....	47
4.6	Cromatografo de líquidos.....	49
4.7	Animales experimentales y consideraciones éticas.....	50
4.8	Adquisición de imágenes microPET.....	51
4.9	Estudios de biodistribución.....	53
4.10	Método de bloqueo de receptores.....	54
	Referencias.....	55
<b>Capítulo 5. Resultados y Discusión.....</b>		<b>57</b>
5.1	Síntesis del precursor de 4-[ <sup>18</sup> F]fluorobenzaldehido.....	57
5.2	Radiosíntesis del 4-[ <sup>18</sup> F]fluorobenzaldehido.....	58
5.3	Radiomarcado del péptido.....	65
5.4	Imágenes moleculares <i>in vivo</i> .....	68
5.5	Especificidad <i>in vivo</i> del [ <sup>18</sup> F]FB-CH=N-HYNIC-RGD.....	69
5.6	Biodistribución del radiopéptido.....	71
	Referencias.....	75
<b>Capítulo 6. Conclusiones.....</b>		<b>76</b>
	Trabajo a futuro.....	77
<b>Referencias.....</b>		<b>78</b>
	Apéndice A.....	83
	Apéndice B.....	84
	Glosario.....	86

## Introducción

La tomografía por emisión de positrones, PET por sus siglas en inglés (Positron Emission Tomography), es hoy en día una poderosa herramienta no invasiva para el diagnóstico *in vivo* por medio de imágenes funcionales que proporcionan información a nivel molecular sobre los órganos y tejidos bajo estudio. Esta técnica de la medicina nuclear molecular se basa en el uso de radionúclidos emisores de positrones incorporados a moléculas específicas de interés biológico. Frecuentemente sirve como complemento a otras técnicas de diagnóstico por imagen como tomografía computada (CT) o resonancia magnética (MRI) que proporcionan información anatómica o estructural, mientras que el PET proporciona información metabólica y funcional.

Los radionúclidos empleados en PET tienen la propiedad de decaer por emisión de positrones, antipartículas que experimentan el proceso de aniquilación tan pronto interactúan con los electrones en el medio. De este proceso se producen dos fotones cuya suma de energía es igual a la suma de las masas en reposo del electrón- positrón (1.022 MeV). A los fotones generados se les conoce como fotones de aniquilación, poseen igual energía y siguen un camino antiparalelo, es decir la dirección de uno respecto a otro es de 180°.

Para un estudio PET es necesario la aplicación intravenosa y biodistribución de un radiofármaco, que sigue una ruta metabólica específica y posee un radionúclido cuya vida media es relativamente corta (de minutos a algunas cuantas horas). Posteriormente se adquiere el estudio en una cámara PET, la cual consiste de miles de pequeños detectores de un material con número atómico relativamente alto, los cuales están distribuidos en una serie de anillos que rodean al paciente. Los fotones de aniquilación provenientes del cuerpo del paciente son la radiación registrada por el conjunto de detectores y proporcionan información espacio-temporal de la biodistribución del radiofármaco. A la forma de adquirir los datos se le conoce como detección en coincidencia; término que se refieren al hecho de registrar la señal de dos fotones (antiparalelos y provenientes de una misma aniquilación) que cumplan con una determinada energía (ventana de energía) y un tiempo determinado (ventana temporal). Ambas restricciones sirven para discriminar fotones que hayan sufrido alguna interacción previa antes de llegar a los detectores. La reconstrucción de la imagen se lleva a cabo empleando diferentes algoritmos de reconstrucción como retroproyección filtrada (FBP) y maximización de expectativas de subconjuntos ordenados (OSEM), entre otros.

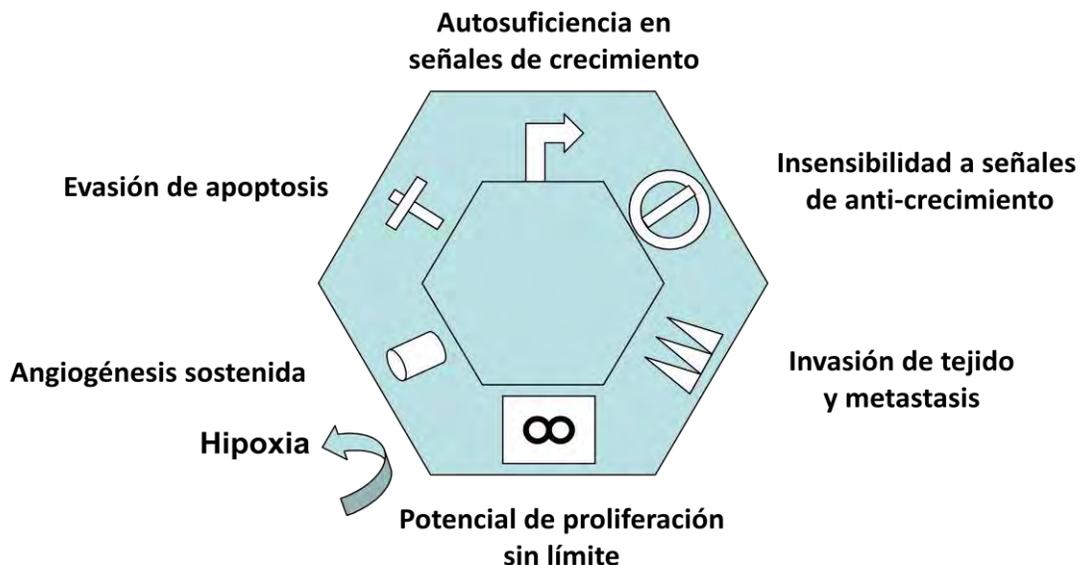
Entre los beneficios de un estudio PET se encuentran:

- La obtención de información bioquímica y fisiológica a nivel molecular que se logra a partir de la biodistribución del radiofármaco.
- La detección de neoplasias incluso antes de que se presenten los primeros síntomas (etapas tempranas de tumorigénesis)

Los radionúclidos más empleados en PET son  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  y  $^{18}\text{F}$ , ya que son radioisótopos de elementos que se encuentran en muchas biomoléculas (a excepción del  $^{18}\text{F}$ , pero éste sustituye a un hidrógeno o a un grupo hidroxilo (OH) en la síntesis del marcado de muchas moléculas, un ejemplo se tiene en la [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorodeoxiglucosa, el radiofármaco estándar marcado con  $^{18}\text{F}$ ).

Actualmente los estudios PET se realizan para visualizar un gran número de patologías como son: procesos cardiológicos (perfusión, isquemia, viabilidad cardiaca), neurológicos (Alzheimer, Parkinson, infartos cerebrales, epilepsias) y una gran variedad de procesos oncológicos que pueden aparecer en cualquier tejido. Siendo este último grupo (sin restar importancia a los dos primeros) el que ha alcanzado mayor incidencia tanto en el área clínica como en el área de investigación, ya que la gran mayoría de estos procesos presentan características similares en cuanto a sus etapas de desarrollo.

Se han clasificado seis etapas que presentan la gran mayoría de los procesos neoplásicos durante su desarrollo [Hanahan y Weinberg 2000], las cuales son: 1) autosuficiencia en señales de crecimiento, 2) insensibilidad a señales de anti-crecimiento, 3) evasión de apoptosis, 4) potencial de proliferación sin límites e hipoxia, 5) angiogénesis sostenida y 6) invasión de tejidos y metástasis (como se muestra en la figura siguiente)



Etapas de desarrollo de procesos neoplásicos (Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2000)

La presente tesis se desarrolló en la Unidad PET de la Facultad de Medicina de la UNAM, la cual cuenta con un ciclotrón para la producción de radionúclidos para uso médico; un laboratorio de radiofarmacia completamente equipado para la producción y control de calidad de radiofármacos, un equipo microPET para roedores pequeños donde se realizan los estudios preclínicos de los radiofármacos producidos en la Unidad; y un equipo moderno de PET/CT de 64 cortes para estudios clínicos en humanos.

El proyecto consistió en el radiomarcado de biomoléculas con  $^{18}\text{F}$ , que entre sus características físicas se encuentra su vida media de 110 min, tiempo que permite realizar diferentes pruebas en los radiofármacos producidos. Se trabajó con péptidos, biomoléculas que juegan un papel importante en diversos procesos bioquímicos y metabólicos. Los péptidos [Tyr<sup>3</sup>]-Octreótido (TOC), cuya secuencia de aminoácidos es: DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys- Thr(OL), y c(RGDyK) con secuencia: Arg-Gly-Asp-Tyr-Lys fueron radiomarcados con este radionúclido emisor de positrones ( $^{18}\text{F}$ ). Actualmente estos mismos péptidos han sido marcados con emisores gammas ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e  $^{111}\text{In}$ ) y se conocen en el ámbito clínico empleándolos en el diagnóstico por SPECT.

La motivación del proyecto se debe que a nueve años de estar utilizando el PET como técnica de diagnóstico en México, el radiofármaco [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorodeoxiglucosa ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG) sigue siendo utilizado de manera casi universal para el estudio de todo tipo de neoplasias. Este marcador del metabolismo de glucosa no es específico para el estudio de procesos neoplásicos, ya que existen otros procesos como la infección o la inflamación que también captan glucosa y en contraste existen procesos malignos que no captan glucosa. De ahí la necesidad de contar con radiofármacos más específicos que permitan un mejor diagnóstico clínico por PET. El sintetizar radiofármacos con péptidos se debe al hecho de que algunas de estas biomoléculas son necesarias en procesos bioquímicos y metabólicos, y otros actúan como ligando de receptores expresados en diferentes procesos tumorales.

Los objetivos del presente trabajo son:

### *Objetivo General:*

Preparar diferentes péptidos marcados con  $^{18}\text{F}$  y evaluar su uso como radiofármacos potenciales para el diagnóstico temprano y específico de neoplasias malignas mediante PET.

### *Objetivos Específicos:*

a) Producir el radionúclido  $^{18}\text{F}$  en el ciclotrón y convertirlo a la forma química de [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CHO (fluorobenzaldehído) en el módulo de síntesis química CPCU.

b) Preparar los diferentes radiopéptidos en formulación farmacéutica con pureza radioquímica mayor a 95%.

c) Realizar los estudios preclínicos mediante imágenes por microPET en líneas celulares de modelos tumorales inoculados en ratones atómicos.

La tesis se divide en 6 capítulos:

Capítulo 1. El capítulo se dedica al ciclotrón, se describe su funcionamiento y la producción de radionúclidos para uso médicos mediante este acelerador (radionúclidos para PET principalmente), tanto radionúclidos convencionales como no convencionales.

Capítulo 2. Contiene los conceptos biológicos, en el capítulo se habla acerca de receptores, péptidos, sistema nervioso y de los gliomas como una de las patologías del tejido nervioso.

Capítulo 3. Los antecedentes del radiomarcado de los péptidos se encuentran contenidos en este capítulo, dando una visión general de un radiofármaco y los tres péptidos más comunes empleados como antagonistas específicos para visualizar blancos moleculares en diferentes etapas de procesos neoplásicos.

Capítulo 4. El capítulo versa de los materiales y métodos empleados para realizar las diferentes síntesis, el radiomarcado del péptido y de los procesos de purificación para obtener un producto inyectable; así mismo se habla de los estudios preclínicos usando ratones atómicos.

Capítulo 5. Se muestran los resultados obtenidos en este proyecto, que van desde la síntesis química del precursor, la radiosíntesis del fluorobenzaldehído, el radiomarcado y rendimiento obtenido para dos péptidos, así como los resultados de la biodistribución del radiofármaco después de la aplicación en ratones atómicos y sus respectivas imágenes mediante micro-tomografía por emisión de positrones.

Capítulo 6. Contiene las conclusiones de este proyecto de tesis.

Al final se anexan las referencias generales y diferentes apéndices que complementan conceptos y un glosario con términos utilizados en este trabajo.

# Capítulo 1. Aceleradores de Partículas Tipo Ciclotrón

## 1.1 Introducción

El desarrollo tecnológico y el descubrimiento de la radioactividad trajeron consigo el interés por estudiar y aplicar la radiación a diferentes campos, como el clínico. Un avance que involucró ambos puntos fue el desarrollo de aceleradores de partículas, permitiendo producir radionúclidos nuevos y fabricar los que se encuentran de manera natural debido al decaimiento de núcleos radiactivos con vida media larga, como son los generados por los átomos padres en las series radiactivas.

La característica principal en los aceleradores se encuentran en el haz de partículas (flujo de partículas que viajan de manera coherente, poseen una determinada velocidad y energía); ya que éste debe tener la energía mínima necesaria para llevar a cabo una reacción nuclear ( $\sim 8$  MeV) y debe contar con la suficiente fluencia para obtener un buen rendimiento de las reacciones. Los diferentes tipos de aceleradores que se desarrollaron para este propósito son: LINAC, Tandem, Van de Graaff y ciclotrones, ganando terreno este último sobre los otros aceleradores en el área de la producción de radionúclidos.

El interés por las aplicaciones de la radiación en el área médica surge al final de los años 20s y principio de los 30s, empleando radionúclidos naturales en estudios de seguimiento (radiotrazadores). En sus inicios, el uso médico de material radiactivo fue limitado por sus características desfavorables para el metabolismo en pacientes, pero afortunadamente el auge potencial en este campo se logró tan pronto como se pudo producir radionúclidos artificiales con vida media corta.

Con el desarrollo del primer ciclotrón, en 1934 por Ernest Lawrence en Berkeley California, la producción de radioisótopos artificiales fue optimizada; transformando un elemento a otro, hecho demostrado por Rutherford desde 1919. Actualmente las partículas aceleradas en los ciclotrones pueden alcanzar energías muy altas comparadas con el primer prototipo que aceleraba partículas a energías alrededor de 1.2 MeV. Más tarde, y después de la segunda guerra mundial, surge el interés por el uso de los reactores nucleares para la producción de radionúclidos, donde a diferencia de los aceleradores, la activación de núcleos estables se realiza con neutrones. Actualmente el uso de los reactores es menos común que el uso de ciclotrones en la producción de radionúclidos para medicina nuclear, la cual tuvo un avance favorable con la invención de la cámara gamma en 1950 por Hall Anger y posteriormente con el desarrollo de cámaras PET en los 70s por Michael Phelps.

## 1.2 Ciclotrón

El acelerador de partículas cargadas más utilizado en la producción de radionúclidos para el área médica es el ciclotrón, principalmente para Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y algunos otros para Tomografía Computada por Emisión de Fotón Único (SPECT) y gammagrafía convencional. El proceso de producción está basado en el bombardeo de un material blanco con un haz de partículas cargadas capaces de inducir una reacción nuclear en los átomos del mismo, transformándolo en otro elemento.

El funcionamiento del ciclotrón se basa en la aceleración de iones (partículas cargadas) a través de campos electromagnéticos. El proceso se fundamenta en la teoría electromagnética que dice: cuando una partícula cargada viaja dentro de un campo magnético uniforme, perpendicular al plano de su trayectoria, la partícula tiende a describir una trayectoria circular con radio  $r$ , es decir:

$$qvB = \frac{\gamma mv^2}{r} \quad 1.1$$

Dónde:

- $q$ : Es la carga de la partícula (C)
- $v$ : Es la velocidad de la partícula (m/s)
- $B$ : Es el campo magnético (T)
- $m$ : Es la masa de la partícula (kg)
- $r$ : Es el radio de la trayectoria (m)
- $\gamma$ : Es el factor relativista que involucra la velocidad de la luz  $c$ , es decir:

$$\gamma = (1 - v^2/c^2)^{1/2}$$

La velocidad angular ( $w$ ) y la frecuencia de la partícula ( $f$ ) están determinadas, respectivamente por:

$$w = \frac{v}{r} = \frac{qB}{\gamma m} \left[ \frac{rad}{s} \right] \quad 1.2$$

$$f = \frac{w}{2\pi} = \frac{qB}{2\pi\gamma m} \quad 1.3$$

Sin embargo, si la velocidad de la partícula es tal que  $v \ll c$ , no es difícil ver que el factor  $\gamma \sim 1$ , en otras palabras, la frecuencia de la partícula es constante ( $f_0$ ), y puede escribirse como:

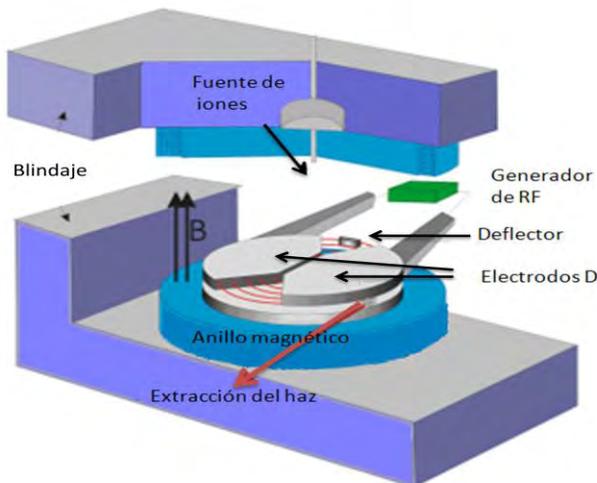
$$f_0 = \frac{qB}{2\pi m} \quad 1.4$$

Por lo tanto para poder acelerar la partícula se requiere emplear una radiofrecuencia (campo eléctrico oscilante) la cual acelera a la partícula incrementando su radio en cada revolución. La energía de la partícula con el máximo radio  $R$  está determinada por la expresión siguiente:

$$E(J) = \frac{mv^2}{2} = \frac{q^2 B^2 R^2}{2m} \quad 1.5$$

En resumen, el funcionamiento de este tipo de acelerador se basa en la frecuencia rotacional de una partícula cargada que viaje en un campo magnético, la cual es independiente del radio de la órbita.

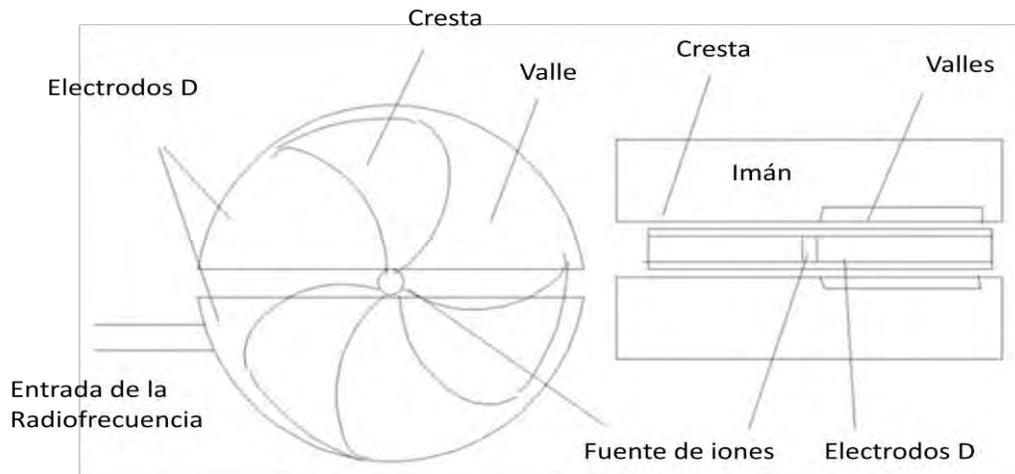
Los componentes principales de un ciclotrón son: una fuente de iones, electroimanes, electrodos D, un generador de radiofrecuencia, deflectores de haz, sistema de vacío y blindaje. (Figura 1.1)



**Figura 1.1.** Componentes de un ciclotrón.

El proceso para producir un haz de partículas cuya energía es suficiente para llevar a cabo una reacción nuclear inicia con la producción de iones, comúnmente se aceleran iones negativos del hidrógeno ( $H^-$ ) para obtener un haz de protones listo para bombardear el blanco. También existen ciclotrones que aceleran iones positivos tales como  $H^+$ ,  $^3He^+$  y  $^4He^+$ . En ambos casos la fuente de iones puede encontrarse en el interior de la cámara de aceleración (Figura 1.2) o puede hallarse de forma externa a la cámara. La preferencia en acelerar iones negativos sobre positivos radica en la extracción del haz, como se verá más

adelante en la Tabla 1.1 donde se muestran las principales ventajas y desventajas en acelerar ambos tipos de iones.

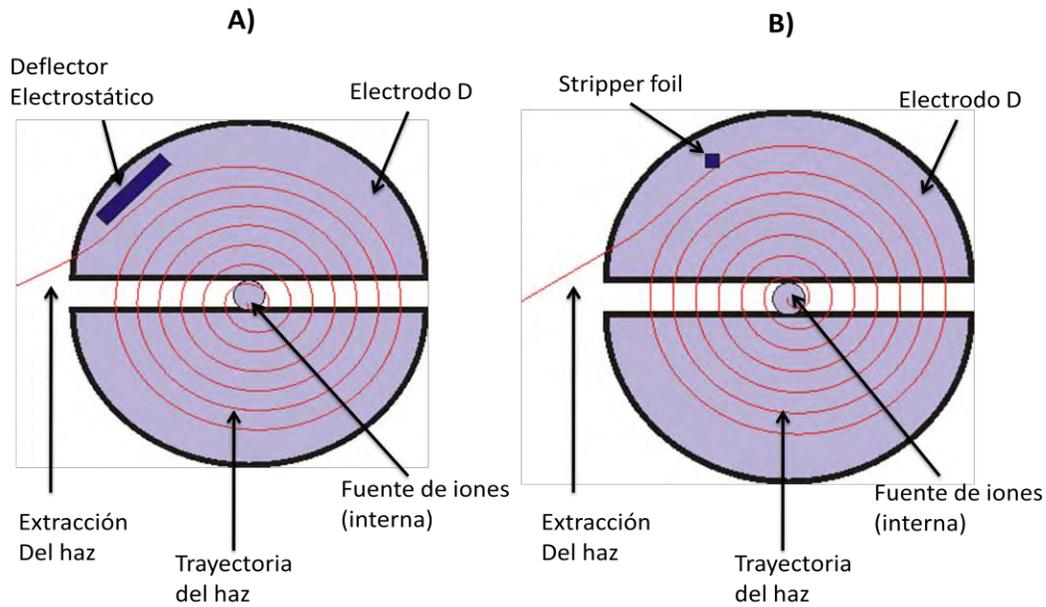


**Figura 1.2.** Estructura de un ciclotrón mostrando los electrodos D y la fuente de iones dentro de la cámara de aceleración. (Adaptado de IAEA TRS 465).

Posteriormente a la producción de iones, éstos son conducidos y montados en una onda de radiofrecuencia cuya función es acelerarlos dentro de la cámara de vacío; una vez dentro, los iones sentirán además del campo eléctrico, un campo magnético el cual los mantendrá en una órbita circular mientras son acelerados, pasando entre la cavidad formada entre los electrodos D.

La energía de la partícula se incrementa conforme la velocidad de la misma se incrementa. De esta manera con el ciclotrón se puede acelerar partículas a altas energías en un espacio relativamente pequeño.

La extracción del haz depende del tipo de iones que se aceleran; para iones positivos se requiere un deflector (campo electrostático) que direcciona el haz hacia el puerto de extracción (Figura 1.3 A). El método es poco eficiente ya que se pierde entre el 30-40% del haz mediante interacciones con los componentes adyacentes y el mismo deflector. En contraste para iones negativos se emplean láminas de grafito conocidas como “stripper foils”, las cuales cambian la polaridad del haz, arrancando los electrones de los iones negativos (hidrógeno ionizado) para obtener un haz de protones; mismo que es canalizado hacia el blanco a irradiar justo en el momento en que cambia de polaridad, ya que en ese instante la trayectoria de la partícula tiende a cambiar de dirección (Figura 1.3 B). El vacío necesario en diferentes ciclotrones para la aceleración de partículas se logra a través del uso de bombas que pueden ser del tipo difusoras y criogénicas, entre otras. Los vacíos típicos requeridos son del orden  $10^{-7}$  Torr.



**Figura 1.3.** Extracción de iones. A) de un ciclotrón que acelera iones positivos y B) de un ciclotrón que acelera iones negativos.

**Tabla 1.1.** Extracción de iones de un acelerador de partículas tipo ciclotrón.

Iones Positivos	Iones Negativos
Haz con una sola energía	Haz con energía variable.
Eficiencia de extracción ~ 60-70%	Eficiencia de extracción ~ 100%
Uso de deflectores electrostáticos	Uso de láminas de carbón (stripper foils)
Mayor activación en los componentes	Menor activación en los componentes
Extracción de un solo haz	Posibilidad de extraer haces múltiples
Producción de un radionúclido	Producción simultánea de dos radionúclidos diferentes.

### 1.3 Producción de radionúclidos mediante ciclotrones

Actualmente el uso de radionúclidos se ha incrementado en áreas que involucran investigación básica en áreas biológicas, e incluso han ganado terreno en aplicaciones en la industria. El procedimiento utilizado para producir diferentes núcleos radiactivos se basa en el uso de aceleradores, como el ciclotrón, o por medio de reactores. Sin embargo, la

elección de emplear uno u otro está determinada por el tipo de radionúclido a producir y la forma de como producirlo. Las principales diferencias entre estos dos dispositivos se encuentran enunciadas en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Diferencias principales en el uso de un ciclotrón y un reactor.  
(Adaptado de Ávila-Rodríguez et al. 2010)

	Ciclotrón	Reactor
Activación por	Partículas cargadas	Neutrones
Reacción	$(p, X) \longrightarrow (p, n)$	$(n, X) \longrightarrow (n, \gamma)$
Fluencia	$\sim 10^{14} \text{ p/s-cm}^2$	$\sim 10^{12-15} \text{ n/s-cm}^2$
Sección transversal	mb	b
Actividad obtenida	mCi-Ci	kCi
Producto emisor típico	$\beta^+$ o $CE$	$\beta^-$

La principal ventaja a favor del uso de ciclotrones se encuentra en que el producto hija es diferente al blanco (padre), es decir la reacción nuclear comúnmente es de tipo  $(p, n)$  o  $(p, \alpha)$ , por consiguiente se obtendrá un elemento distinto al irradiado. Una manera más general para indicar las reacciones es  $(p, X)$  donde  $X$  denota cualquier producto posible debido a la reacción nuclear, como pueden ser:  $n, 2n, np, \alpha$ , etc. En contraste, en los reactores la principal reacción nuclear que se lleva a cabo es del tipo  $(n, \gamma)$ , donde el producto hija es un isótopo del elemento padre, lo que implica un método complejo para separarlos (reactor), mientras que en el primer caso es fácil encontrar un método químico o físico para separar el producto del padre. Las impurezas radioquímicas que se genera son menores y fáciles de separar, y finalmente la actividad específica obtenida con un ciclotrón es mucho mayor comparada a la actividad específica obtenida en un reactor.

La actividad específica (AE) de un radionúclido se define como la actividad por unidad de masa, frecuentemente se encuentra en unidades de actividad por mol (Ci/mol o Bq/mol), y se calcula teóricamente con las ecuaciones siguientes:

$$AE = N_a \lambda [Bq/mol] \quad \text{o bien} \quad AE = \frac{1.13 \times 10^7}{\tau_{1/2}} \left[ \frac{Ci}{\mu mol} \right] \quad 1.6$$

Dónde:

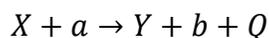
- $N_a$ : Es el número de Avogadro (átomos/mol)
- $\lambda$ : Es la constante de decaimiento del radionúclido (1/s)
- $\tau_{1/2}$ : Vida media del radionúclido (s)

No es posible comparar actividades específicas de diferentes radionúclidos, puesto que las ecuaciones 1.6 favorecen a radionúclidos con vida media corta, véase Tabla 1.3. Es común obtener experimentalmente actividades específicas muy bajas comparadas con las teóricas, ya que una muestra puede contener otros isótopos del mismo elemento actuando como acarreadores (isótopos no radiactivos del radionúclido, que sirve como transporte del producto de activación).

**Tabla 1.3.** Actividades específicas para 3 emisores de positrones

Radionúclido	AE (Ci/ $\mu$ mol)	Vida Media
$^{18}\text{F}$	1712	110 min
$^{64}\text{Cu}$	246	12.7 h
$^{86}\text{Y}$	213	14.7 h

Para que pueda llevarse a cabo una reacción nuclear en un ciclotrón, es necesario que la partícula proyectil contenga la energía suficiente para superar dos barreras; la primera es la barrera coulombiana, donde se requiere vencer la repulsión electrostática debida a la interacción del proyectil con el núcleo atómico del elemento irradiado y la segunda es la energía umbral de la reacción. Una reacción nuclear se denota como:



Dónde:  $X$  es la partícula blanco a irradiar,  $a$  es la partícula incidente,  $Y$  es el producto hija,  $b$  es la partícula emitida y el valor  $Q$  está dado por el defecto en masa de la reacción, que puede ser positiva o negativa según la reacción sea exotérmica ( $Q > 0$ ) o endotérmica ( $Q < 0$ ), es decir:

$$Q(\text{MeV}) = \Delta mc^2 \quad , \quad \Delta m = (M_x + m_a) - (M_y + m_b)$$

Dónde:  $M$  y  $m$  son las masas respectivas para cada una de las partículas involucradas en la reacción.

A la energía mínima necesaria para que ocurra la reacción nuclear se le conoce como energía umbral ( $E_{th}$ ) y está dada por:

$$E_{th} = -\left(\frac{m_a + M_x}{M_x}\right) Q \quad 1.7$$

Dado el hecho de que los productos de activación empiezan a decaer tan pronto como son formados durante el bombardeo, eventualmente se puede llegar a un estado de equilibrio, en el que la tasa de producción es igual a la tasa de desintegración. De esta manera, la tasa neta de producción está gobernada por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dN}{dt} = R - N\lambda \quad 1.8$$

Dónde:

- $N$ : Es el número de átomos presentes al tiempo  $t$  durante el bombardeo
- $R$ : Es la tasa de transformación (tasa de producción)
- $N\lambda$ : Es la tasa de desintegración

La solución a la ecuación anterior está dada por:

$$R = \frac{N\lambda}{(1 - e^{-\lambda t})} \quad 1.9$$

Donde el término  $(1 - e^{-\lambda t})$  se le conoce como factor de saturación. No es difícil ver que para un tiempo de irradiación largo, es decir  $t \gg 1/\lambda$ , el factor de saturación  $(1 - e^{-\lambda t}) \sim 1$ , en otras palabras, la tasa de desintegración se aproxima a la tasa de producción. A esto se le conoce como saturación, y nos indica que la actividad en la cámara del blanco irradiado permanecerá constante sin importar cuánto tiempo se continúe irradiando. La saturación comúnmente se alcanza, de manera aproximada, con un tiempo de bombardeo comparable a cinco vidas medias del radionúclido producido, un ejemplo se tiene en la producción del  $^{18}\text{F}$ , cuya saturación es alcanzada alrededor de las 9 horas de bombardeo.

La sección transversal representa la probabilidad de que una reacción nuclear se lleve a cabo, de que un núcleo se transforme a otro para una energía dada de la partícula incidente. La relación entre la sección transversal y la energía de la partícula incidente para una reacción nuclear se le conoce como función de excitación. Esta función determina la cantidad de producción de un radionúclido de interés y los niveles de contaminación de otros radionúclidos debidos a impurezas en el material blanco.

El rendimiento de la reacción está dado por la integral sobre la energía de la sección transversal dividida entre el poder de frenado. Otros factores que intervienen en el rendimiento de la producción de un radionúclido son: la densidad atómica del blanco (# de

núcleos por  $cm^3$ ), la corriente del haz, la fracción de enriquecimiento del blanco, así como el factor de saturación; matemáticamente el rendimiento se calcula por:

$$Y_{EOB} = \frac{N_A \rho}{A_w} f I (1 - e^{-\lambda t}) \int_{E_1}^{E_2} \left( \frac{dE}{dx} \right)^{-1} \sigma(E) dE$$

Dónde:

- $N_A$ : Número de Avogadro (átomos/mol)
- $\rho$ : Densidad del material ( $g/cm^3$ )
- $A_w$ : Masa atómica (g/mol)
- $f$ : Fracción de enriquecimiento
- $t$ : Tiempo de bombardeo
- $\frac{dE}{dx}$ : Poder de frenado
- $\sigma$ : Sección transversal
- $I$ : Corriente del haz
- $1 - e^{-\lambda t}$ : Factor de saturación

## 1.4 Ciclotrones para uso médico

Una de las aplicaciones de los radionúclidos con mayor auge es sin duda la medicina nuclear, en la cual se pueden clasificar dos grandes grupos: diagnóstico y terapia. El área de diagnóstico se subdivide en imágenes tipo SPECT, imágenes tipo PET e imágenes gammagráficas, en las tres técnicas se emplean radionúclidos artificiales producidos por medio de ciclotrones o reactores.

Actualmente se encuentran instalados alrededor de 600 ciclotrones en el mundo dedicados a la producción de radionúclidos y se continúa en su desarrollando tecnológico. Algunos son para investigación y muchos otros son ciclotrones comerciales (“low-cost”) en los cuales se fabrican radionúclidos para medicina nuclear. A este tipo de ciclotrones se les conoce como ciclotrones biomédicos compactos o simplemente ciclotrones para uso médico (comúnmente aceleran partículas a energías entre 10-19 MeV). Cabe señalar que en cuanto mayor es la energía que alcanza la partícula acelerada, aumenta la probabilidad de que ocurran otras reacciones nucleares produciendo impurezas en el producto de interés.

En la elección de un ciclotrón para uso médico entran factores como costo, mantenimiento y sobre todo el objetivo de su aplicación (¿qué o cuáles radionúclidos se pretende producir?). Los ciclotrones para la producción de radionúclidos para uso médico

pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de partícula que aceleran y a la energía que adquiere, tal como se muestra en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4.** Clasificación de ciclotrones usados en la producción de radionúclidos  
Protón: p, Deuterón: d. (Adaptado de Ávila-Rodríguez et al. 2010)

Clasificación	Característica	Energía (Mev)
Energía baja	Partícula única: p, d	Hasta 11
Energía intermedia	única/dual: p-d	12-19
Energía Media	única/dual p-d	20-30
Energía Alta	Múltiples partículas	30-70

## 1.5 Producción de radionúclidos para uso médico

Existen cientos de radionúclidos que son producidos vía una reacción nuclear con partículas cargadas y muchos de ellos son fabricados para fines médicos. Actualmente una gran cantidad de moléculas son radiomarcadas con estos emisores de radiación para obtener radiofármacos (comúnmente inyectables): emisores alfas y emisores beta para tratamiento, o emisores gamma y emisores de positrones para diagnóstico (Tabla 1.5). En el área de diagnóstico clínico es condición necesaria que la radiación emitida por el decaimiento del radionúclido posea energía suficiente para escapar del cuerpo del paciente y poder ser detectada por un equipo de imagen (SPECT o PET) y una segunda condición es la vida media del radionúclido, la cual debe ser lo bastante larga para realizar el estudio y lo bastante corta para que decaiga en un tiempo relativamente razonable después de haber realizado el mismo.

**Tabla 1.5.** Radionúclidos comunes para estudios de diagnóstico  
(SPECT y PET) y Radioterapia. (IAEA # 465)

SPECT	Vida media (h)	PET	Vida media (min)	Radioterapia	Vida media (h)
<sup>99m</sup> Tc	6.0	<sup>11</sup> C	20	<sup>90</sup> Y	64.0
<sup>123</sup> I	13.1	<sup>18</sup> F	110	<sup>177</sup> Lu	161.5
<sup>201</sup> Tl	73.1	<sup>15</sup> O	2	<sup>131</sup> I	192.0
<sup>67</sup> Ga	78.2	<sup>13</sup> N	10	<sup>211</sup> At	7.2

La producción de un tipo de radionúclido involucra diferentes factores como son: el blanco a irradiar que puede ser líquido, gas o sólido; la partícula que incide sobre él; y el método de irradiación, el contenedor del blanco y material del mismo; el proceso de

enfriamiento y la separación del producto; a todos estos factores en conjunto se le conoce como “targetry”.

En los 80s se desarrollaron ciclotrones específicos para producir radionúclidos para PET y fueron instalados en diversos hospitales. Los radionúclidos pueden clasificarse en radionúclidos convencionales y no convencionales, de acuerdo con la facilidad de producirlos; involucrando el tipo de blanco y su enriquecimiento, así como la energía de la partícula incidente.

### 1.5.1 Radionúclidos convencionales para PET

Se les conoce como radionúclidos convencionales para PET al  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  y  $^{18}\text{F}$ , conocidos como la secuencia principal CNOF. Estos radionúclidos son producidos en ciclotrones que manejan energías bajas/intermedias, es decir aquéllos que aceleran partículas en un rango entre 10- 19 MeV; las reacciones nucleares que se favorecen a estas energías son  $(p, n)$  y  $(p, \alpha)$ . Los blancos que se emplean comúnmente son líquidos y gaseosos, tanto blancos isotópicamente enriquecidos como no enriquecidos (isótopos de elementos naturales con abundancia cercana al 100%). Las características principales de los radionúclidos convencionales se muestran en la tabla 1.6.

**Tabla 1.6.** Radionúclidos convencionales para PET.

Radionúclido	$\tau_{1/2}$ (min)	Reacción	Blanco
$^{11}\text{C}$	20.3	$^{14}\text{N}(p, \alpha)$	$[\text{nat}^*\text{N}]\text{N}_2 + 2\% \text{O}_2$
$^{13}\text{N}$	9.97	$^{16}\text{O}(p, \alpha)$	$[\text{nat}^*\text{O}]\text{H}_2\text{O} + 5 \text{ mM EtOH}$
$^{15}\text{O}$	2.03	$^{15}\text{N}(p, n)$	$[\text{nat}^*\text{N}]\text{N}_2 + 2.5\% \text{O}_2$
$^{18}\text{F}$	110	$^{18}\text{O}(p, n)$	$[\text{nat}^*\text{O}]\text{H}_2\text{O}$

\*nat: Radionúclido natural, con abundancia cercana al 100%.

Uno de los radionúclidos de esta secuencia principal CNOF para PET es el  $^{18}\text{F}$ , que juega un papel importante en el radiomarcado de moléculas para esta modalidad de diagnóstico, como ejemplo se tiene la fluorodeoxiglucosa (radiofármaco estándar).

Este isótopo del flúor puede ser producido tanto en forma iónica ( $^{18}\text{F}^-$ ), como en forma molecular ( $^{18}\text{F}_2$ ). Generalmente la producción del flúor es en forma iónica, y puede obtenerse por medio de diferentes reacciones nucleares. La más común es vía la reacción nuclear  $^{18}\text{O}(p, n)$  empleando un blanco enriquecido de  $[\text{nat}^*\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ . Otra forma de obtener este radioisótopo es mediante la reacción nuclear  $^{16}\text{O}(^3\text{He}, p)$ , cuya principal ventaja reside en el uso de un blanco natural ( $^{16}\text{O}$ ) lo que implica bajo costo; desafortunadamente existen pocos ciclotrones que aceleran iones de  $^3\text{He}$ , además de que la reacción nuclear compite con

$^{16}\text{O}(^3\text{He},\alpha)^{15}\text{O}$ . Esto se resume mejor en la Tabla 1.7. Las características físicas del radionúclido  $^{18}\text{F}$  se ilustran en la Tabla 1.8.

**Tabla 1.7** Producción de  $^{18}\text{F}$  iónico.

Reacción nuclear	Blanco
$^{18}\text{O}(p,n)$	$[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ enriquecido
$^{16}\text{O}(^3\text{He},p)$	$[^{16}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ natural

**Tabla 1.8.** Características físicas del ión  $^{18}\text{F}$

Tipo de radionúclido	Halógeno
Vida Media	110 min
Emisor	$\beta^+$ (97% ) y CE
* $E_{max}$	630 keV
** $R_{max}$	2.4 mm
* $E_{pro}$	250 keV
** $R_{pro}$	0.6 mm

\*Se refiere a la energías máxima ( $E_{max}$ ) y promedio ( $E_{pro}$ ) del positrón emitido por el  $^{18}\text{F}$ . \*\* Similarmente, los alcances máximo y promedio de esta partícula en agua están denotados por  $R_{max}$  y  $R_{pro}$ , respectivamente.

## 1.5.2 Radionúclidos no convencionales para PET

Los radionúclidos no convencionales para PET son todos aquellos no incluidos en la secuencia principal CNOF (véase Tabla 1.9). No en todos los casos los radionúclidos de esta tabla pueden producirse a energías de 11MeV, por lo que su producción involucra ciclotrones que aceleran partículas a energías mayores, lo que permite ampliar la gama de reacciones nucleares, puesto que a mayor energía se incrementa la probabilidad de que ocurran diferentes reacciones nucleares. Sin embargo, esto también puede ser una desventaja ya que al ocurrir distintas reacciones nucleares en el mismo blanco irradiado se producen diferentes productos de activación junto con el radionúclido de interés, que fungen como impurezas radionuclídicas, por lo tanto es necesario estudiar la función de excitación para conocer la energía óptima para favorecer las reacciones nucleares deseadas.

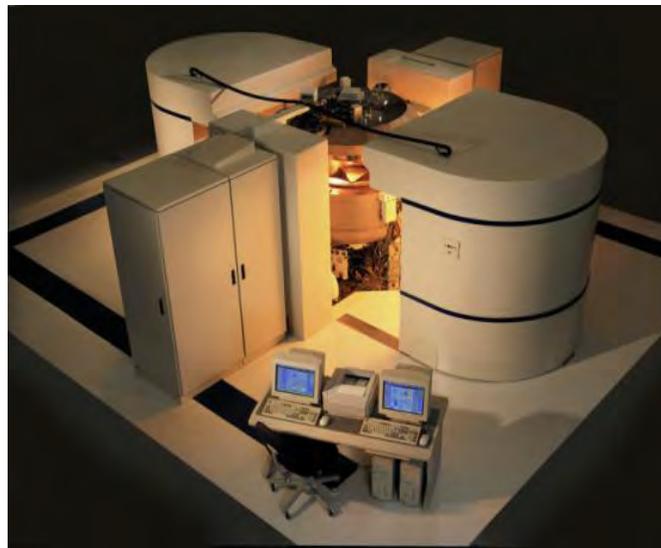
Los blancos para la producción de radionúclidos no convencionales son comúnmente compuestos sólidos, los cuales típicamente son electrodepositados en un soporte cuyas características son: un alto punto de fusión, buena conductividad térmica, y que no reaccionen químicamente, o en bajo grado, con el material blanco. Otra característica de este tipo de radionúclidos no convencionales es su bajo porcentaje de emisión de positrones comparado con los radionúclidos convencionales.

**Tabla 1.9.** Radionúclidos no convencionales para PET.

Radionúclido	$\tau_{1/2}$ (h)	% $\beta^+$	Reacción	% Abundancia del blanco
$^{55}\text{Co}$	17.5	76	$^{58}\text{Ni}(p, \alpha)$	68
$^{60}\text{Cu}$	0.4	93	$^{60}\text{Ni}(p, n)$	26
$^{61}\text{Cu}$	3.3	62	$^{61}\text{Ni}(p, n)$	1
$^{64}\text{Cu}$	12.7	18	$^{64}\text{Ni}(p, n)$	1
$^{66}\text{Ga}$	9.5	56	$^{66}\text{Zn}(p, n)$	28
$^{76}\text{Br}$	16.2	55	$^{76}\text{Se}(p, n)$	9
$^{86}\text{Y}$	14.7	32	$^{86}\text{Sr}(p, n)$	10
$^{89}\text{Zr}$	78	23	$^{89}\text{Y}(p, n)$	100
$^{94\text{m}}\text{Tc}$	0.87	70	$^{94}\text{Mo}(p, n)$	9
$^{124}\text{I}$	100	23	$^{124}\text{Te}(p, n)$	5

## 1.6 Ciclotrón RDS 111.

El ciclotrón RDS 111 de Siemens (por sus siglas en inglés Radioisotope Delivery System) es un ciclotrón biomédico compacto diseñado para la producción de radionúclidos para uso médico (Figura 1.4). Acelera iones negativos del hidrógeno para obtener un haz de protones con energía de 11 MeV. Las características de este acelerador se encuentran resumidas en la Tabla 1.10.



**Figura 1.4.** Ciclotrón RDS 111.

**Tabla 1.10.** Características del ciclotrón RDS 111

Tipo de iones	Iones negativos del $H$
Energía	11 MeV
Radio de extracción	40 cm
Campo magnético	1.2 T
Radiofrecuencia	72.2 MHz
Corriente	40-60 $\mu A$
Tipo de bombardeo	dual
Blindaje	Auto-blindaje

El sistema de vacío consiste de bombas mecánicas que generan un pre-vacío del orden de  $10^{-3}$  Torr y bombas difusoras que logran un alto vacío del orden de  $10^{-7}$  Torr. El blindaje está compuesto principalmente de dos componentes, una parte interna de 30 cm de grosor compuesta de una mezcla de plomo, resina y carburo de boro; y una parte externa de 70 cm de grosor hecha de concreto mezclado con carburo de boro y polietileno. Este blindaje compuesto es efectivo contra varias formas de radiación incluyendo neutrones rápidos, rayos gamma instantáneos y rayos gamma inducidos de alta energía.

El ciclotrón RDS 111 de la Facultad de Medicina de la UNAM posee dos puertos de bombardeo, cualidad que le permite producir simultáneamente dos radionúclidos diferentes. El puerto uno de este acelerador fue actualizado para poseer un carrusel con capacidad para albergar cuatro blancos con una capacidad de corriente de 60  $\mu A$ , y es llamado Eclipse-HP (High Power). El segundo puerto (versión no actualizada) contiene un carrusel con capacidad de albergar ocho blancos con una capacidad de corriente de 40  $\mu A$  y es llamado Eclipse RDS.

## Bibliografía

Ávila-Rodríguez M. A., Zárate-Morales A., Flores-Moreno A. *Cyclotron Production of Medical Radioisotopes*. American Institute of Physics, AIP C.P. 2010; 1265:371-378.

IAEA, Technical Report Series No. 465, *Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice*, International Atomic Energy, Vienna, 2008.  
([http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs465\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs465_web.pdf))

[IAEA, Technical Report Series No. 468, *Cyclotron Produced Radionuclides: Physical Characteristics and Production Methods*, International Atomic Energy, Vienna, 2009.  
([http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs468\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs468_web.pdf))

Miranda Javier. *Técnicas Analíticas de Origen Nuclear: Un curso Introductorio*. Segunda Edición. Instituto de Física-UNAM, Mex. 2000.

# Capítulo 2. Conceptos Biológicos

## 2.1 Introducción

El estudio del funcionamiento del cuerpo humano se lleva a cabo a través de múltiples disciplinas que le otorgan una amplia gama de perspectivas, las cuales pueden ir desde su evaluación como un todo, hasta su estudio a nivel celular, ya que en ella se llevan a cabo todo tipo de procesos metabólicos que involucran la subsistencia del ser humano.

La célula es el lugar donde se llevan a cabo procesos de comunicación y nutrición, así como la replicación celular y mutaciones. Estas últimas son generadas por alteraciones genéticas o factores externos como son químicos (sustancias químicas), físicos (radiación) y biológicos (virus). Muchas de las mutaciones que ocurren comúnmente son inofensivas, es decir no provocan mayor daño. Sin embargo, se dan mutaciones que cambian el funcionamiento de las células convirtiéndola en unidades que no obedecen las señales de regularización y apoptosis, proliferando con una tasa alta comparada al tejido normal, provocando procesos carcinogénicos y por consiguiente se presentan cambios tanto metabólicos como fisiológicos en todo el organismo.

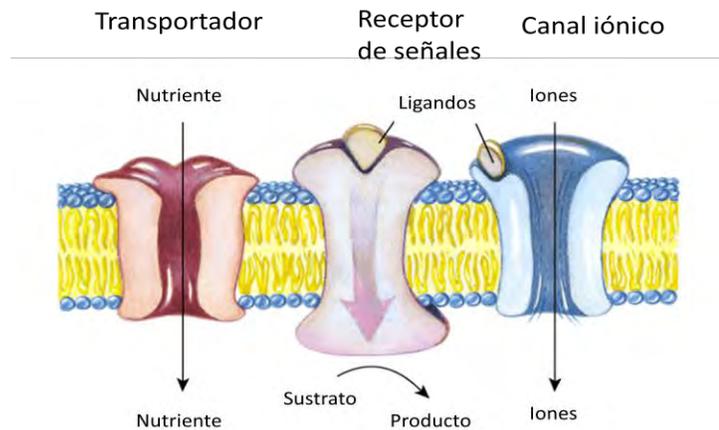
## 2.2 Receptores celulares

Todos los seres vivos están constituidos por células, existen distintos tipos de estas unidades fundamentales y estructurales que se diferencian en su tamaño, forma o función. Cada célula posee un grado de individualidad y autonomía aunque formen parte de un mismo órgano, todas ellas están constituidas por una membrana plasmática, el citoplasma y un núcleo.

La membrana plasmática es la cubierta y periferia de la célula, la aísla del medio externo y está compuesta por uniones no covalentes entre lípidos y proteínas formando una bicapa hidrofóbica resistente y altamente flexible que actúa como una barrera. El citoplasma está constituido por un compuesto acuoso (citosol) y diferentes partículas insolubles como enzimas, moléculas de ARN, aminoácidos, nucleótidos y ribosomas entre otros, y está limitado por la membrana celular. El núcleo es el lugar donde se guarda la información genética.

La nutrición y comunicación de la célula se da a través de la membrana plasmática al interaccionar con otras células y con el medio extracelular donde se encuentran solutos, nutrientes, hormonas, neurotransmisores o antígenos. La interacción se da por medio de transportadores, canales y receptores que se encuentran en la membrana (Figura 2.1). Los

transportadores son proteínas que atraviesan la membrana celular, y como su nombre lo indica, son los encargados de llevar nutrientes dentro de la célula y eliminar los desechos hacia el exterior. Los canales iónicos también son proteínas que atraviesan la membrana y por medio de ellos se regula la concentración de iones; otros activan o inhiben enzimas celulares internas. Finalmente, los receptores son proteínas que se encuentran en la superficie de la membrana, su función es recibir y amplificar señales del exterior celular y son específicos. Al compuesto que se une a un determinado receptor se le llama ligando, es decir un ligando específico bloquea a un receptor específico y viceversa. Durante la unión ligando-receptor, la proteína receptora transduce la señal en forma de mensaje que proviene del ligando. Otros tipos de receptores se encuentran asociados a los canales iónicos que permiten el paso de iones abriendo los canales mientras está unido el ligando con el receptor; de manera similar la síntesis de una determinada molécula dentro de la célula es el resultado de la orden recibida (en el receptor) de algún ligando. Existen una gran diversidad de receptores, algunos más frecuentes que otros en diferentes tipos de célula, otros reconocen ligandos de bajo peso molecular, mientras otros poseen afinidad por macromoléculas.

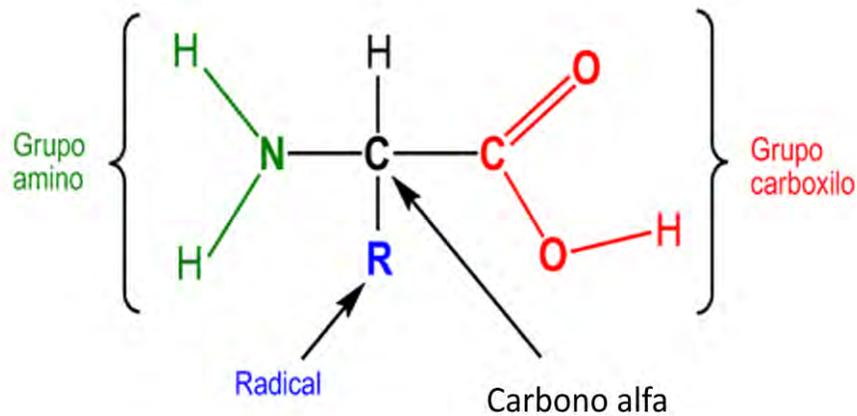


**Figura 2.1.** Proteínas de la membrana plasmática (Adaptado de Lehninger et al. 1995).

## 2.3 Aminoácidos y péptidos

Entre las principales moléculas dentro de la célula, se encuentran las proteínas que se caracterizan por ser macromoléculas. Existe una gran cantidad de ellas y cada una desarrolla diferentes funciones bioquímicas. Las proteínas están formadas por unidades básicas conocidos como aminoácidos, en general una proteína está formada por una secuencia y combinación de 20 aminoácidos.

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que se caracterizan por estar formadas por un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), unidos mediante un carbono cuyos enlaces restantes son saturados por un átomo de hidrógeno en un extremo (H) y un radical (R) que es una cadena lateral que varía en estructura, tamaño, carga eléctrica y que diferencia un aminoácido de otro (Figura 2.2). El átomo de carbono que enlaza estas cuatro partes se le conoce como carbono alfa ( $\alpha$ ) y es un centro quiral, término que se refiere a un ordenamiento tetraédrico de los orbitales de enlace alrededor de este carbono. Durante la formación del aminoácido se forman dos estereoisómeros, que son formados por el ordenamiento de los cuatro grupos alrededor del carbono alfa; formándose aminoácidos tipo L (con sentido levógiro) y tipo D (dextrogiro), los cuales son caracterizadas y diferenciadas por la forma en que polarizan la luz.



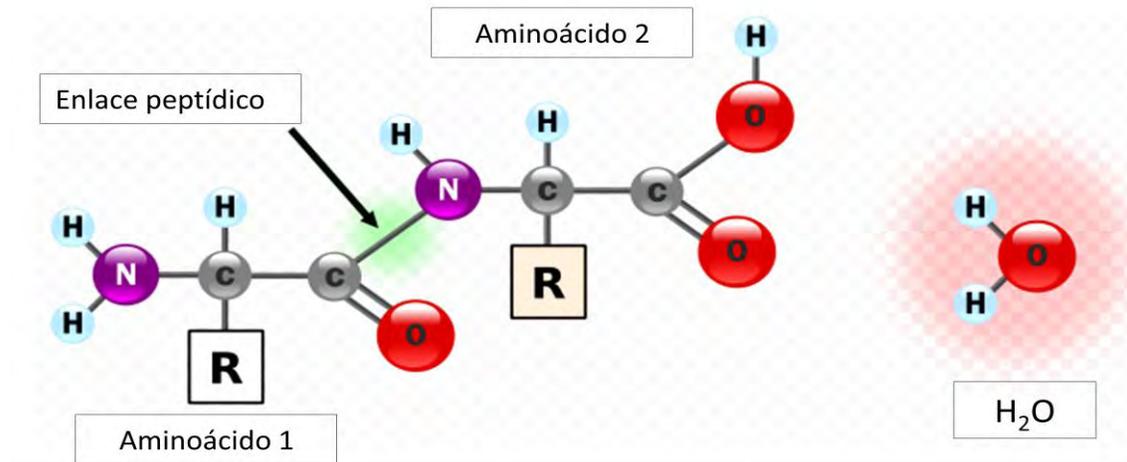
**Figura 2.2.** Grupos funcionales de un aminoácido.

Las proteínas están constituidas por aminoácidos tipo L. Existen 2 tipos de nomenclatura para referir a cada uno de los aminoácidos; una de ellas es representada por una abreviatura de tres letras, y la segunda es identificarlos por medio de una letra. Además pueden ser clasificados de acuerdo a su afinidad al agua, por su carga o por su estructura. Otra clasificación de estos eslabones es catalogarlos como aminoácidos esenciales y no esenciales (Tabla 2.1). Los primeros son aquellos requeridos por todos los animales y se encuentran en las plantas, mientras que los segundos son aquellos que pueden sintetizar los animales. Los aminoácidos pueden ser caracterizados mediante estudios espectrofotométricos, algunos ejemplos son el triptófano, la tirosina y la fenilalanina presentan absorbancia para longitudes de onda en el ultravioleta (280 nm).

**Tabla 2.1.** Clasificación de aminoácidos (Adaptado de Lehninger *et al.* 1995)

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Representación</b>	<b>Tipo</b>
<b><i>Grupo apolares</i></b>			
<b><i>Alifáticos</i></b>			
Glicina	Gly	G	No Esencial
Alanina	Ala	A	No Esencial
Valina	Val	V	Esencial
Leucina	Leu	L	Esencial
Isoleucina	Ile	I	Esencial
Prolina	Pro	P	No Esencial
<b><i>Grupo</i></b>			
<b><i>Aromáticos</i></b>			
Fenilalanina	Phe	F	Esencial
Tirosina	Tyr	Y	No Esencial
Triptófano	Trp	W	Esencial
<b><i>Grupo polares</i></b>			
<b><i>Sin carga</i></b>			
Serina	Ser	S	No Esencial
Treonina	Thr	T	Esencial
Cisteína	Cys	C	No Esencial
Metionina	Met	M	Esencial
Asparagina	Asn	N	No Esencial
Glutamina	Gln	Q	No Esencial
<b><i>Grupo con carga</i></b>			
<b><i>Negativa</i></b>			
Aspartato	Asp	D	No Esencial
Glutamato	Glu	E	No Esencial
<b><i>Grupo con carga</i></b>			
<b><i>Positiva</i></b>			
Lisina	Lys	K	Esencial
Arginina	Arg	R	Esencial
Histidina	His	H	Esencial

Por otra parte, se le conoce como péptido a la unión de dos o más aminoácidos (Figura 2.3), los cuales se unen mediante enlaces covalentes. Este tipo de enlace recibe el nombre de enlace peptídico, que se refiere a la unión de un aminoácido mediante el grupo amino a otro aminoácido con su grupo ácido o carboxilo, liberando agua durante la reacción química.



**Figura 2.3.** Enlace peptídico

En la figura anterior se muestra el enlace de un péptido, debido a la unión de dos aminoácidos. El grupo amino del aminoácido 2 es un grupo nucleófilo, que desplaza al grupo hidróxilo (grupo saliente) del aminoácido 1. La molécula de agua se forma debido a que el amino que participa pierde un hidrógeno que se une al grupo saliente. A los extremos del péptido se les conoce como residuos, es decir al extremo que contiene el amino libre es el residuo amino-terminal (N-terminal) y al extremo con el grupo carboxilo libre recibe el nombre de carboxilo-terminal (C-terminal). Cuando se unen varios aminoácido por este tipo de enlace formando pequeñas cadenas (<10) se les conoce como oligopéptido, en contraste cuando la cadena está formada por muchas de estas unidades se le llama proteínas (polipéptido).

El enlace peptídico no es el único que se da entre aminoácidos, existe otro enlace covalente conocido como enlace disulfuro, que se presenta en residuos de cisteínas para formar cistina o actuar en la estructura de otras proteínas que interaccionan con el medio extracelular, como es la insulina y la inmunoglobulina, etc.

Las principales funciones de los péptidos son desempeñar funciones bioquímicas y metabólicas, como por ejemplo la insulina (51 residuos) y el glucagón (29 residuos), que son hormonas peptídicas que regulan la concentración de glucosa a la sangre; la oxitocina (9 residuos) regula contracciones uterinas, mientras otros como la amanitina es un fuerte veneno proveniente de algunos hongos.

## **2.4 Sistema nervioso**

El sistema nervioso está formado por dos tipos de células principales: las neuronas y las células gliales; juntas forman una compleja y organizada red. Las primeras son las células altamente diferenciadas, mientras las segundas también llamadas glía o neurogliales, son células nodrizas menos diferenciadas capaces de reparar y restaurar el sistema nervioso de ciertas lesiones y cuya principal función es unir y dar soporte a las neuronas.

Las estructuras que conforman el sistema nervioso son: el encéfalo, los nervios craneales, la médula espinal, los nervios raquídeos, los ganglios, los plexos entéricos y los receptores sensoriales. Se clasifica en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP).

### **2.4.1 Encéfalo**

El encéfalo está constituido por neuronas y glía, forma parte del SNC y es el lugar donde se registran y procesan las sensaciones, se correlaciona la información almacenada, se generan decisiones y acciones; es el centro del intelecto, de la conducta y de la memoria. Está conformado por el cerebro, cerebelo, tronco encefálico y el diencefalo. El encéfalo está protegido por los huesos del cráneo y las meninges craneales que lo envuelven y lo protegen.

El encéfalo de un adulto está conformado por aproximadamente 100 mil millones de células neuronales y aproximadamente un billón de células gliales, y es un órgano con un peso alrededor de 1300 g [Tortora y Grabowski 2006].

### **2.4.2 Barrera hematoencefálica**

Se le conoce como barrera hematoencefálica a la región que se encuentra entre los vasos sanguíneos y el encéfalo; está formada por estrechas uniones que sellan los espacios entre las células endoteliales de los capilares encefálicos; también están rodeadas por membranas basales y posee numerosos astrocitos (células gliales) adheridos contra los capilares. La barrera hematoencefálica aísla y envuelve al encéfalo, su principal función es protegerlo contra sustancias dañinas y microorganismos patógenos, en otras palabras es la encargada de impedir el acceso y contacto de muchos compuestos que viajan en la sangre al tejido encefálico. Sin embargo, también es permeable y regula el acceso de otras sustancias necesarias para las células nerviosas.

Generalmente las sustancias hidrosolubles tienen dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo para aquellas que son necesarias para el cerebro existen transportadores específicos que ayudan al ingreso de éstas; por ejemplo la glucosa cruza la barrera por transporte activo. Por otra parte, la barrera hematoencefálica no permite el paso de diversas proteínas y antibióticos que viajan en el torrente sanguíneo al encéfalo, sin embargo, no impide el acceso de otras sustancias liposolubles como el alcohol, anestésicos, dióxido de carbono y el oxígeno (este último es esencial para las células nerviosas). Otra de sus funciones, es regular el acceso de iones como: potasio, cloro, calcio, etc, para que no afecten la actividad neuronal.

### **2.4.3 Neoplasias intracraneales**

El crecimiento anormal de células puede darse en diferentes tejidos, uno de ellos es el sistema nervioso central, cuyas malformaciones congénitas pueden presentarse en el parénquima encefálico, meninges, vasos sanguíneos, nervios craneales, glándulas y hueso. Todas estas anomalías del tejido nervioso pueden clasificarse en tumores benignos o tumores malignos; los primeros se caracterizan por ser células no cancerosas o invasivas, tienen bordes definidos, generalmente son curables, un ejemplo son los meningiomas. A diferencia de los anteriores, los tumores malignos se caracterizan por ser células cancerosas, crecen rápidamente e invaden tejidos vecinos, y comúnmente reaparecen después de recibir el tratamiento incluso suelen reaparecer después de extirparlos; como un ejemplo de este caso se encuentran los gliomas. En otros casos los tumores pueden considerarse con un alto grado de malignidad no por el tipo de célula que los conforma, sino por su tamaño, ubicación y sobre todo por los daños que pueden ocasionar en el sistema nervioso [1].

Entre las similitudes de los tumores malignos y benignos se encuentran que son procesos expansivos neoformativos [2]. No se conocen causas específicas que desencadenen su desarrollo, aunque se cree que influye la genética, el contacto con sustancias químicas o el ambiente, pero ninguno de los anteriores son parámetros seguros que provoquen este tipo de alteraciones, es decir cualquier persona a cualquier edad puede desarrollar un tumor. Algunas neoplasias son más propensas a desarrollarse a ciertas edades, como los astrocitomas.

Los síntomas que producen los tumores intracraneales varían dependiendo del tamaño que presenten y su ubicación, pero comúnmente son síntomas relacionados con el aumento de la presión intracraneal o trastorno de funciones en el cerebro, provocando cefaleas severas, vómitos y náuseas, cambios de humor y personalidad, convulsiones, problemas motrices y trastornos de los sentidos, entre otras.

A todos los tumores que se originan de células del tejido nervioso se les llama tumores primarios, para diferenciarlos de aquellos que aparecen también en éste debido a una metástasis proveniente de otra parte del cuerpo; y que viaja a través de la sangre como son el cáncer de pulmón, de seno, de colon y melanomas [2]

Entre los tumores más frecuentes que afectan al sistema nervioso se encuentran los gliomas, que se caracterizan por ser un tipo de tumor primario en el cerebro, y como su nombre lo indica, el glioma se origina en las células gliales que dan sostén al encéfalo. Este tipo de tumor es maligno, invade el tejido circundante y se infiltra entre las neuronas; algunos subtipos tienen tasa de crecimiento acelerado, generalmente son difíciles de operar por lo que se asigna un tipo de tratamiento; que depende del tamaño y de la zona en el encéfalo donde se localicen. La gran mayoría reaparece después del tratamiento o meses después de una extirpación. Otra cualidad peculiar de los gliomas es su no diseminación a otros tejidos del cuerpo que no sea glías invadidas, es decir no hay metástasis fuera del parénquima nervioso.

Los gliomas se clasifican de acuerdo al tipo de células gliales que los conforman y al lugar donde se originan [1,2], entre los más comunes se encuentran los siguientes:

- 1) Astrocitomas. Aparecen en células gliales de tejido conectivo llamadas astrocitos; pueden encontrarse tanto en el encéfalo como la medula espinal y se clasifican de acuerdo al grado de malignidad en tumores de bajo grado (pueden ser extirpados completamente), medio grado y alto grado, siendo este último uno de los de mayor malignidad entre los tumores cerebrales.
- 2) Glioblastomas multiforme. Comúnmente llamados glioblastomas, representan el 20% de los tumores intracraneales. Aparece mayoritariamente en hombres entre los 50 y 60 años y se localizan habitualmente en los hemisferios cerebrales; son altamente malignos, tiene una alta tasa de crecimiento, pueden invadir el cuerpo calloso y el otro hemisferio. Los síntomas que lo acompañan son cefaleas, trastornos mentales, epilepsia y zonas de muerte cerebral a causa de hemorragias intracraneales, ya que es un tumor altamente vascularizado; también se le conoce como astrocitoma IV.

## **2.5 Procesos característicos de neoplasias**

Actualmente no se ha encontrado factores específicos que participen en la transformación de células normales a células malignas que terminen generando tumores. Sin embargo, a través de la observación y el continuo estudio de este tipo de patologías se puede clasificar de forma general la tumorigénesis como un proceso de seis pasos, que reflejan la alteración genética y el progreso tumoral. Los seis episodios que presentan la

gran mayoría de los procesos neoplásicos durante su desarrollo son: 1) autosuficiencia en señales de crecimiento, 2) insensibilidad a señales de anti-crecimiento, 3) evasión de apoptosis, 4) potencial de proliferación sin límites e hipoxia, 5) angiogénesis sostenida y 6) invasión de tejidos y metástasis [Hanahan y Weinberg 2000].

El primer eslabón es la autosuficiencia de señales de crecimiento. La mayoría de las células requieren señales de estimulación para pasar de un estado inactivo a un estado mitótico, es decir son dependientes de este tipo de señales para poder proliferar. En el tejido tumoral las células sufren mutaciones que generan señales de crecimiento (oncogenes), estimulando a células vecinas (interacciones célula a célula) y así mismas (autocrina), haciéndose independientes y rompiendo el equilibrio en cuanto a la proliferación celular que debiera existir. Por ejemplo, algunas células expresan el factor de crecimiento GF con el cual inducen la proliferación a células vecinas. Otros factores de crecimiento son el factor de crecimiento de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento tumoral alfa ( $TGF\alpha$ ), ambos expresados en glioblastomas.

El segundo paso que caracteriza a la tumorigénesis es la insensibilidad a señales de anticrecimiento, con las cuales las células tumorales no obedecen señales que evitan la proliferación celular a través de ligandos que inactivan a la célula (anti-oncogenes). En el tejido normal las células mantienen una tasa de replicación controlada por señales que envían y reciben. El proceso es roto cuando proteínas como pRB es mutada, desactivada o simplemente no obedecida.

La apoptosis es el mecanismo de la muerte celular programada a través de señales sensoriales que vigilan el estado de la célula (que no muere o está mal reparada) y por efectores, señales que se encargan de llevar la célula a la muerte. Una de las proteínas encargadas de inducir la apoptosis es p53, generalmente este supresor de la proliferación es mutado en células tumorales, por lo que evaden el proceso de apoptosis.

Las células sanas se replican alrededor de 60-70 veces en su ciclo de vida, mientras que en células tumorales presentan una tasa de proliferación potencial sin límites que se debe al hecho que este tipo de célula genera señales de crecimiento e inhibe toda señal de anticrecimiento, además de evadir la apoptosis, generando así un crecimiento tumoral.

El quinto paso es la angiogénesis sostenida, que se refiere a la creación de nuevos vasos sanguíneos, puesto que conforme el tumor crece a consecuencia de una proliferación ilimitada, es necesario una cantidad mayor de oxígeno y nutrientes. Un subproceso que aparece antes de la vascularización es conocido como hipoxia, que se refiere a que conforme el tumor crece, el centro del mismo se queda sin oxígeno, ya que cada vez es más difícil que este gas llegue a todas las células, por lo tanto son necesarios nuevos vasos

sanguíneos. Durante la angiogénesis, frecuentemente se expresan receptores como el factor vascular de crecimiento endotelial (FVCE) e integrinas  $\alpha_v\beta_3$ .

Finalmente, el sexto proceso característico de muchas neoplasias es la invasión y metástasis a otros tejidos; éstos pueden ser vecinos (invasión local) o pueden invadir órganos alejados del tumor. La probabilidad de metástasis aumenta con la formación de nuevos vasos sanguíneos, ya que permiten que células malignas migren a través del torrente sanguíneo a lugares con mayor oxigenación y nutrientes. En este paso es frecuente encontrar integrinas como receptores indicadores de invasión y metástasis.

## **Bibliografía**

Ganong William F. *Fisiología Médica*. 13<sup>a</sup> edición, El Manual Moderno S. A de C.V, Mex. 1992.

Lehninger Albert L., Nelson David L, Cox Michael M. *Principios de Bioquímica*. Segunda Edición, Omega S. A. Barcelona España. 1995.

Tortora Gerard J, Reynolds Grabowski Sandra. *Principios de Anatomía Y Fisiología*. 9<sup>a</sup> edición, Oxford University Press. Agosto de 2006.

Hanahan Douglas and Weinberg Robert A. *The Hallmarks of Cancer*. Cell. January 7, 2000. 100:57-70.

[1] <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/tumores-cerebrales>  
(Mayo de 2010)

[2] [http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/adult\\_neuro\\_sp/brain.cfm](http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/adult_neuro_sp/brain.cfm)  
(Mayo de 2010)

# Capítulo 3. Antecedentes de Radiopéptidos

## 3.1 Introducción

En el tejido tumoral ocurren diferentes procesos metabólicos, que lo diferencian del tejido normal, permitiendo radiomarcarse una amplia gama de biomoléculas dirigidas a blancos moleculares específicos, que proporcionan información de patologías por medios no invasivos, como lo son las imágenes de medicina nuclear molecular. Actualmente los estudios de diagnósticos por imágenes juegan un papel importante en la planeación de un tratamiento, vigilar y conocer más de la enfermedad. El interés por radiomarcarse ligandos para una determinada familia de receptores nace del hecho de que distintos receptores son expresados en diferentes etapas de desarrollo de la tumorigénesis, como por ejemplo en la proliferación celular, angiogénesis y metástasis.

## 3.2 ¿Qué es un radiofármaco?

Un radiofármaco es un compuesto radiactivo, que consta de una molécula específica unida a un átomo radioactivo. La molécula específica determina la ruta metabólica y el elemento radioactivo, en el caso de aplicaciones de diagnóstico, permite la detección externa de la biodistribución del radiofármaco dentro del organismo. La aplicación de radiofármacos en la medicina nuclear es de ~ 95% en el diagnóstico clínico y el resto en el área de tratamiento [Saha 2004]. El diseño de un radiofármaco está determinado por sus dos componentes: a) la elección de una molécula orgánica o inorgánica que cumpla y/o realice funciones fisiológicas y metabólicas específicas en un determinado órgano o tejido y b) la elección de un radionúclido adecuado, que puede ser aplicado en el área de diagnóstico (emisores gamma y de positrones) o de tratamiento (emisores alfa y beta o de electrones Auger).

Antes de la aplicación en humanos todo radiofármaco debe pasar un riguroso control de calidad que garantice que el producto es estéril y libre de pirógenos. Raramente estimulan una reacción tóxica puesto se usan en cantidades mínimas (trazas) incapaces de provocar una reacción secundaria o un efecto farmacológico. Se considera que el mayor daño puede deberse a la radiación recibida por lo que su uso debe estar bien justificado.

Una característica importante de los radiofármacos es su vida media efectiva, que está determinada por la vida media del radionúclido (eliminación por decaimiento), y por su vida media biológica, que es el tiempo que le toma al organismo en eliminar la mitad del fármaco en bases estrictamente biológicas (orina, heces, saliva, transpiración, etc). La eliminación del compuesto químico (fármaco) presenta un comportamiento exponencial

similar al decaimiento radiactivo. La vida media efectiva se calcula matemáticamente mediante:

$$\frac{1}{T_E} = \frac{1}{T_B} + \frac{1}{T_F} \quad 3.1$$

Dónde:

- $T_E$ : Es la vida media efectiva del radiofármaco.
- $T_B$ : Es la vida media biológica.
- $T_F$ : Es la vida media física.

### 3.3 Radiofármacos para diagnóstico

El principal campo de aplicación de los radiofármacos se encuentra dentro del ámbito clínico de la medicina nuclear en el diagnóstico clínico por medio de imágenes tipo SPECT, PET y gammagrafías planares. En estos tipos de diagnóstico se requiere que el radionúclido posea propiedades físicas como: decaimiento a un átomo estable emitiendo un solo fotón o bien por emisión de positrones, que la energía de la radiación emitida sea suficientemente alta para atravesar el cuerpo del paciente y que su vida media sea tal que el estudio pueda llevarse a cabo.

En las últimas décadas se han desarrollado una gran variedad de radiofármacos dirigidos a blancos moleculares específicos para la detención *in vivo* de tumores. Entre las primeras biomoléculas que se marcaron se encuentran azúcares (glucosa) y algunos lípidos; pero hoy en día el interés se encuentra en biomoléculas como péptidos, proteínas, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos, cuya principal característica es presentar afinidad por algún tipo de receptor que se exprese fuertemente en el tejido tumoral. Los péptidos son el grupo de moléculas que más se marcan debido a que son ligandos específicos para familias de receptores, además son moléculas que pueden ser tan pequeñas o tan grandes como sea necesario.

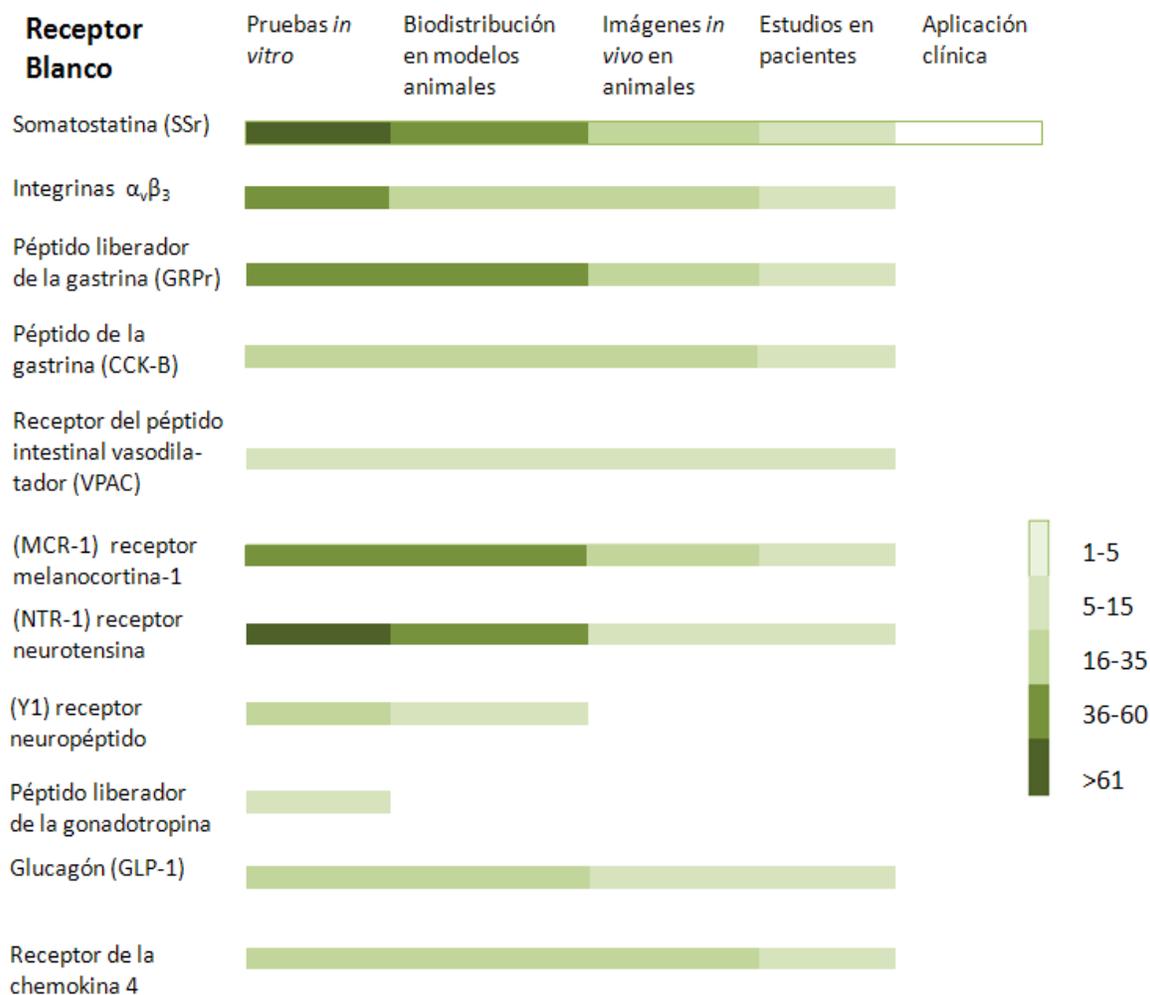
### 3.4 Péptidos radiomarcados

En los últimos años, los péptidos radiomarcados han captado la atención en el ámbito clínico debido a su capacidad para detectar sitios bioquímicos específicos, tales como concentraciones de receptores o enzimas para una determinada especie de célula. Los péptidos ofrecen ventajas sobre otras moléculas radiomarcadas, ya que son cadenas de aminoácidos pequeñas, son fáciles de sintetizar, tienen menor probabilidad de crear una respuesta inmunológica y pueden ser eliminados del flujo sanguíneo en un tiempo relativamente corto [Meléndez 2002]. Además, los péptidos ofrecen otras ventajas

metabólicas ya que éstos pueden actuar como mensajeros químicos, neurotransmisores, estimuladores o inhibidores de diversas funciones vitales.

El marcado de este tipo de biomoléculas puede realizarse por medio de diferentes métodos, que van desde la simple conjugación del radionúclido con el péptido a métodos más complejos que requieren de otra molécula que los una. El método directo de marcado es un ejemplo de la unión del péptidos con el radionúclido, donde quedan unidos mediante reacciones electrofílicas con los grupos funcionales del péptido. La ventaja de este tipo de marcado es que fácilmente se lleva a cabo la reacción. Otro método de radiomarcado de péptidos es mediante el uso de agentes quelantes bifuncionales capaces de unir por un lado al péptido y por el otro al radionúclido (método indirecto). Sin importar cual método se use para sintetizar un radiofármaco, siempre se busca que la afinidad del péptido para un determinado receptor no se pierda durante la síntesis. Generalmente la evaluación de estos radiopéptidos queda sujeta a pruebas *in vivo*, verificando la estabilidad de la molécula, la biodistribución y su eliminación de los tejidos. Actualmente todos estos estudios preclínicos se realizan con mayor facilidad en los diversos equipos de imagenología para pequeños animales, como sistemas microSPECT y microPET. En los últimos años se han desarrollado diferentes radiopéptidos dirigidos a familias de receptores blancos en países como EUA, Alemania y otros países europeos. Desafortunadamente muy pocos han sido liberados para uso clínico (Figura 3.1). [Schottelius *et al.* 2009 muestra una revisión de péptidos radiomarcados para una gran variedad de receptores].

En la Figura 3.1 se muestra que los tres receptores que mayor incidencia han tenido como blancos moleculares son: la somatostatina (SSr), la integrinas ( $\alpha_v\beta_3$ ) y los receptores del péptido liberador de la gastrina (GRP-r). Y por consiguiente los tres péptidos radiomarcados con diferentes radionúclidos con afinidad para estos receptores son el Octreótido, el RGD y la Bombesina, respectivamente. Schottelius *et al.* 2009 muestra también una gran variedad de radionúclidos con los que se ha realizado el marcado de estos tres péptidos.



**Figura 3.1.** Receptores blancos para diferentes radiopéptidos. La intensidad de color es relativa al número de péptidos en las diferentes etapas de su estudio (Adaptado de Schottelius et al. 2009).

### 3.4.1 Bombesina (BN)

Las bombesinas son un grupo de neuropéptidos que engloban un gran número de péptidos, se aisló por primera vez en 1971 de la piel de los batracios, en los cuales regula las contracciones del músculo liso y la temperatura. Más tarde se encontró que las bombesinas están también distribuidas en células endócrinas del ser humano [Arteaga y Ferro 2005].

La gran familia de las bombesinas incluye a las de origen batracio y a las de origen mamífero, entre las primeras podemos mencionar a las ranatensinas, las Leu y Phe-filolitorinas y por supuesto a la misma bombesina. Las principales bombesinas de tipo

mamífero son el péptido liberador de la gastrina (GRP) y la neuromedina (NMB) [Varvarigou *et al.* 2004]. Estudios previos han demostrado que la BN y el GRP coexisten en la piel de los batracios, demostrando que ambos péptidos poseen estructuras homólogas, por lo tanto se considera que la BN y el GRP son equivalentes [Lin *et al.* 1995]. La BN está formada por 14 aminoácidos cuya secuencia es: pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-CONH<sub>2</sub>. La importancia de estudiar la BN es que esta misma secuencia se encuentra en el estómago porcino, pulmones fetales y el plexo intestinal mesentérico. Entre las funciones del GRP y BN, como hormonas peptídicas, se encuentra liberar a la gastrina secretada a la sangre por las células G que se encuentran principalmente en el antro gástrico; actuar sobre tejidos periféricos y sistema nervioso central; estimular la liberación de hormonas gastrointestinales; aumentar las concentraciones de gastrina plasmática, polipéptido pancreático, glucagón, insulina, y el péptido gastro-inhibidor [Arteaga y Ferro 2005].

El interés por radiomarcarse la bombesina surge del hecho de que este péptido tiene una gran afinidad para los receptores del péptido liberador de la gastrina (GRPr), mismos que se sobreexpresan en varias estirpes de células cancerosas asociadas al cáncer de próstata y mama principalmente, y en algunas otras neoplasias como adenomas del pulmón, cáncer medular de tiroides, melanomas, cáncer gastrointestinal, duodenal, de colon, gastrinomas, neoplasias uterinas, hipotálamo e hipófisis [Stangelberger *et al.* 2005, Arteaga y Ferro 2003]. Actualmente se han identificado cuatro tipos de receptores afines a las bombesinas: el GRPr (expresado en tumores malignos), el receptor de la neuromedina (NMB), los receptores BB3 (BRS-3) y el BB4, estos dos últimos con mayor afinidad para la BN que para el GRP [Pradhan *et al.* 1998].

La bombesina ha sido radiomarcada con diferentes radionúclidos, por ejemplo fue marcada con <sup>125</sup>I, uniéndose perfectamente con los receptores ya mencionados [Reubi *et al.* 2002]. En los últimos 6 años la BN ha sido radiomarcada con el emisor de positrones <sup>18</sup>F, llevando al radionúclido a la forma química de N-succinimidil-4-<sup>18</sup>F-fluorobenzoato (<sup>18</sup>F-SFB) para posteriormente ser unido mediante una lisina que conecta a la BN (Lys<sup>3</sup>-Bombesina), este estudio fue realizado por Xianzhong Zhang *et al.* 2006, quienes probaron el radiofármaco en ratones atómicos con un tumor inducido de la línea celular PC3 (cáncer de próstata). Encontraron que el compuesto se degrada rápidamente en hígado, se elimina a través de los riñones y orina, mientras que la depuración en la sangre es rápida. La especificidad del radiofármaco se realizó mediante bloqueo de receptores con [Tyr<sup>4</sup>]BBN y se llegó a la conclusión que el <sup>18</sup>F-FB-[Lys<sup>3</sup>]BBN es un radiofármaco adecuado para detectar el GRPr en tumores de próstata.

Otros radionúclidos con los que la BN ha sido radiomarcada son el <sup>99m</sup>Tc y el <sup>111</sup>In, para estudios de SPECT [Ferro *et al.* 2006] y el <sup>90</sup>Y, el <sup>188</sup>Re y el <sup>177</sup>Lu con fines de radioterapia para inhibir el crecimiento tumoral. También ha sido radiomarcada con

radionúclidos metálicos como el  $^{64}\text{Cu}$  y el  $^{68}\text{Ga}$  [Schuhmacher *et al.* 2005] para estudios PET mediante agentes quelantes bifuncionales, que proporcionan estabilidad termodinámica al compuesto para no perder la especificidad del ligando. Un ejemplo de este tipo de marcado es la BN-HYNIC unido a algún coligante como EDDA (ácido etilendiamino-diacético), la tricina, el ácido nicotínico y posteriormente unidos a un radionúclido como el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  o el  $^{64}\text{Cu}$ ; como ejemplo se tiene el  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Aoc-Bombesina. (HYNIC: ácido 6-Hidrazinopiridina-3-Carboxílico; DOTA: ácido 1,4,7,10-tetraazadodecano-N,N',N'',N'''-tetraacético)

### 3.4.2 [Tyr<sup>3</sup>]-Octreótido (TOC)

La somatostatina es una hormona peptídica producida en el hipotálamo, páncreas y otros órganos endócrinos; desarrolla diversas funciones como liberar o inhibir otras hormonas como son: la insulina, glucagón, hormonas gastrointestinales y de crecimiento (hipofisarias). Receptores de la somatostatina se hallan en células de origen neuroendocrino, como en el lóbulo anterior de la hipófisis, células C tiroideas, células de los islotes pancreáticos y en células no neuroendocrinas como los linfocitos y las células tubulares renales [Arteaga y Ferro 2003].

Esta familia de receptores también se expresa en una gran variedad de tumores de origen neuroendocrino, de aquí el interés por marcar la somatostatina y análogos con algún radionúclido para visualizar este tipo de neoplasias con algún método de imagen conocido. Se han identificado cinco subtipos de receptores que reconocen a la somatostatina: SSr1-SSr5 [Meléndez 2002, Krenning *et al.* 1993].

Los primeros intentos de radiomarcarse la somatostatina no fueron favorables, puesto que la vida media biológica de esta hormona es de segundos; por lo tanto se han sintetizado diferentes compuestos análogos a ella, como los octreótidos. Los octreótidos son péptidos análogos a la somatostatina, por lo tanto poseen gran afinidad para los receptores de ésta. Entre los principales miembros de esta familia se encuentran el Octreótido, el Vapreótido, el Lanreótido, el Depreótido y el [Tyr<sup>3</sup>]-Octreótido. Este último péptido ([Tyr<sup>3</sup>]-Octreótido) mejor conocido como TOC, fue sintetizado del Octreótido al cambiar el aminoácido Phe<sup>3</sup> por Tyr<sup>3</sup>, dando como resultado un compuesto más hidrofílico, con mejor internalización celular y mucha mejor captación tumoral [de Jong *et al.* 1998]. La secuencia de aminoácidos del TOC es: DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr(OL).

El TOC ha sido radiomarcado con  $^{123}\text{I}$  para visualizar tumores, pero presenta la desventaja de acumulación del radiofármaco en la zona abdominal, vesícula biliar, tracto gastrointestinal y tiroides, dificultando la obtención de imágenes [Schottelius *et al.* 2002]. Otros radionúclidos para SPECT con los que frecuentemente se marca son el  $^{111}\text{In}$  y el

$^{99m}\text{Tc}$  [Decristoforo *et al.* 2000]. Para el radiomarcado del TOC con  $^{99m}\text{Tc}$  se requiere emplear agentes quelantes como el HYNIC, y coligantes como EDDA (ácido etilendiamino diacético), un ejemplo es el  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC-EDDA. En estudios realizados por Krenning *et al.* 1993, este radiofármaco demostró ser una mejor opción para tumores con receptores de la somatostatina, es captado rápidamente y retenido en el tejido tumoral en comparación con  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreótido (DTPA: ácido dielileno triamina penta-acético). Para estudios PET el octreótido ha sido marcado empleando  $^{18}\text{F}$  en forma de fluorobenzaldehído [Bruus-Jensen *et al.* 2006, Poethko *et al.* 2004] o por medio del fluoropropionato; con  $^{68}\text{Ga}$  [Froidevaux *et al.* 2002] y con otros radionúclidos como es el  $^{64}\text{Cu}$  y el  $^{86}\text{Y}$  utilizando agentes quelantes como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazadodecano-N,N',N'',N'''-tetraacético) y TETA (trietilentetraamina) [Schottelius *et al.* 2009].

El Octreótido radiomarcado, tanto con radionúclidos para diagnóstico como para tratamiento, se encuentra comercialmente disponible en países desarrollados desde hace algunos años.

### 3.4.3 RGD

Otro péptido que permite visualizar diferentes neoplasias de manera no invasiva es el RGD radiomarcado. El RGD es la secuencia de aminoácidos: Arg- Gly- Asp, requerida por otros diferentes péptidos y moléculas. Estas características lo hacen atractivo para el estudio de las integrinas, receptores con afinidad al RGD y expresados en tejidos tumorales durante el proceso de angiogénesis, potenciales metástasis y otros procesos como la trombosis.

Las integrinas son una familia de receptores que se expresan en células malignas, participan en la adhesión celular e intercambio de señales. Se caracterizan por estar formadas por dos cadenas proteicas llamadas cadena  $\alpha$  y cadena  $\beta$ . Existen alrededor de 21 cadenas alfa y ocho cadenas betas [Arteaga y Ferro 2003], dando una gran variedad de subtipos de integrinas, por ejemplo:  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_2$ , etc.

Entre la familia de las integrinas hay un notable interés por las integrinas tipo  $\alpha_v\beta_3$ , también conocidas como vitronectinas, porque son expresadas altamente en el tejido tumoral durante la vascularización y débilmente en tejido normal, así como el uso del RGD como su ligando [Dicristoforo *et al.* 2006]. Otras funciones de esta integrina incluyen su participación en la transducción de señales, favorecer la proliferación celular y la migración celular. Entre los tumores donde se expresa esta integrina se encuentran osteosarcomas, melanomas, carcinomas de pulmón, mama, próstata y vejiga, así como neuroblastomas y gliomas [Mitrasinovic *et al.* 2009].

La secuencia del RGD es el ligando de las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , hecho que favorece el radiomarcado de este péptido con radionúclidos para tratamiento o para el diagnóstico [Zhang *et al.* 2005] con la finalidad de visualizar, localizar el tumor e inhibir la angiogénesis y metástasis. El proceso del radiomarcado del RGD frecuentemente se realiza en ciclo de monómeros, dímeros, tetrámeros, etc., puesto que restringen la movilidad RGD [Welch 2003], y frecuentemente se les agrega uno o más aminoácidos para aumentar la efectividad y favorecer el efecto multivalente [Liu 2009]. Los aminoácidos que son añadidos son Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Lisina (K) y Valina (V), algunos ejemplos son los ciclos pentapéptidos de c(RGDfV) y c(RGDfK). En algunos otros casos se desarrollan péptidos lineales que contienen la secuencia del RGD como es RGD-Ser-Cys-RGD-Ser-Tyr.

En diverso estudios, el RGD radiomarcado es utilizado para el diagnóstico y en algunos casos para terapia a tumores del sistema nervioso, como la familia de los gliomas [Chen *et al.* 2004]. Entre los principales radionúclidos empleados para el diagnóstico por SPECT se encuentran  $^{123}\text{I}$  y  $^{125}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e  $^{111}\text{In}$  [Arteaga y Ferro 2003]. Para estudios tipo PET se radiomarca principalmente con  $^{18}\text{F}$  [Chen *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2005, Lee *et al.* 2006],  $^{64}\text{Cu}$  y  $^{68}\text{Ga}$ , mientras que para tratamiento tumoral se emplean radionúclidos como  $^{90}\text{Y}$  [Mitrosinovic. 2009] y  $^{177}\text{Lu}$ . Una forma frecuente de realizar el proceso del radiomarcado es emplear moléculas con función de unión, como la galactosa o glucopéptido [Haubner *et al.* 2005], así como agentes quelantes que enlazan a los radionúclidos metálicos. En la Tabla 3.1 se resumen los principales radiofármacos constituidos con el RGD. Los radiofármacos del RDG generalmente presentan una rápida depuración sanguínea y la eliminación del radiopéptido es por vía renal [Chen *et al.* 2004, Haubner *et al.* 2005, Decristoforo *et al.* 2006].

**Tabla 3.1.** Radiofármacos con RGD, adaptado de Haubner y Decristoforo 2009.

Nombre	Secuencia	Aplicación	Referencia
$^{18}\text{F}$ -Galactosa-RGD	c(RGDyK)	PET	Haubner <i>et al.</i> 2005
$^{18}\text{F}$ B-RGD	c(RGDyK)	PET	Lee <i>et al.</i> 2006
[ $^{18}\text{F}$ ]SFB-RGD	c(RGDyK)	PET	Chen <i>et al.</i> 2004
[ $^{18}\text{F}$ ]SFB-RGD	c(RGDyK)	PET	Zhang <i>et al.</i> 2005
$^{90}\text{Y}$ -DOTA-RGD	c(RGDfK)	Terapia	Mitrasinovic 2009
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-RGD	c(RGDyK)	SPECT	Decristoforo <i>et al.</i> 2006
$^{111}\text{In}$ -DOTA-RGD	c(RGDfK)	SPETC	Mitrasinovic 2009
$^{123},^{125}\text{I}$ -RGD	c(RGDyK)	SPECT	Haubner <i>et al.</i> 2004
$^{64}\text{Cu}$ -DOTA-RGD	c(RGDyK)	PET	Chen <i>et al.</i> 2004
$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RGD	c(RGDyK)	PET	Decristoforo <i>et al.</i> 2008
$^{111}\text{In}$ -DOTA-RGD	c(RGDfK)	SPECT	Dijkgraaf <i>et al.</i> 2007
$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RGD	c(RGDfK)	Terapia	Dijkgraaf <i>et al.</i> 2007

### 3.5 Radiofármacos en México

En México el uso principal de radiofármacos es para el diagnóstico clínico por medio de imágenes SPECT, y PET, teniendo mayor auge la primera. Los principales radionúclidos para la elaboración de radiofármaco para SPECT son el  $^{99m}\text{Tc}$  y  $^{111}\text{In}$ , mientras que para PET lo son  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$  y  $^{13}\text{N}$ .

En los últimos años también se han sintetizado radiofármacos específicos por medio del radiomarcado de péptidos, empleando el  $^{99m}\text{Tc}$  en diferentes formas químicas como radionúclido por excelencia. Entre los péptidos radiomarcados se encuentran la Bombesina (BN), el [Tyr<sup>3</sup>]-Octreótido (TOC), el RGD y la ubiquoteína (UBI), véase Tabla 3.2. En contraste radiofármacos para PET, recientemente sólo se han incorporado la [ $^{18}\text{F}$ ]fluorotimidina, para visualizar proliferación celular y [ $^{11}\text{C}$ ]acetato para estudiar el metabolismo beta oxidativo miocárdico, cáncer de próstata y carcinoma hepatocelular.

**Tabla 3.2.** Radiofármacos específicos para SPECT

Radiofármaco	Aplicación
$^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-BN	Ca. de próstata y mama
$^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-TOC	Ca. de origen neuroendocrino y de pulmón
$^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-RGD	Angiogénesis
$^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-UBI	Procesos infecciosos

### Referencias

Arteaga de Murphy C, Ferro Flores G. *Compuestos de Tecnecio*. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. 1ª Edición, impreso en México. Mayo de 2003.

Arteaga de Murphy C, Ferro Flores G. *Bombesina y Bombesinas Radiomarcadas*. *Alasbinm Journal*. Octubre 2005; 8(30).

Chen Xiaoyuan, Park Ryan, Shahinian Antony H, Tohme Michel, Khankaldyyan Vazgen, Bozorgzadeh Mohammed H, Bading James R, Moats Rex, Laug Walter E, Conti Peter S.  *$^{18}\text{F}$ -labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis*. *Nuclear Medicine and Biology*. 2004; 31:179-189.

Decristoforo C, Melendez-Alafort L, Sosabowski J.K, Mather S. *Nuclear Medicine*. 2000; 41: 1114- 1119.

Decristoforo Clemens, Faintuch-Linkowski B, Rey Ana, Guggenberg Elisabeth von, Rupprich Marco, Hernandez-Gonzalez I. Rodrigo Teodoro, Haubner Roland. [*Tc-99m*]HYNIC-RGD for imaging *avh3* expression. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33: 945-952.

De Jong M, Breeman W. A, Bakker W.H et al. Comparison of <sup>111</sup>In-labelled somatostatina analogous for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. Cancer Res. 1998; 58:437-441.

Ferro-Flores G, Arteaga de Murphy C, Rodríguez-Córtéz J, Pedraza-López M, Ramírez-Iglesias M.T. J. Nucl. Med. Commun. 2006; 27:371-376.

Froidevaux S, Eberle A.N, Christe m., Sumanovski L, Heppeler A, Schmitt J.S, Eisenwiener K, Beglinger C, Macke H.R. Int. J. Cancer. 2002; 98:930-937.

Haubner Roland, Decristoforo Clemens. Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting. Frontiers in Biosciences. January 1, 2009; 14:872-886.

Haubner Roland, Weber Wolfgang A, Beer Ambros J, Vabuliene Eugenija, Reim Daniel, Sarbia Mario, Becker Karl-Friedrich, Goebel Michael, Hein Ru'diger, Wester Hans-Ju'rgen, Kessler Horst, Schwaiger Markus. Noninvasive Visualization of the Activated  $\alpha_v\beta_3$  Integrin in Cancer patients by Positron Emission Tomography and [<sup>18</sup>F]Galacto-RGD. Plos Medicine, March 2005, 2:Issue 3.

Krenning E.P, Kwekkeboom D.J, Bakker W.H, Breeman W.A, Kooij P.P, Oei H.Y, Van Hagen M, Postema P.T, de Jong M, Reubi J.C et al. Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe1] and [<sup>123</sup>ITyr3]-Octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. Eur. J.Nucl.Med. 1993; 20:716-731.

Lee Yun Sang, Jeong Jae Min, Kim Hyung Woo, Chang Young Soo, Kim Young Joo, Hong Mee Kyung, Rai Ganesha B, Chi Dae Yoon, Kang Won Jun, Kang Joo Hyun, Lee Dong Soo, Chung June-Key, Lee Myung Chul, Suh Young-Ger. An improved method of <sup>18</sup>F peptide labeling: hydrazone formation with HYNIC- conjugated c(RGDyK). Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33:667-683.

Lin JT, Coy DH, Mantey SA, Jensen RT. Peptide structural requirements for antagonism differ between the two mammalian bombesin receptor subtypes. J Pharmacol Exp Ther. 1995; 275:285-95.

Liu Shuang. *Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency*. Reviews. Bioconjugate Chemistry. December 2009; 20(12):2199-2213.

Meléndez Alafort Laura. *Radiomarcado de Péptidos para Diagnóstico y Terapia*. Fac. de Medicina, UAEM, Mex. 2002. (<http://www.quimicanuclear.org>)

Mitrasonovic Petar M. *Advances in  $\alpha(v)\beta(3)$  Integrin- Targeting Cancer Therapy and Imaging with Radiolabeled RGD peptides*. Current Radiopharmaceuticals. 2009; 2:214-219.

Pradhan TK, Katsuno T, Taylor JE, Kim SH, Ryan RR, Mantey SA, et al. *Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes*. Eur J Pharmacol. 1998; 343(2-3):275-287.

Poethko Thorsten, Schottelius Margret PhD, Thumshirn Goergette, Hersel Ulrich PhD, Herz Michael, Henriksen Gjermund PhD, Kessler Horst PhD, Schwaiger Markus MD, and Wester Hans-Jürgen PhD. *Two-Step Methodology for High-Yield Routine Radiohalogenation of Peptides:  $^{18}\text{F}$ -Labeled RGD and Octreotide Analogs*. The Journal of Nuclear Medicine, Mayo 2004; 45:892-902.

Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M. *Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14)*. Clin Cancer Res. April 2002; 8(4):1139-46.

Saha Gopal B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. Fifth Edition, Springer. 2004.

Stangelberger A, Schally AV, Varga JL, Zarandi M, Szepeshazi K, Armatis P, et al. *Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone hormone-releasing hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice*. Clin Cancer Res. 2005; 11:49-57.

Shottelius M, Wester H.J, Reubi J.C, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M. Bioconjug Chem. 2002; 13:1021-1030.

Schottelius Margret, Wester Hans-Jürgen. Review Article: *Molecular imaging targeting peptide receptors*. Methods. 2009; 48:161–177.

Schuhmacher J, Zhang H, Doll J, Macke HR, Matys R, Hauser H et al. *GRP receptor targeted PET of a rat pancreas carcinoma xenograft in nude mice with a <sup>68</sup>Ga-labeled bombesin (6-14) analog.* J Nucl Med. 2005; 46: 691-9.

Varvarigou A, Bouziotis P, Zikos Ch, Scopinaro F, De Vincentis G. *Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging.* Cancer Biother Radiopharm. 2004; 19:219-29.

Welch Michael J. *Handbook of Radiopharmaceuticals.* Ed. Wiley. 2003.

Zhang Xianzhong, Cai Weibo, Cao Feng; Schreibmann Eduard, Wu Yun, Wu Joseph C, Xing Lei, and Chen Xiaoyuan. *<sup>18</sup>F-Labeled Bombesin Analogs for Targeting GRP Receptor-Expressing Prostate Cancer.* The Journal of nuclear medicine. March 2006; 4: No. 3.

Zhang Xianzhong, Xiong Zhengming, Wu Yun, Cai Weibo, Tseng Jeffery R, Gambhir Sanjiv S. and Chen Xiaoyuan. *Quantitative PET Imaging of Tumor Integrin  $\alpha_v\beta_3$  Expression with <sup>18</sup>F-FRGD2.* The Journal of Nuclear Medicine. January 2006; 47: No 1. January 2006.

# Capítulo 4. Materiales y Métodos

## 4.1 Introducción

Diferentes radiofármacos se producen para fines médicos mediante el marcado de diferentes biomoléculas. La manera más fácil de realizar el radiomarcado es conjugando un radionúclido con una molécula específica, método que no es siempre el óptimo puesto que depende principalmente de las propiedades químicas de las partes involucradas en el proceso de marcado. Por ello se han desarrollado otros métodos para radiomarcarse diferentes macromoléculas, en los cuales es necesario el uso de otro compuesto capaz de enlazarlos, uno de ellos es el método indirecto que se discute en este capítulo.

No obstante, no sólo el proceso de radiomarcado es importante, sino también lo es el control de calidad del producto final que incluye pruebas físicas, químicas y biológicas. Todas estas pruebas son necesarias antes de liberar el producto para realizar estudios de diagnóstico en seres vivos, requiriendo métodos de purificación que garanticen la pureza necesaria para su uso, evaluando que el producto tenga un aspecto incoloro y esté libre de partículas, además debe poseer alta pureza radioquímica y encontrarse libre de solventes orgánicos. El método que se emplea para evaluar la pureza radioquímica y purificar el producto es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) que también es discutida en este capítulo.

El desarrollo de fármacos para el uso en humanos involucra protocolos de investigación que no sólo abarca el proceso de la síntesis, sino que también involucra diferentes pruebas que permiten su aplicación (pruebas preclínicas y posteriormente pruebas clínicas). Antes de ser aprobado para su uso en estudios clínicos con pacientes, es necesario realizar una serie de pruebas en animales experimentales en las que se evalúa el grado de toxicidad, biodistribución, eliminación y especificidad del producto, entre otras.

En este trabajo, después de evaluar el aspecto físico del radiofármaco (incoloro y libre de partículas) y ser purificado mediante HPLC, se realizaron pruebas preclínicas y de biodistribución en ratones atímicos.

## 4.2 Producción de [<sup>18</sup>F]Flúor

La producción de <sup>18</sup>F iónico se realizó en el ciclotrón para uso médico tipo RDS 111, propiedad de la Unidad PET de la Facultad de Medicina de la UNAM. La producción de este isótopo de flúor es vía una reacción nuclear tipo (*p, n*), para ello se bombardea con

un haz de protones de 11 MeV un blanco de agua enriquecida isotópicamente con  $^{18}\text{O}$  al 97% (2.4 ml), cuya abundancia natural es aproximadamente del 0.2%. Después de producir el  $^{18}\text{F}$ , se transfiere de manera automatizada del blanco de bombardeo a la celda caliente, quedando atrapado en un cartucho de intercambio iónico de aminas cuaternarias, conocido como QMA (por sus siglas en inglés quaternary methyl ammonium column).

Generalmente se irradió por 1 h en el puerto de irradiación número dos del ciclotrón (Eclipse RDS), con una corriente de  $40 \pm 2 \mu\text{A}$ , obteniendo una actividad típica al final del bombardeo ( $A_{EOB}$ ) de:

$$A_{EOB} = 1.45 \pm 5\% \text{ Ci} = 53.4 \pm 5\% \text{ GBq}$$

Por lo tanto se obtiene una actividad de saturación al final del bombardeo ( $A_{EOSB}$ ) experimental es:

$$A_{EOSB} = \frac{A_{AOB}}{(1 - e^{-\lambda t}) I(\mu\text{A})} = 115.0 \pm 6 \frac{\text{mCi}}{\mu\text{A}} = 4.26 \pm 0.23 \frac{\text{GBq}}{\mu\text{A}}$$

Donde:

- $t$ : Es el tiempo de bombardeo
- $\lambda$ : Es la constante de decaimiento del  $^{18}\text{F}$

Escalando este valor a un enriquecimiento del 100% obtenemos una actividad al final del bombardeo de:

$$A_{EOSB}(100\%) = (1/0.97)A_{EOSB}(97\%) = 118 \pm 6 \frac{\text{mCi}}{\mu\text{A}}$$

Que está en buen acuerdo con el valor teórico de  $120 \pm 10 \text{ mCi}/\mu\text{A}$  reportado en la literatura (BCIT 2000).

### 4.3 Síntesis del precursor del 4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzaldehido

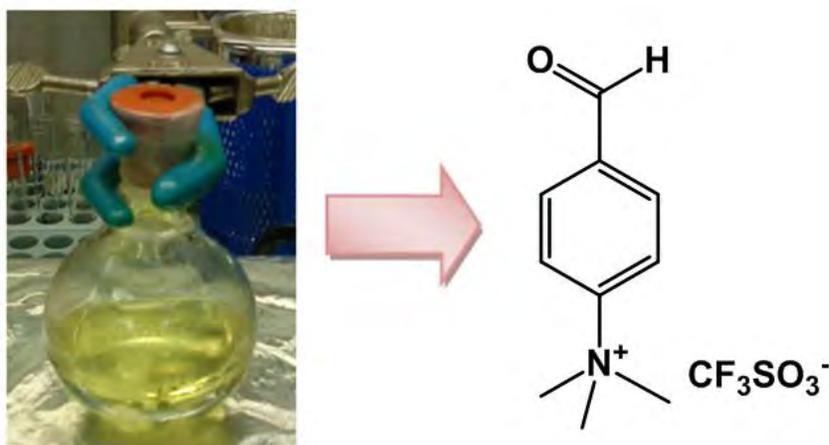
El 4-formil-N,N,N-trimetilanilinio triflato es el compuesto que funge como precursor en la síntesis radioquímica del fluorobenzaldehido, posee un peso molecular de 313.29 g/mol. Los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo la síntesis química de este precursor se muestran en la Tabla 4.1 (Este método fue adaptado de Bruus-Jensen *et al.* 2006.)

**Tabla 4.1.** Reactivos del precursor del fluorobenzaldehído, P.M=peso molecular

Reactivos:	
1	4- Dimetilamino-Benzaldehído al 99%, P.M.= 380.5 g/mol
2	Metiltrifluorometanosulfonato, P. M.= 164.1 g/mol
3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (Diclorometano), P. M = 84.93 g/mol
Materiales:	
4	Matraz de bola, tapón de plástico, agitador magnético, jeringas y papel filtro.

Brevemente se describen los pasos de la síntesis química del 4-formil-N,N,N-trimetilanilinio triflato:

A una solución de 4-N, N-dimetilaminobenzaldehído (66.0 mg, 0.4 mmol) en diclorometano (7 ml), se le agregó metiltrifluorometanosulfonato (54.0  $\mu$ L, 0.5 mmol) a través de una jeringa. Toda la mezcla se realizó bajo una atmósfera inerte. Después la mezcla se agitó durante toda la noche, posteriormente el producto crudo se precipitó adicionando dietil-éter y se recristalizó con diclorometano/éter dietílico. Finalmente el 4-formil-N,N,N-trimetilanilinio triflato se obtuvo en polvo. (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>SF<sub>3</sub>). Figura 4.1



**Figura 4.1.** Síntesis química del 4-formil-N,N,N-trimetilanilinio triflato.

#### 4.4 Síntesis del 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzaldehído

Esta síntesis consiste en transformar el <sup>18</sup>F a la forma química de fluorobenzaldehído [<sup>18</sup>F]FB-CHO (Figura 4.2). El proceso se adaptó y se realizó en la unidad de control de procesos químico o CPCU (chemistry process control unit), que es un

módulo de síntesis radioquímica diseñado para la producción de fluorodeoxiglucosa [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, que cuenta con dos vasos de reacción y posee dos baños de aceite (Figura 4.3).

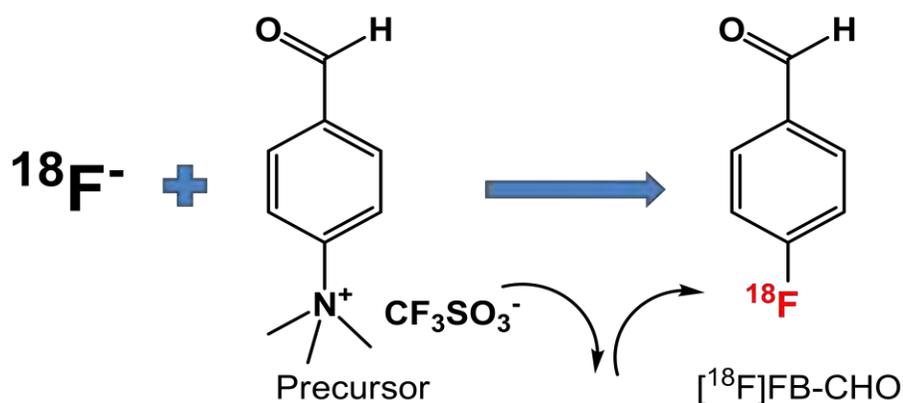


Figura 4.2. Síntesis de [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorobenzaldehído



Figura 4.3. Módulo CPCU, A) vista externa (arreglo de viales), B) vista interna (baños de aceite), C) vista lateral (conexiones) y D) se muestra un vaso de reacción.

La radiosíntesis se realizó mediante la radiofluorinación del precursor 4-formil-N,N,N-trimetilanilinio triflato (Figura 4.2) mediante una reacción de sustitución nucleofílica, se emplearon los dos vasos de reacción del CPCU. Una reacción por sustitución nucleofílica consiste en la sustitución de un reactivo o átomo rico en electrones,

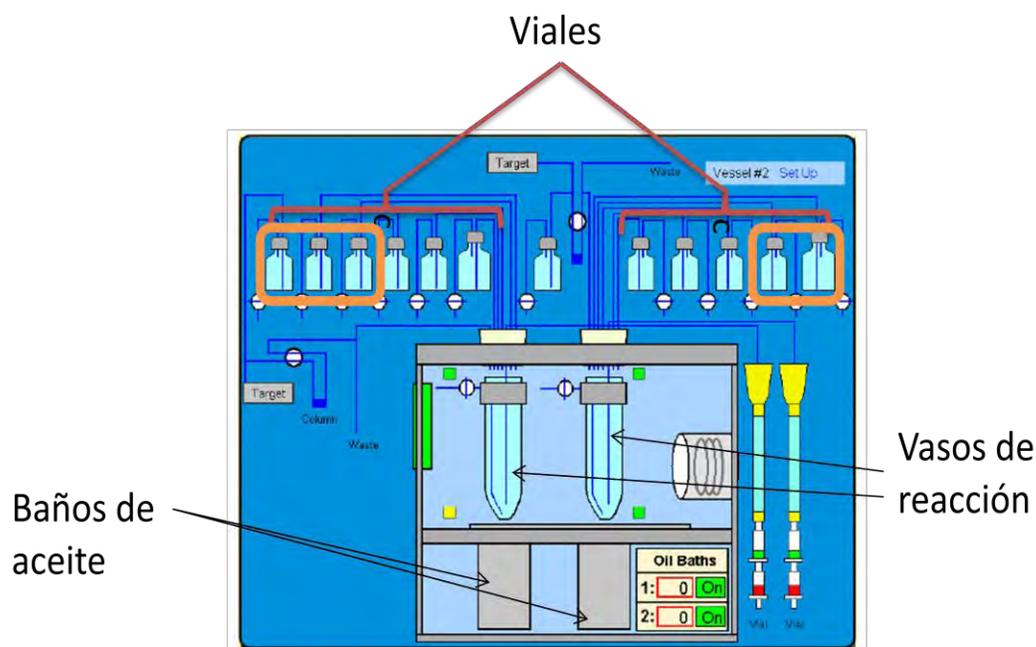
llamado nucleófilo; que reemplaza en una posición de una molécula a un átomo o reactivo pobre en electrones llamada electrófilo, este grupo se denomina grupo saliente (Hart *et al.* 1995).

El control de la temperatura es importante para favorecer la radiosíntesis del [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CHO, por ello se emplearon los dos baños de aceite del CPCU (uno a  $110^\circ\text{C}$  para la destilación azeotrópica y el segundo a  $60^\circ\text{C}$  para la radiofluorinación). Se emplearon 10 viales de reacción de los cuales sólo 5 contenían los reactivos que participan en la síntesis (Tabla 4.2), el resto fueron necesarios para realizar presión y poder transferir el producto de un vaso a otro y después a la celda caliente (Figura 4.4).

**Tabla 4.2.** Reactivos para la síntesis del [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CHO

# Vial	Vaso de reacción 1 ( $110^\circ\text{C}$ )	Vaso de reacción 2 ( $60^\circ\text{C}$ )
1	1.5 ml K-222/ $\text{K}_2\text{CO}_3$	Vial vacío
2	2 ml $\text{CH}_3\text{CN}$	Vial vacío
3	5 mg precursor en 1 ml de DMSO*	Vial vacío
4	Vial vacío	3 ml de $\text{H}_2\text{O}$
5	Vial vacío	10 ml de $\text{H}_2\text{O}$

\*DMSO: dimetil sulfóxido



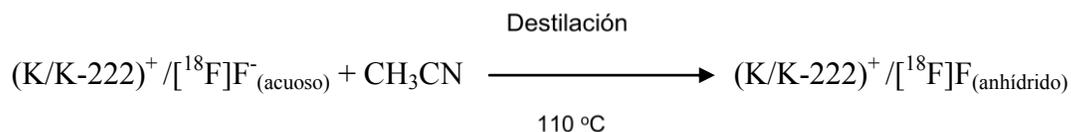
**Figura 4.4.** Pantalla del módulo CPCU. Se emplean 10 viales, dentro de los recuadros se indican los 5 viales que contienen los reactivos.

El manejo del CPCU es semiautomático, los pasos de la radiosíntesis son los siguientes:

1.- Se inicia eluyendo el  $^{18}\text{F}$  con K-222/  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (el compuesto k-222 es conocido como kriptofix) del cartucho QMA y es llevado al primer vaso de reacción.



2.- Se realiza una destilación azeotrópica a  $110^\circ\text{C}$  añadiendo acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) con objeto de pasar de  $^{18}\text{F}$  acuoso a  $^{18}\text{F}$  anhídrido.



3.- Posteriormente se agrega el precursor y se aplica burbujeo mediante un flujo de He y se transfiere al segundo vaso de reacción. La reacción de fluorinación es realizada a  $60^\circ\text{C}$  por 10 min, [Speranza *et al.* 2009].



4.- El producto se diluye con  $\text{H}_2\text{O}$  y se atrapa mediante un cartucho Sep-Pak C18 en la celda caliente.

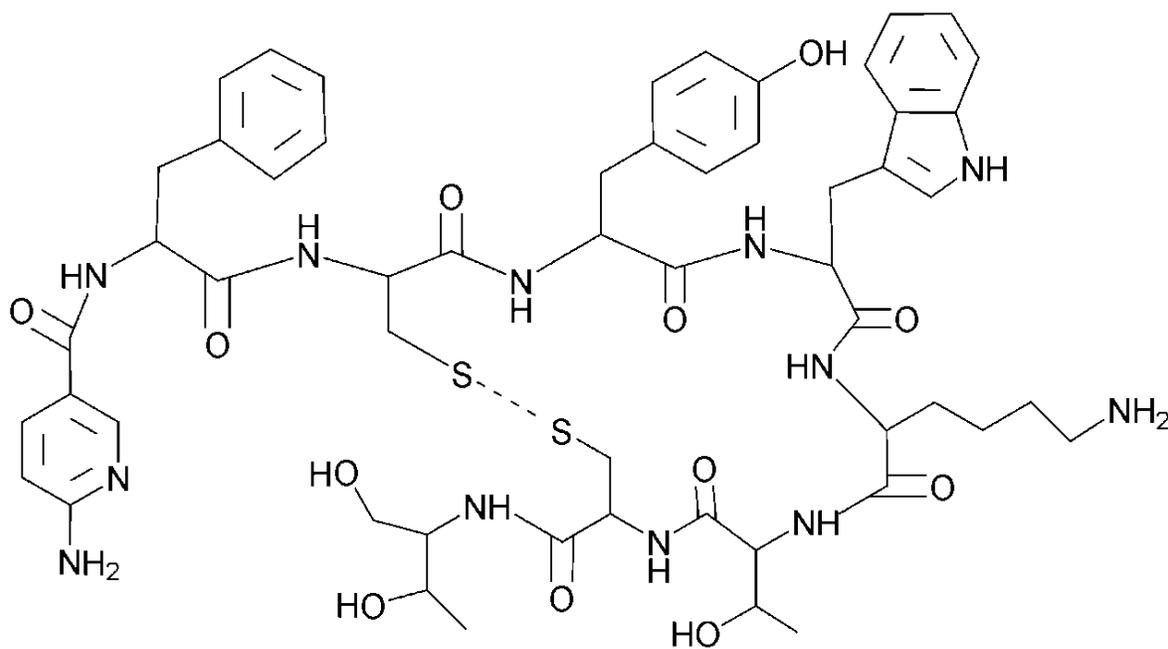
El cartucho Sep-Pak C18, activado con etanol (EtOH), atrapa al fluorobenzaldehído, dejando pasar impurezas generadas durante la síntesis del mismo, así como el resto de materiales que no reaccionaron como es el dimetil sulfóxido (DMSO) y el  $^{18}\text{F}$  libre que no reaccionó. Posteriormente el cartucho C18 fue eluido con EtOH (1.5 ml). El producto se recolectó en 6 fracciones de  $\sim 0.25$  ml cada una. La pureza radioquímica del fluorobenzaldehído se realizó mediante cromatografía de líquidos usando un método de gradiente, EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (10-80% EtOH en 20 min), a un flujo de 3 mL/min y se utilizó una columna semipreparativa de fase reversa, cuyos datos son mostrados en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Datos de la columna.

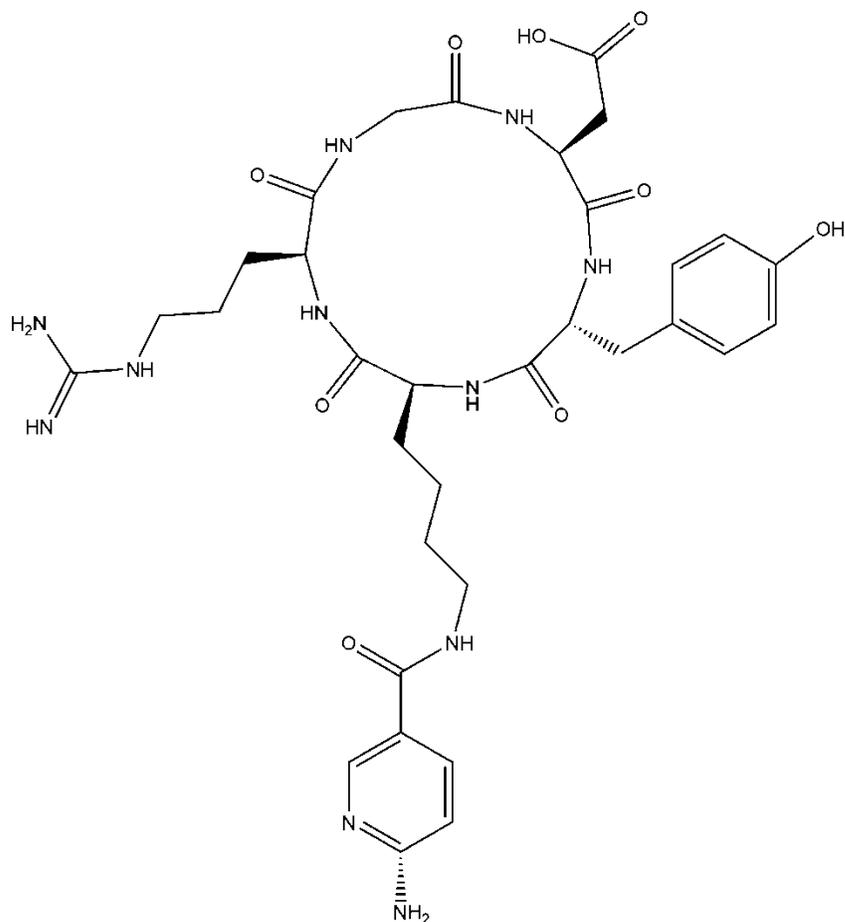
Tipo	Semipreparativa de fase reversa
Marca	YMC-Pack Pro C18
Tamaño de partícula	5-10 $\mu\text{m}$
Longitud	250 x 10 mm

## 4.5 Marcado del péptido

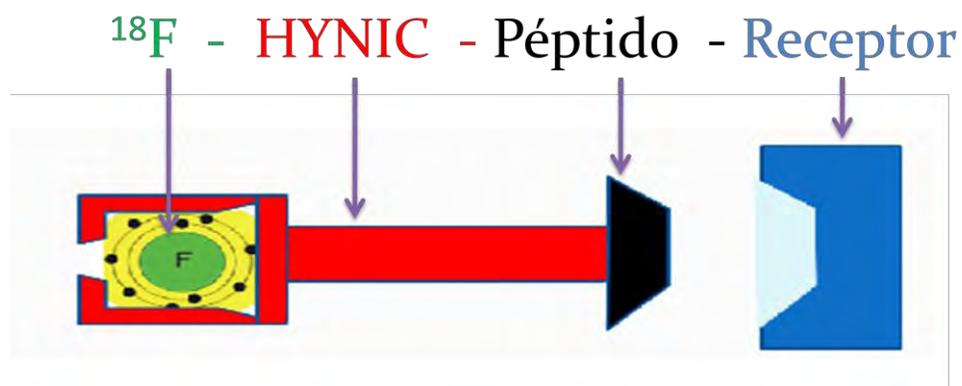
Los péptidos con los que se trabajó para el radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  en forma de  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ , son el Tyr<sup>3</sup>-Octreotide (TOC) y c(RGDyK), cuyas estructuras se muestran en las Figuras 4.5 y 4.6; ambos conjugados al agente quelante bifuncional HYNIC (ácido 6-Hidrazinopiridina-3-Carboxílico). Los pesos moleculares de estas biomoléculas ya conjugadas son 1170.3 g/mol y 755.8 g/mol, respectivamente. El radiomarcado se realizó por medio del método indirecto [Meléndez 2002, González-Vázquez *et al.* 2006], el cual consiste en unir al radionúclido con la molécula específica a radiomarcarse por medio de agentes quelantes bifuncionales, cuya función de estas moléculas es enlazar a manera de puente ambas partes (Figura 4.7).



**Figura 4.5.** Estructura del [Tyr<sup>3</sup>]-Octréotido conjugado al HYNIC.



**Figura 4.6.** Estructura del c(RGDyK) conjugado al HYNIC.

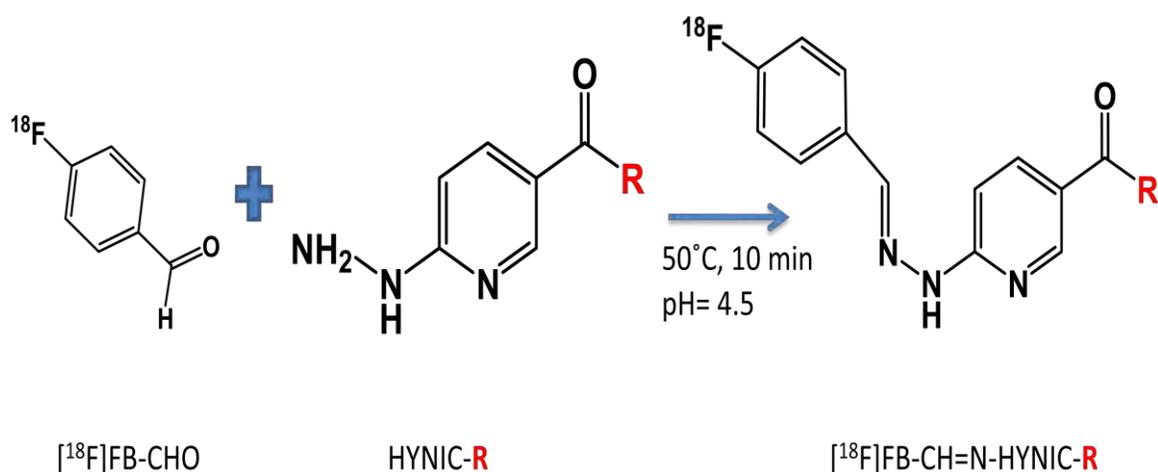


**Figura 4.7.** Radiomarcado de péptidos utilizando como agente quelante bifuncional el HYNIC.

Los péptidos ya mencionados en forma liofilizada (1 mg) fueron obtenidos del Departamento de Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y se encontraban conjugados al HYNIC. Posteriormente ambos péptidos se

prepararon añadiendo 1 mL de una solución amortiguadora (solución Buffer) de 0.5 M NaOAc (acetato de sodio) con pH= 4.5. Se fraccionó cada péptido ya preparado en alícuotas de 100  $\mu$ L, las que se congelaron y posteriormente se emplearon para cada síntesis del marcado con [ $^{18}$ F]FB-CHO.

El radiomarcado se llevó a cabo incubando el péptido (TOC o RGD) con [ $^{18}$ F]FB-CHO, agregando 50  $\mu$ L de este último por cada 100  $\mu$ L de péptido, en un baño seco a una temperatura de 50°C por un tiempo de 25 min (Figura 4.8). Después de la incubación se colocó el producto ([ $^{18}$ F]FB-CH=N-HYNIC-RG) en hielo durante 1 min con el objeto de bajar la temperatura. La purificación del producto final se realizó por medio de HPLC, empleando una columna semipreparativa de fase reversa (Tabla 4.3 previamente mostrada), utilizando el mismo método de gradientes, es decir: EtOH/H<sub>2</sub>O (10-80% en 20 min) a un flujo de 3 mL/min. [Lee *et al.* 2008].



**Figura 4.8.** Proceso del radiomarcado de péptidos

## 4.6 Cromatografo de líquidos

La cromatografía es una técnica que permite la separación, identificación y determinación de los componentes o solutos de una mezcla, por medio de la migración de los mismos a diferentes velocidades a causa de factores como: solubilidad, tamaño molecular, densidad, carga y fuerzas de Van der Waals y afinidad con la resina [Farmacopea, 2008]. La muestra se distribuye entre dos fases (una estacionaria y una móvil), de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria.

Las características del equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución o HPLC (high performance liquid chromatography) que se empleó están contenidas en la Tabla 4.4 y la Figura 4.9. En este caso el uso del equipo de HPLC consistió en inyectar muestras de cada uno de los productos obtenidos mediante su respectiva síntesis, es decir se inyecta una muestra de [<sup>18</sup>F]FB-CHO para verificar si realmente es fluorobenzaldehído e identificar impurezas químicas y radioquímicas, así como conocer su tiempo de retención (para ello también se mezcla la muestra con [<sup>19</sup>F]FB-CHO estándar). Posteriormente se inyectó nuevamente la muestra del radiopéptido, con el objetivo de separar el producto de impurezas y purificarlo, además se conoció el tiempo de retención ( $t_R$ ) para cada producto.

**Tabla 4.4.** Cromatógrafo HPLC

Marca	Waters
2 bombas	515 HPLV Pump
Detector UV (absorbancia dual)	Waters 2487
Detector de Radiación	NaI (TI) BIOSCAN, INC
Detector de Conductividad	Waters 432
Detector del índice de refracción	Waters 2410



**Figura 4.9.** Cromatógrafo de líquidos.

## 4.7 Animales experimentales y consideraciones éticas

Después de realizar la purificación de los péptidos radiomarcados, se realizaron estudios preclínicos con ratones atómicos para evaluar la biodistribución y captación del radiopéptido (RGD radiomarcado). Los ratones atómicos son roedores modificados genéticamente para que presenten un sistema inmune deficiente y son un modelo útil para

estudiar procesos de alotransplantes, ya sea de proteínas y péptidos ajenos o tejidos extraños.

La evaluación de los radiopéptidos se llevó a cabo utilizando ratones atímicos con tumores inducidos en el lomo derecho de la línea celular C6 que corresponde a un modelo (xenógrafo) murino de glioblastoma. Se trabajó con un camada de ocho ratones machos de este tipo (cuando el tumor tenía 1 cm de diámetro), con un peso promedio de 27g. Los ratones con el tumor inducido fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). La inoculación de los ratones fue subdérmica con un millón de células de la línea ya mencionada, el procedimiento de inoculación de células tumorales en los roedores atímicos fue establecido por la Comisión de Ética del INCMNSZ para el manejo y uso de animales de investigación.

Posteriormente, el manejo de los animales una vez que fueron entregados se llevó a cabo siguiendo los lineamientos establecidos en el manual de procedimientos de la Comisión de Ética de la División de Investigación de la Facultad de Medicina y la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. El grupo de ratones bajo estudio se mantuvo en condiciones estériles dentro de jaulas de policarbonato con camas de aserrín, con libre acceso a comida y agua, se les proporcionó una temperatura y ventilación adecuada dentro del bioterio de la Unidad PET/CT- Ciclotrón de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## **4.8 Adquisición de imágenes microPET**

La adquisición de los estudios preclínicos se realizó en un equipo microPET Focus 120 (Concorde, Microsystems, Inc.) propiedad de la Unidad PET. Este equipo es un escáner PET exclusivo para animales pequeños como ratas, ratones y otros roedores de similar tamaño, véase Figura 4.10, en el cual se realiza investigación básica y preclínica *in vivo* de los radiofármacos producidos.



**Figura 4.10.** MicroPET Focus 120.

El microPET Focus 120 cuenta con detectores a base de Oxi-Ortosilicato de Lutecio (LSO), posee un software para la adquisición de datos que permite variar la ventana de energía en un rango de 0-814 keV y variar la ventana temporal (2, 6, 10 y 14 ns). También cuenta con algoritmos de reconstrucción tales como retroproyección filtrada (FBP) en 2D y OSEM (maximización de expectativas de subconjuntos ordenados) en 2D y 3D. Hace correcciones por atenuación, tiempo muerto y decaimiento. Otras de las características de este equipo de microtomografía se muestran en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.** Características del microPET Focus 120

Resolución espacial	1.4 mm
Diámetro del detector	15 cm
Apertura	10 cm
Campo de visión (axial)	7.6 cm
Campo de visión (transaxial)	10 cm
Bloque de detectores	96
Elementos de cristal	13844

Los ratones atómicos fueron anestesiados dentro de una cámara de inducción a base de isoflurano al 3.5-4.5% y el resto de oxígeno a 0.5 L/min (para dos ratones). Posteriormente los animales fueron colocados sobre la cama del microPET bajo una luz incandescente para mantener una temperatura corporal cercana a 37°C. El roedor se mantuvo anestesiado durante todo el tiempo de estudio con una mascarilla que cubre la nariz y boca con una dosis de isoflurano al 1.5-2.5% y el resto con oxígeno a 0.5 L/min.

La administración del radiofármaco fue por vía intravenosa por una vena lateral de la cola del roedor. La actividad inyectada del radiofármaco oscila entre 7.4-18.5 MBq (200-500  $\mu$ Ci). Se realizó la adquisición de imágenes dinámicas con una duración aproximada de

60-90 min. Una vez terminado el estudio de microPET, los animales son sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg por kg de peso). Cabe mencionar que todo el procedimiento se realizó con medidas de protección radiológica siguiendo el Reglamento General de Seguridad Radiológica, emitido por la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias.

## 4.9 Estudios de biodistribución

Posteriormente, al sacrificio de los ratones, se realizó la disección de órganos y tejidos de interés para cuantificar la captación del radiofármaco en los mismos y determinar el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido mediante la ecuación siguiente:

$$\%IA = \frac{\frac{A_T}{A_I}}{W_T} \times 100 \quad 4.1$$

Dónde:

- $A_T$ : Es la actividad medida en el órgano o tejido de interés corregida por decaimiento a la hora de inyección.
- $A_I$ : Es la actividad inyectada.
- $W_T$ : Es el peso del órgano o tejido en gramos.

Para medir la actividad en los diferentes órganos y tejidos se emplea un detector de pozo de centelleo (NaI [Tl]) con las características que se muestran en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6.** Detector de pozo.

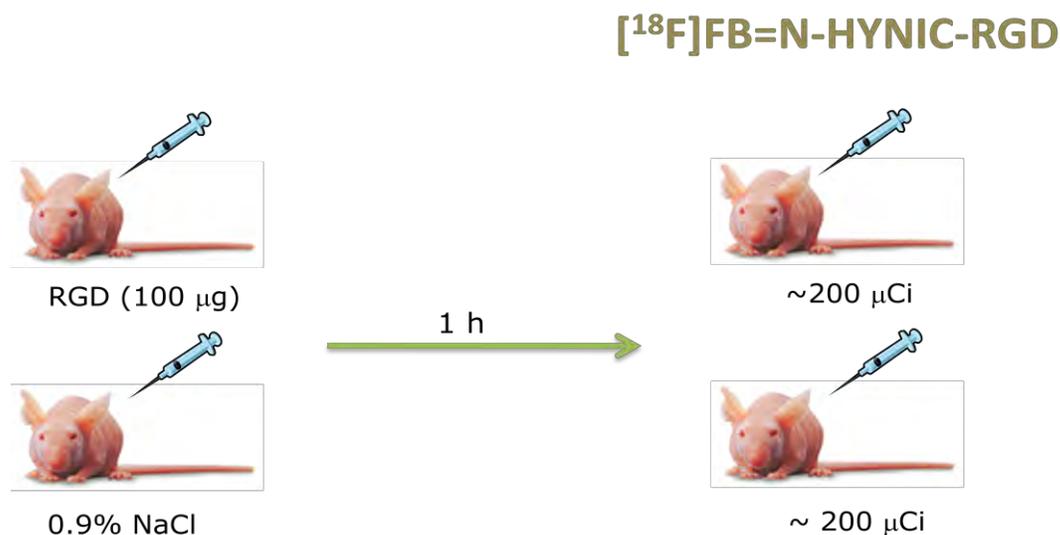
Marca	LTI (laboratory Technologies, ING )
Modelo	Wiper-100
Serie	W10103

Los cadáveres de los animales se mantienen en un congelador por un periodo mínimo de 24 horas para permitir el decaimiento del  $^{18}\text{F}$  ( $\tau_{1/2} = 110 \text{ min}$ ), posteriormente fueron llevados al incinerador del Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina para su manejo final.

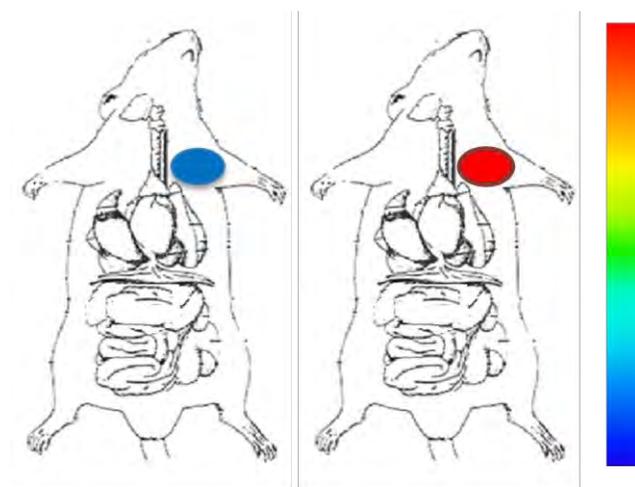
## 4.10 Método de bloqueo de receptores

El bloqueo de receptores es una técnica que como su nombre lo indica consiste en bloquear los receptores para un determinado ligando. Es un método de control que permite evaluar la especificidad de unión de un compuesto a otro muy bien determinado. Es un método ampliamente usado y reportado en la literatura. Algunos autores que han empleado esta técnica para ver la especificidad de un determinado radiofármaco son Zhang *et al.* 2005, Chen *et al.* 2004, Haubner *et al.* 2005, Decristoforo *et al.* 2006.

Con este método de bloqueo de receptores se evaluó la especificidad del [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RG para las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ . Para ello se tomaron dos ratones atómicos de los cuales a uno se le inyectó el péptido sin marcar (100  $\mu\text{g}$  de RGDfK), con el fin de bloquear sus receptores y al otro se le inyectó solución salina como efecto placebo (0.9% NaCl). Posteriormente, ambos roedores permanecieron en reposo por una hora antes de aplicarles el radiopéptido para después adquirir imágenes, véase Figura 4.11. La especificidad del radiofármaco por las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  fue observado mediante las imágenes, es decir para el ratón cuyos receptores habían sido bloqueados (inyectado con el péptido sin marcar) se esperó una captación pobre del radiofármaco, mientras que para el ratón que fue inyectado con solución salina se esperó una mayor captación de actividad en el tumor debida a la unión del radiofármaco con sus receptores específicos, véase Figura 4.12.



**Figura 4.11.** Bloqueo de los receptores con el péptido RGD, posteriormente se aplica el radiofármaco.



Captación

**Figura 4.12.** Modelo teórico del método de bloqueo de receptores. Receptores bloqueados (izquierda) y viceversa para el roedor sin bloquear (derecha).

## Referencias

BCIT. “British Columbia Institute of Technology” Health Sciences. Nuclear Medicine, Julio 2000.

Bruus-Jensen K, Poetheko Thorsten, Schottelius Margret, Hauser Andrea, Schwaiger Marku, Hans-Jürgen. *Chemoselective hydrazone formation between HYNIC-functionalized peptides and <sup>18</sup>F-fluorinated aldehydes*. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33:173-183.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. 9 Edición, Vol. 1 México 2008.

Gómez-Ullate R. Rafael, Serrano Álvarez Alonso. *Cromatografía Principios y Aplicaciones*. (<http://www.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>).

Hart Harold, Craine Leslie E, Hart David J, *Química Orgánica*. Novena Edición, McGraw Hill. 1995.

Lee Yun Sang, Jae Min Jeong, Hyung Woo Kim, Young Soo Chang, Young Joo Kim, Mee Kyung Hong, Ganesha B. Rai, Dae Yoon Chi, Won Jun Kang, Joo Hyun Kang, Dong

Soo Lee, June-Key Chung, Myung Chul Lee, Young-Ger Such; *An improved method of  $^{18}\text{F}$  peptide labeling: hydrazone formation with HYNIC-conjugated c(RGDyK)*. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33:677-683.

Meléndez Alafort Laura. *Radiomarcado de Péptidos para Diagnóstico y Terapia*. Fac. de Medicina, UAEM. (<http://www.quimicanuclear.org>)  
RDS 111 Operating Instruction. December 2000.

Speranza A, Ortosecco G, Castaldi E, Nardelli A, Pace L, & Salvatore M. *Fully automated synthesis procedure of 4-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzaldehyde by comercial synthesizer: Amino-oxi peptide labelling prosthetic group*. Appl. Radiat. Isot. 2009; 67:1664-1669.

Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio* (sección 5.1 roedores).

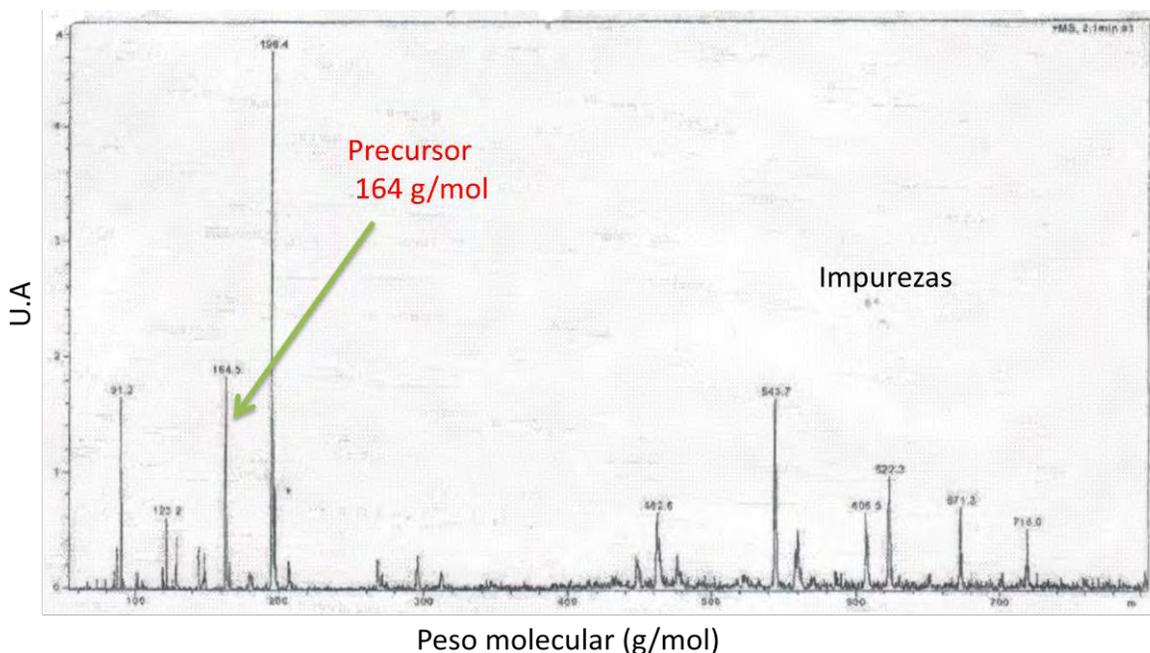
Zhang Xianzhong, Xiong Zhengming, Wu Yun, Cai Weibo, Tseng Jeffery R, Gambhir Sanjiv S, and Chen Xiaoyuan. *Quantitative PET Imaging of Tumor Integrin  $\alpha_v\beta_3$  Expression with  $^{18}\text{F}$ -FRGD2*. The Journal of Nuclear Medicine. January 2006; 47: No 1.

# Capítulo 5. Resultados y Discusión

## 5.1 Síntesis del precursor de 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzaldehído

El rendimiento que se obtuvo fue del 30%. Se realizaron dos síntesis, en la primera se obtuvo una cantidad de 350 mg de producto y en la segunda 264 mg de producto, con un total por ambas síntesis de 614 mg, suficiente para realizar 61 radiosíntesis de fluorobenzaldehído empleando 10 mg de precursor por radiosíntesis.

La caracterización química de este compuesto se llevó a cabo por espectrometría de masas en colaboración con el Departamento de Materiales Radiactivos del ININ. Los resultados mostraron que el precursor de fluorobenzaldehído presenta posible polimerización y diversas impurezas, aunque claramente se detecta el compuesto de interés con un peso molecular de 164 g/mol (se estima que a la pureza química es ~20%), véase Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Estudio de espectrometría de masas del precursor 4-formil-N,N,N-trimetilanilinio triflato.

Las impurezas químicas generadas que aparecen se deben a restos y reacciones químicas de los reactivos que intervienen en la síntesis de este precursor, las cuales son eliminadas durante el proceso de purificación del fluorobenzaldehído y posteriormente en la purificación radioquímica del péptido marcado. Comparando el rendimiento obtenido en este trabajo (30% y con ~20 de pureza química) con el reportado por Bruus-Jensen *et al.* 2006, tuvimos un rendimiento bajo ya que ellos obtienen con el mismo proceso de síntesis

un rendimiento del 71%, aunque no especifican la pureza química del producto. Estas diferencias pueden atribuirse al control que se pueda tener en el manejo de los reactivos sensibles al oxígeno y a la atmosfera inerte para llevar a cabo la síntesis química.

## 5.2 Radiosíntesis del 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzaldehido

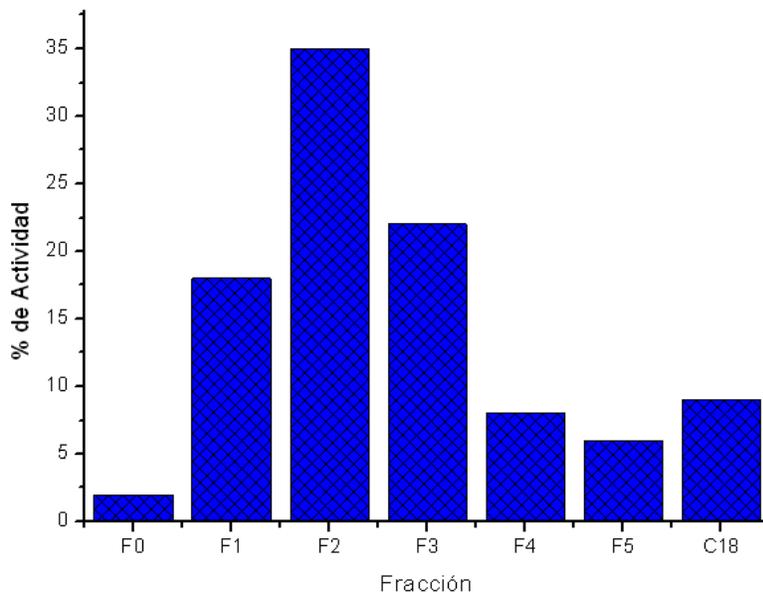
La síntesis radioquímica de [<sup>18</sup>F]FB-CHO se adaptó y realizó en el módulo automatizado CPCU. El rendimiento obtenido fue del 30% corregido por decaimiento. La síntesis radioquímica tuvo una duración de aproximadamente 50 min y la pureza radioquímica del producto ([<sup>18</sup>F]FB-CHO) fue >98% la cual se evaluó mediante HPLC, después de eluir el cartucho Sep-Pak C18 con etanol (EtOH).

Cabe mencionar que antes de emplear EtOH para la elución del cartucho C18, se usaron metanol (MeOH) y diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) como solventes orgánicos en la activación y elución del cartucho. Los resultados mostraron que la elución del C18 con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> es más eficiente comparado con el MeOH o EtOH, puesto que el producto obtenido es aproximadamente del 95±3% para el primero, mientras para que los últimos la elución oscila en el 90±2%. Estos resultados son similares a los reportados por Speranza *et al.* 2009, quienes eluyeron el fluorobenzaldehido del C18 empleando sustancias orgánicas similares, entre ellas el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y EtOH.

Se ha mencionado que el rendimiento que se obtuvo de la síntesis del fluorobenzaldehido fue del 30%, valor relativamente bajo comparado con el reportado por Bruus-Jensen *et al.* 2006 cuyo rendimiento oscila entre 52-77%. Sin embargo, en este trabajo la radiosíntesis fue llevada a cabo empleando dos vasos de reacción, y adaptada en el CPCU, módulo originalmente diseñado para la producción de [<sup>18</sup>F]FDG. La principal pérdida de la actividad de <sup>18</sup>F se originó en el proceso de transferencia del material de un vaso de reacción a otro (alrededor del 50% se perdió en este paso). El hecho de emplear dos vasos de reacción fue necesario puesto que la temperatura juega un papel importante para llevar a cabo la reacción por sustitución nucleofílica. Inicialmente se sintetizó el fluorobenzaldehido en un sólo vaso de reacción, mediante esta forma no hubo pérdida de actividad que no fuera por decaimiento; pero el mayor problema que se presentó fue el hecho de no controlar o variar la temperatura, implicando menores eficiencias en la transformación para fluorobenzaldehido y una mayor cantidad de impurezas radioquímicas se generaban durante esta radiosíntesis.

El cartucho C18 fue eluido con 1.5 mL de EtOH y el producto fue recolectado en pequeñas fracciones (seis con un volumen ~0.25 mL) con el propósito de obtener la máxima actividad en un menor volumen, para posteriormente incubarlo junto con el

péptido a radiomarcarse. La Gráfica 5.1 muestra el porcentaje típico de actividad del producto en cada fracción después de la elución y la actividad remanente en el cartucho C18.



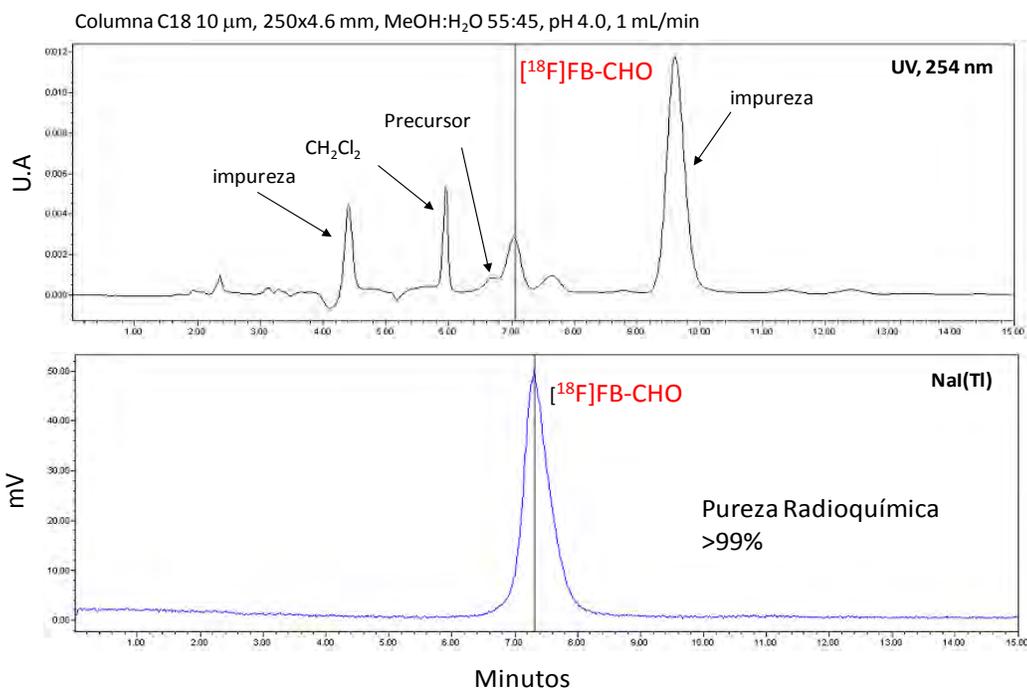
**Gráfica 5.1.** Porcentaje típico de [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CHO eluido en fracciones consecutivas de aproximadamente 250  $\mu\text{L}$  de etanol.

La pureza radioquímica del fluorobenzaldehído fue evaluada por HPLC, después del proceso de purificación en el Sep-Pak de C18, se probaron diferentes fases móviles y gradientes, los cuales se discuten a continuación:

### 1.- Determinación de la pureza radioquímica con fase móvil a base de MeOH.

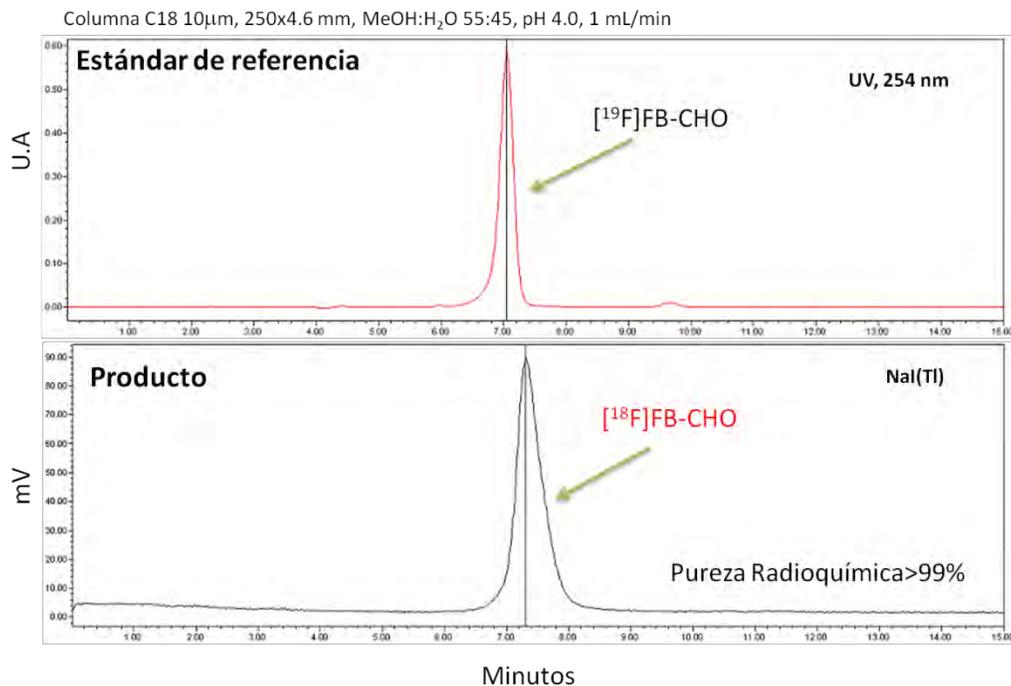
Para este propósito se utilizó una fase móvil de metanol (MeOH) al 55% con  $\text{pH}=4$ , en una columna de C18 con tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$ , con dimensiones de 250 x 4.6 mm y un flujo de 1 mL/min. Bajo estas condiciones el tiempo de retención del [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CHO es de 7 min.

En la Figura 5.2 se muestra el fluorobenzaldehído obtenido con el precursor que se sintetizó, observando en el cromatograma correspondiente al detector de UV, se observan picos de masas que no corresponden al fluorobenzaldehído, los cuales corresponden a impurezas contenidas en el precursor químico. Por otra parte el cromatograma debido al detector de radiación muestra la pureza radioquímica del producto, la cual es  $>99\%$  indicando que el [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CHO es el único compuesto radiactivo.



**Figura 5.2.** Cromatografía del fluorobenzaldehído. En la parte superior se tiene el cromatograma UV y la parte inferior se tiene el que corresponde al detector de radiación.

También se realizó una segunda cromatografía, pero ahora co-inyectando el producto sintetizado y fluorobenzaldehído estándar (con <sup>19</sup>F), tal como se observa en la Figura 5.3.

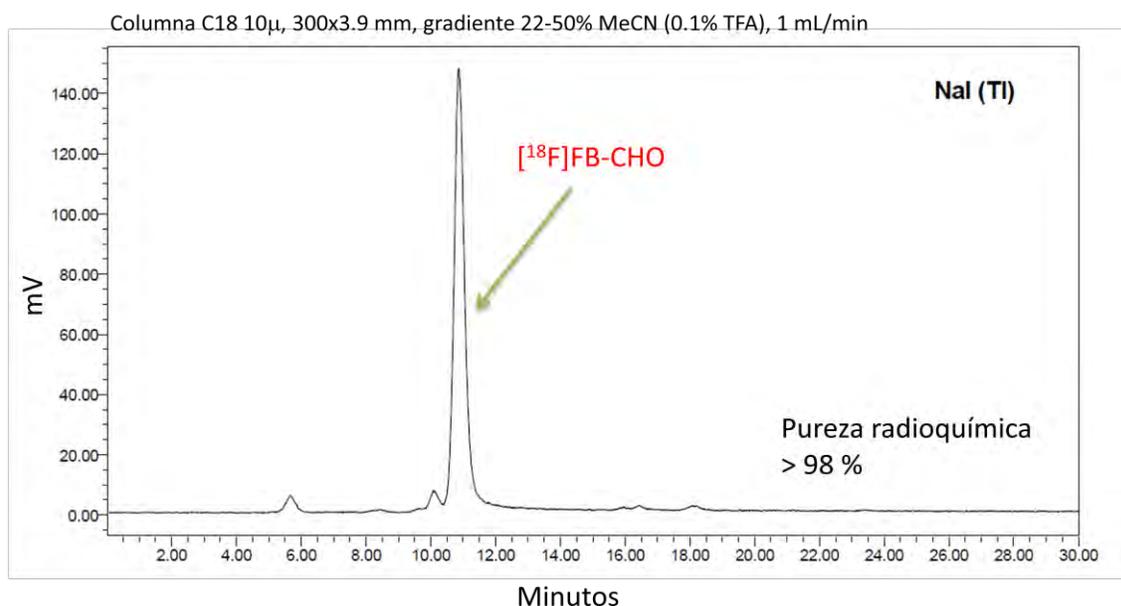


**Figura 5.3.** Cromatógrama (HPLC) del [<sup>19</sup>F]FB-CHO y [<sup>18</sup>F]FB-CHO.

La figura anterior muestra los cromatogramas correspondientes al  $^{18}\text{F}$ -FB-CHO (detector de radiación) y al estándar de referencia  $^{19}\text{F}$ -FB-CHO (detector UV). Esta es la forma con la que se verificó que el producto sintetizado es realmente fluorobenzaldehído ya que tanto el  $^{18}\text{F}$ -FB-CHO como el estándar presentan el mismo tiempo de retención ( $t_R=7$  min), tiempo característico en cada compuesto. En estos cromatogramas puede observarse un desplazamiento entre ambos picos correspondientes al fluorobenzaldehído, lo cual se debe al tiempo que tarda en pasar el producto de un detector a otro. No se observan impurezas químicas en el UV puesto que la cantidad de estándar empleada genera una señal mayor que impide ver la intensidad de las impurezas (trazas).

## 2.- Determinación de la pureza radioquímica con fase móvil a base de MeCN.

Siguiendo las recomendaciones reportadas por Bruus-Jensen *et al.* 2006, se empleó un método de gradientes utilizando MeCN/H<sub>2</sub>O, ambos con 0.1% de ácido trifluoracético (TFA). El gradiente utilizado fue de 22-50% MeCN en 20 min, a un flujo de 1 mL/min en una columna analítica con tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$ , con dimensiones de 300 x 3.9 mm (Figura 5.4). Bajo estas condiciones  $^{18}\text{F}$ -FB-CHO tiene un  $t_R=11$  min.

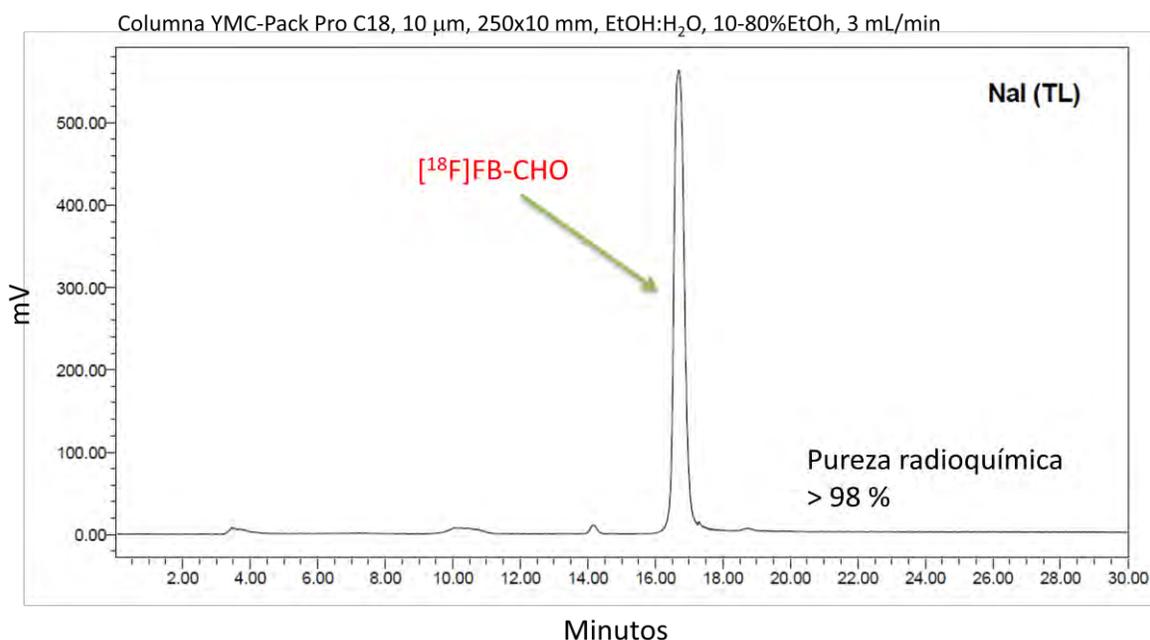


**Figura 5.4.** Cromatograma de fluorobenzaldehído utilizando un método de gradientes MeCN/H<sub>2</sub>O.

En la Figura 5.4, se observa que el fluorobenzaldehído posee una pureza radioquímica >98% y un tiempo de retención de  $t_R=11$  min. Estos resultados concuerdan muy bien con los reportados por Bruus-Jensen *et al.* 2006, teniendo una diferencia porcentual de 2.7%, puesto que el tiempo de retención fue de  $\sim 10.7$  min en su caso.

### 3.- Determinación de la pureza radioquímica con fase móvil a base de EtOH.

Otra fase móvil con la cual se corrió la muestra del fluorobenzaldehído fue mediante el gradiente de EtOH/H<sub>2</sub>O, 10-80% EtOH en 20 min, método adaptado de Lee *et al.* 2006. Para realizar la cromatografía se utilizó una columna semipreparativa de fase reversa con tamaño de partícula de 10 μm, 250 x 10 mm y un flujo de 3 mL/min. La pureza radioquímica del producto fue >98% con un tiempo de retención  $t_R=16.5$  min (Figura 5.5), en la referencia previamente mencionada el fluorobenzaldehído presenta un tiempo de retención de 17.4 min. Esta diferencia del 5% se debe a que se empleó una columna diferente a la recomendada.



**Figura 5.5.** Cromatógrama de  $^{18}\text{FB-CHO}$ .

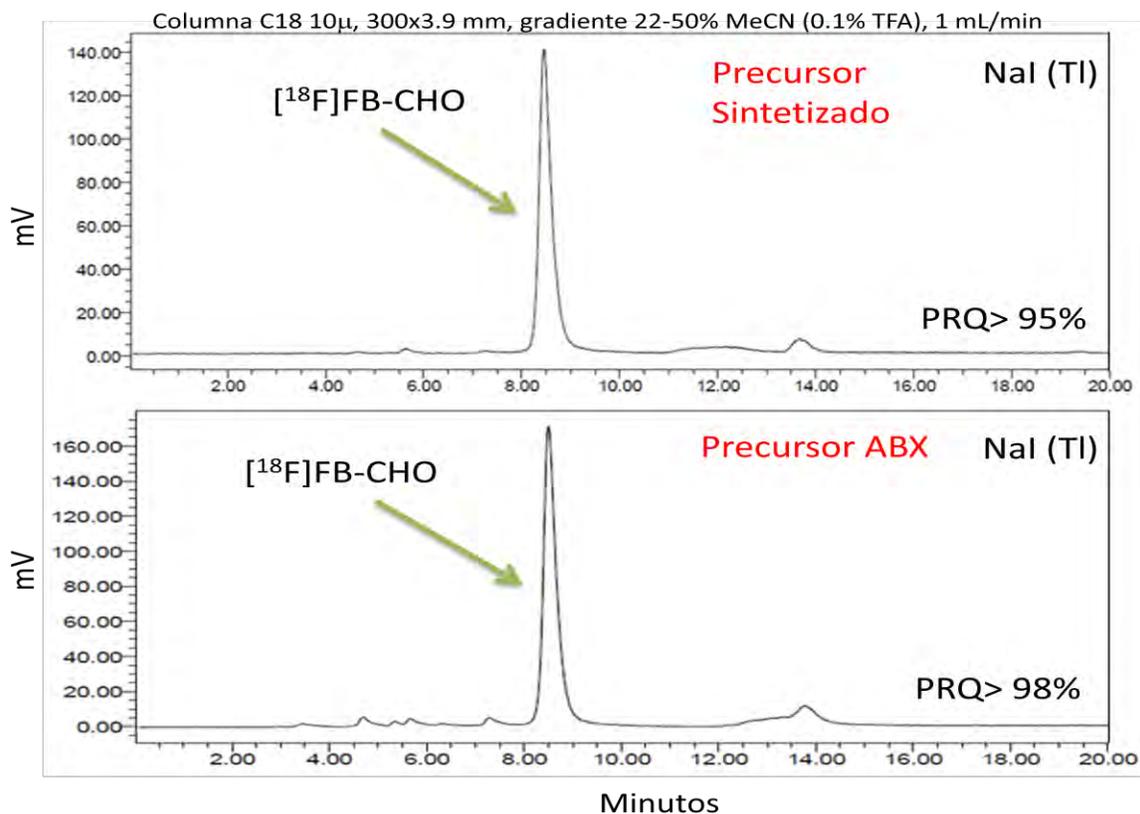
Comparando las tres fases para correr la cromatografía de separación o purificación (Tabla 5.1), la última presenta ventaja sobre las dos primeras, ya que el EtOH es una sustancia orgánica inyectable a una concentración adecuada (10% EtOH), característica que no presentan las fases de MeOH y MeCN, lo que implica realizar un segundo proceso para cambiar la solución en la que se encuentra suspendido el producto. Esta cualidad del etanol hizo que el gradiente a base de este compuesto fuera el que se empleara también para la purificación del radiopéptido.

**Tabla 5.1.** Tiempo de retención del [<sup>18</sup>F]FB-CHO

Método	Fase móvil	Gradiente	t <sub>R</sub> (min)	
1	MeOH:H <sub>2</sub> O	No	7	No inyectable
2	MeCN/H <sub>2</sub> O con 0.1% TFA	20-50% MeOH en 20 min	11	No inyectable
3	EtOH/H <sub>2</sub> O	10-80% EtOH en 20 min	16.5	Inyectable

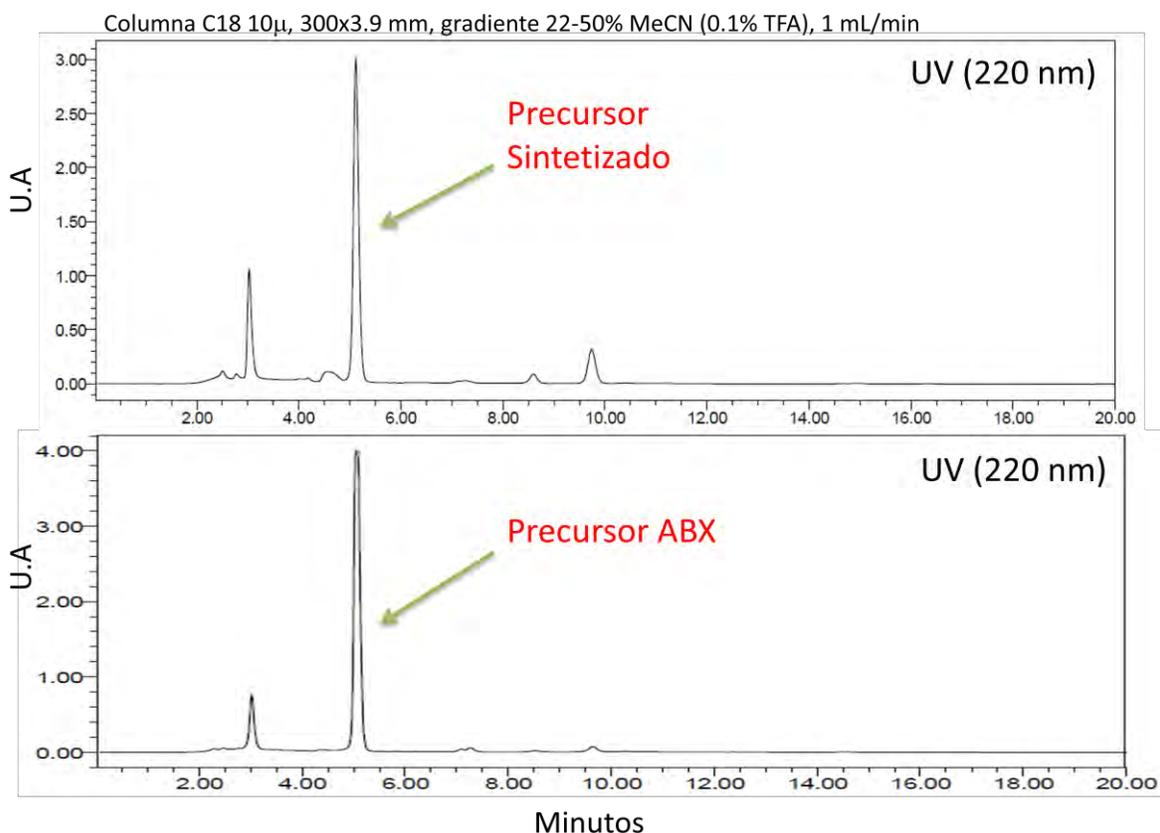
#### 4.- Comparación del precursor de Fluorobenzaldehido

Se adquirió comercialmente también el precursor de fluorobenzaldehido de ABX (Advanced Biochemical Compounds) y se realizaron radiosíntesis con el mismo. Posteriormente se realizó un estudio comparativo entre los cromatogramas de HPLC del fluorobenzaldehido sintetizado en este trabajo con el precursor adquirido. No se encontraron diferencias significativas entre el producto sintetizado con el precursor de ABX. Es decir aunque la pureza química del precursor sintetizado fue de ~ 20% comparada con el precursor comercial (>90%), el problema fue resuelto añadiendo una cantidad mayor de nuestro precursor para obtener un rendimiento similar que con el de ABX. Las impurezas químicas fueron eliminadas en el proceso de purificación, la gran mayoría mediante el cartucho C18, y en cuanto a pureza radioquímica obtuvimos >95%, tan buena como con el precursor adquirido (Figura 5.6). Cabe señalar que el precursor comercial tiene un precio de \$5 usd por miligramo (\$1250 usd por 250 g), mientras que en este trabajo obtuvimos la misma cantidad de precursor con una inversión de ~\$2000 pesos.



**Figura 5.6.** Cromatogramas del fluorobenzaldehído, mediante el detector de radiación. Arriba obtenido con el precursor sintetizado, Abajo el obtenido con el precursor comercial (ABX).

Por otra parte los cromatogramas del UV para una longitud de onda de 220 nm muestran que el precursor que fue sintetizado tiene mayores impurezas químicas que el precursor de ABX, pero la gran mayoría de ellas fueron eliminadas en el proceso de purificación con el C18 (Figura 5.7) y/o en el proceso de purificación del péptido radiomarcado.

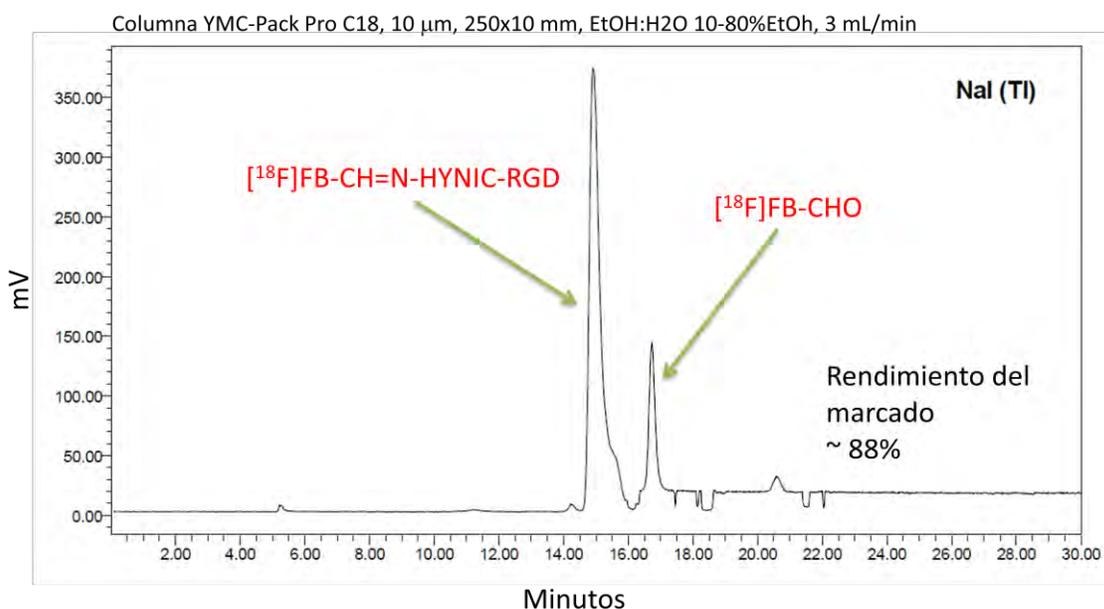


**Figura 5.7.** Cromatogramas de las impurezas químicas en el fluorobenzaldehído. Arriba obtenido con el precursor sintetizado, abajo el obtenido con el precursor comercial mediante el detector de UV.

### 5.3 Radiomarcado del péptido

Se realizó el radiomarcado para los péptidos [Tyr<sup>3</sup>]-Octreótido y el c[RGDyK]. El procedimiento para el radiomarcado consistió en incubar 100  $\mu$ g de péptido en 100  $\mu$ L de solución Buffer de 0.5 M NaOAc y pH= 4.5 con [<sup>18</sup>F]FB-CHO (50  $\mu$ L). El proceso de incubación fue por 25 min a una temperatura de 50°C. La purificación del producto final ([<sup>18</sup>F]FB-CH=N-HYNIC-Péptido) se realizó por HPLC utilizando un método de gradientes de EtOH/H<sub>2</sub>O (10-80% de EtOH en 20 min). El rendimiento que se obtuvo mediante este método oscila entre 60-88% de la actividad debida al fluorobenzaldehído que se usó para el radiomarcado y un rendimiento total de radiomarcado entre 18-26% partiendo de la actividad inicial de <sup>18</sup>F. Los radiopéptidos se obtuvieron en formulación farmacéutica con una pureza radioquímica >95%, la incubación de los mismos más el proceso de purificación fue aproximadamente de una hora.

El monómero c(RGDyK) fue radiomarcado y purificado con el método previamente descrito, empleando una columna tipo semipreparativa a un flujo de 3 mL/min, véase Figura 5.8. Comparando [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RGD que se sintetizó en este trabajo con [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD, radiofármaco que ha tenido buenos resultados y por consiguiente es altamente usado para evaluar vascularización tumoral; la principal diferencia entre ambos RGD radiomarcados radica en el proceso de producción, puesto que en nuestro caso el  $^{18}\text{F}$  fue convertido a la forma química de [ $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzaldehído, mientras en el segundo caso se llevó a la forma química de [ $^{18}\text{F}$ ]fluoropropionato. Otra diferencia entre los dos productos es la molécula “link” que une al radionúclido con el RGD. Nuestra síntesis consistió en usar un agente quelante (HYNIC) mientras que Haubner *et al.* 2005, emplean galactosa como molécula de unión. En cuanto a farmacocinética no podemos compararlos, puesto que nuestro producto no ha sido evaluado en este punto. El [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD ha mostrado resultados satisfactorios en pruebas preclínicas y estudios con pacientes, donde se observa una rápida depuración sanguínea de este radiopéptido y la captación del mismo por lesiones tumorales que sobre-expresa integrinas  $\alpha_v\beta_3$ . Por otra parte, comparando el [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RGD que se sintetizó con el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-RGD, que ya ha sido radiomarcado aquí en México (ININ), la diferencia entre estos dos radiofármacos es el radionúclido, puesto que el producto que sintetizamos es un radiofármaco para el diagnóstico clínico para PET, mientras el segundo lo es para imágenes mediante SPECT.

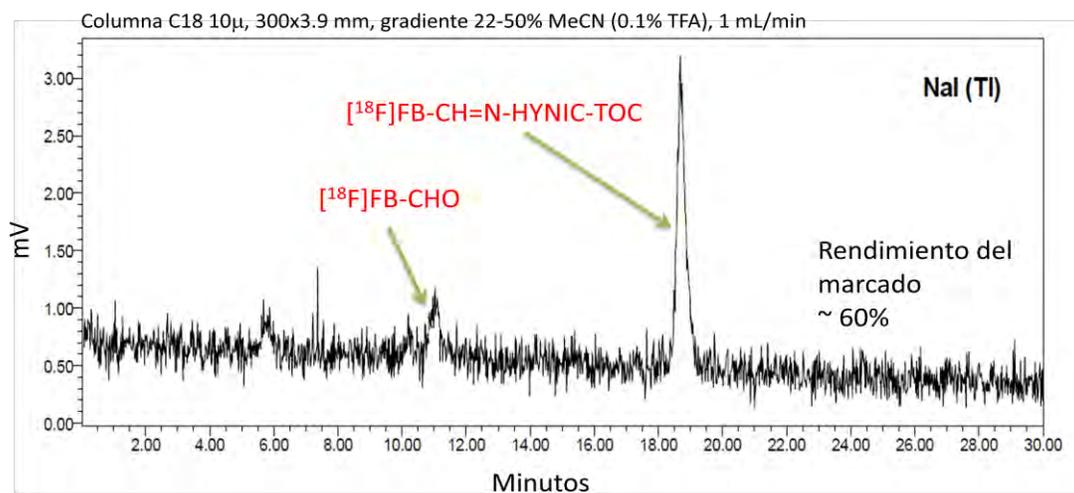


**Figura 5.8.** Cromatograma de purificación del RGD marcado con  $^{18}\text{F}$ .

La figura anterior nos muestra el cromatograma de purificación del RGD radiomarcado con  $^{18}\text{F}$ , se observa que tiene un  $t_R = 14.5$  minutos, obteniendo un rendimiento de marcado del 88%. Comparando este valor con el rendimientos reportados por Lee *et al.* en 2006 (95.2%) la diferencia porcentual obtenida es de 7.5%. La pureza radioquímica

reportada es del 99% tal como en nuestro caso, donde no hay impurezas radioquímicas formadas durante la síntesis del radiomarcado y sólo se observa el  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$  remanente que no reaccionó.

Otro proceso de radiomarcado que se evaluó fue el reportado por Bruus-Jensen *et al.* 2006; siguiendo este método se obtuvo un rendimiento del ~60%, y la pureza radioquímica fue >99% (Figura 5.9). En este proceso el radiofármaco fue obtenido incubado 100  $\mu\text{g}$  de  $[\text{Tyr}^3]\text{-Octreótido}$  (TOC) diluido en 100  $\mu\text{L}$  de 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con  $\text{pH}= 3.6$  como buffer, e incubado con 25  $\mu\text{L}$  de  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$  en un baño seco a  $70^\circ\text{C}$  por 15 min. La purificación fue por HPLC empleando un gradiente de  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  con 0.1% de ácido trifluoracético (TFA), corriendo de 20-50%  $\text{MeCN}$  (0.1% TFA) en 20 min. La columna que se utilizó es de tipo analítica y con un flujo de 1 mL/min, el  $t_{\text{R}}=18.2$  min. No se observaron impurezas radioquímicas generadas a excepción del  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$  que no reaccionó.



**Figura 5.9.** Cromatograma de purificación del  $[\text{Tyr}^3]\text{-Octreótido}$  marcado con  $^{18}\text{F}$ .

En la figura anterior se observa el pico que corresponde al  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOC}$ , el rendimiento obtenido (~60%) es menor al reportado por Bruus-Jensen *et al.* 2006, quienes reportan diferentes rendimientos para un rango de temperatura, obteniendo el valor máximo de radiomarcado a  $70^\circ\text{C}$  (85%) y un  $t_{\text{R}} = 16$  min. La principal desventaja de este método es la purificación, ya que en la cromatografía para el radiopéptido se usa una fase móvil ácida a base de acetonitrilo (0.1% TFA), lo que implica un segundo método de purificación del producto debido a que la fase no es inyectable, por lo tanto cabe la posibilidad de perder un poco más del producto en una segunda purificación.

## 5.4 Imágenes moleculares *in vivo*

Se formaron dos subgrupos de ratones ( $n=4$ ) con los ocho ratones atímicos. El radiopéptido con el que se trabajó fue el  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-RGD}$ , las unidades aplicadas a cada ratón fueron de 7.4 MBq (200  $\mu\text{Ci}$ ), actividad contenida en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  para cada roedor. Las imágenes que se adquirieron por el microPET fueron imágenes dinámicas y estáticas. Los ratones fueron clasificados como ratones bloqueados (B) y ratones no bloqueados (NB), puesto que se utilizó el método de bloqueo de receptores, véase Figura 5.10.



**Figura 5.10.** Ratón atímico con tumor inducido en el hombro derecho.

En Figura 5.11 se muestra un esquema de los dos grupos de ratones atímicos ( $n=4$ ) y la manera con la que se trabajó. En cada grupo se bloquearon dos ratones con 100  $\mu\text{g}$  de c(RGDfK), el tiempo de biodistribución fue por 60 y 90 min para el grupo uno, y para el grupo dos 60 y 120 min. Después se les aplicó el  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-RGD}$ ; la biodistribución del radiopéptido fue por una y dos horas. Posteriormente, los ratones fueron colocados en la cámara del microPET en forma individual en algunos casos y generalmente en grupos de dos animales, colocando un ratón bloqueado y un ratón no bloqueado. Las imágenes fueron adquiridas por 90 min (60 min para una imagen dinámica y 30 min para una estática).

Los ratones del grupo dos, después de la adquisición de imágenes los cuatro roedores atímicos fueron eutanizados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg por kg de peso) y posteriormente se les hizo disección de órganos y tejidos de interés.

En ambos grupos, a los ratones que no fueron bloqueados se les aplicó una inyección con solución salina al 0.9% como efecto placebo y permanecieron el mismo tiempo que los ratones bloqueados antes de la aplicación del RGD radiomarcado.

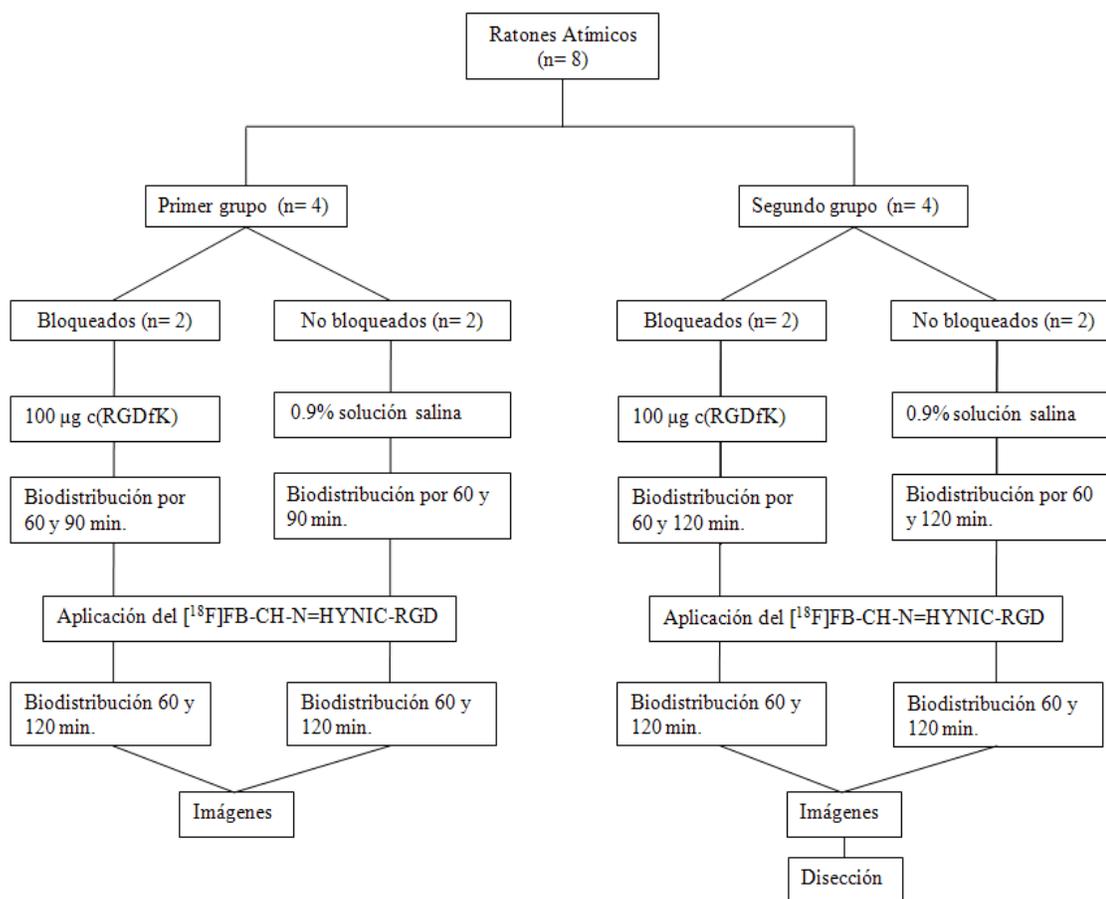
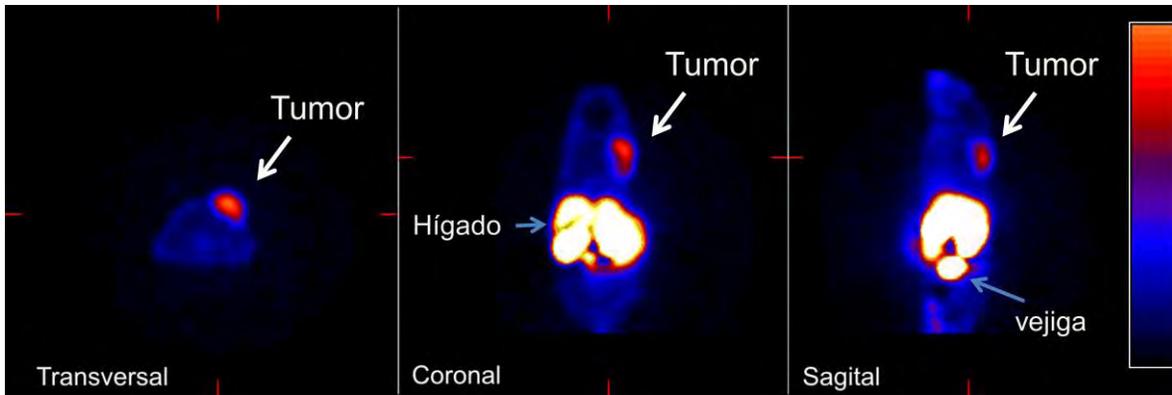


Figura 5.11. Aplicación del  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-RGD}$  a los grupos de ratones atómicos.

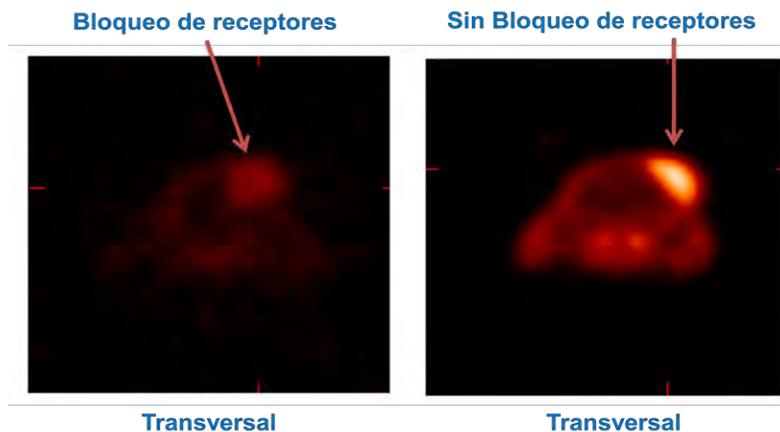
## 5.5 Especificidad *in vivo* del $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-RGD}$

La imágenes adquiridas fueron reconstruidas usando el algoritmo OSEM 3D, se manejó una ventana de energía de 350-650 keV y una ventana temporal de 6 ns. Las primeras imágenes que se adquirieron fueron imágenes de ratones individuales; en ellas se visualizó la biodistribución del radiofármaco (Figura 5.12), también se obtuvieron imágenes colocando dos ratones por adquisición.



**Figura 5.12.** Captación de  $[^{18}\text{F}]\text{FB}=\text{N-HYNIC-RGD}$  en ratones atímicos con tumor inducido de glioma (C6), imagen adquirida 60 min después de la inyección del radiofármaco. No presenta captación en tejido encefálico sano a diferencia del  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ .

La especificidad *in vivo* del  $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH}=\text{N-HYNIC-RGD}$  fue comprobada haciendo uso del método de bloqueo de receptores descrito en el capítulo anterior. La verificación de este parámetro fue a través de la captación del radiofármaco en las imágenes tomadas por microPET, es decir se comparó la actividad captada en el tumor de los ratones bloqueados y no bloqueados para un mismo corte, midiendo la concentración de actividad por medio de regiones de interés (ROIs). Los resultados mostraron cinco veces más concentración del radiopéptido en tumor del ratón no bloqueado comparado contra la que presentaron los tumores con los receptores bloqueados (Figura 5.13). Esto es una forma de demostrar que la captación del radiofármaco *in vivo* es por un mecanismo específico (dirigido a un blanco molecular específico) ya que si el radiofármaco se captara por un simple mecanismo fisiológico o inespecífico (por ejemplo fagocitosis o aumento de permeabilidad vascular por inflamación) aun bloqueando los receptores o el blanco molecular la captación sería la misma o al menos no habría diferencia significativa antes y después de bloquear los receptores.



**Figura 5.13.** Cortes axiales. A la izquierda se tiene el ratón con receptores bloqueados y a la derecha el ratón con receptores no bloqueados (se observa 5 veces más captación que en el no bloqueado).

Un resultado interesante se muestra también en la Figura 5.12, donde se observa que el cerebro no presenta actividad (captación del radiofármaco), lo que implica que el radiopéptido no atraviesa la barrera hematoencefálica como lo hace el [ $^{18}\text{F}$ ]FDG. Sin embargo, también se observa acumulación de actividad debida al radiofármaco en órganos como los riñones y la vejiga, lo cual se debe a la forma de eliminación del radiopéptido y a la metabolización del radiofármaco en el hígado tal como lo reportan en la literatura diferentes autores. (Zhang *et al.* 2005, Chen *et al.* 2004, Haubner *et al.* 2005, Decristoforo *et al.* 2006.)

EL no observar captación del [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RGD en el tejido encefálico sano, permite considerar que este radiofármaco sea un candidato potencial para la visualización no invasiva de neoplasias cerebrales, y en general para neoplasias que sobre-expresan la integrinas  $\alpha_v\beta_3$  durante el proceso de angiogénesis y metástasis. Al comparar el radiopéptido con el [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, este último no es un buen indicador para evaluar tumores en el cerebro, en regiones cercanas al corazón o a la vejiga, por lo tanto este radiopéptido puede ser un buen candidato para evaluar tumores del SNC como los gliomas, que generalmente empiezan el proceso de vascularización cuando alcanza un tamaño de 1-2 mm (Liu 2009) expresando las integrinas ( $\alpha_v\beta_3$ ) y por consiguiente pueden romper la barrera hamatoencefálica permitiendo así el acceso de diferentes compuestos (en ese caso del RGD radiomarcado). En contraste el [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RGD no es candidato, ni recomendable para visualizar neoplasias en regiones aledañas a la vejiga, ya que hemos visto que la eliminación de éste es a través de la orina.

La Figura 5.13 muestra la especificidad del radiofármaco [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RGD como ligando para las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , receptores presentes en la vascularización tumoral y metástasis. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros autores que radiomarcaron monómeros y dímeros del RDG comprobando su especificidad a través de esta misma técnica (método de bloqueo de receptores) como por ejemplo: Zhang Xianzhong *et al.* 2006a. ([ $^{18}\text{F}$ ]FRGD2), Decristoforo *et al.* 2006 marcaron el RGD con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  usando HYNIC como quelante bifuncional, y Haubner *et al.* 2005 marcaron el RDG con  $^{18}\text{F}$  unido con galactosa.

## 5.6 Biodistribución del radiopéptido.

Después de la adquisición de las imágenes para el segundo grupo, los ratones atímicos fueron eutanizados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico y se realizó la disección de diferentes órganos y tejidos para determinar la actividad captada en ellos. El cálculo del porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido ( $\%IA/g * 100$ ) fue

realizado usando la ecuación 3.1, el error que aparece fue calculado usando propagación de errores (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2.** Valores del porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido ( $\% \frac{IA}{g} \times 100$ ), para el grupo dos de ratones atímicos.

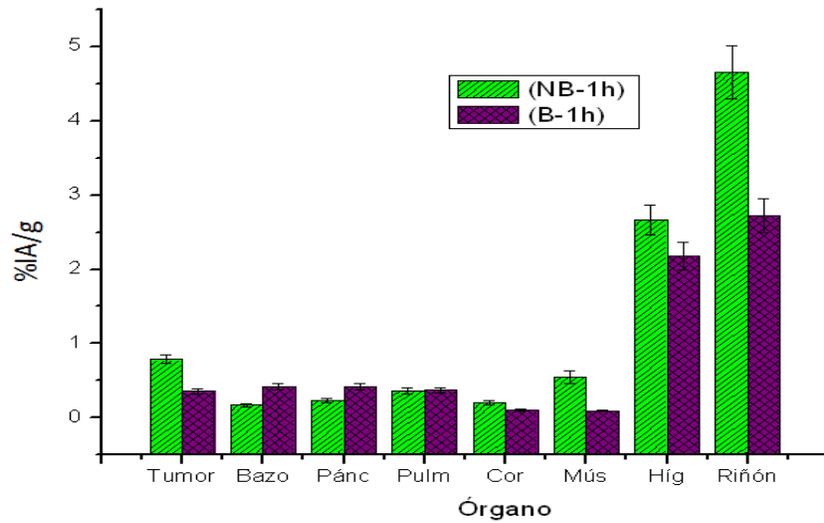
Órgano	B (1 h)	NB (1 h)	B (2 h)	NB (2 h)
Tumor	0.355 ± 0.031	0.785 ± 0.060	0.190 ± 0.016	0.460 ± 0.029
Hígado	0.421 ± 0.043	0.173 ± 0.019	0.049 ± 0.008	0.077 ± 0.009
Bazo	0.418 ± 0.041	0.235 ± 0.025	0.039 ± 0.007	0.081 ± 0.009
Páncreas	0.371 ± 0.039	0.366 ± 0.044	0.132 ± 0.023	0.193 ± 0.024
Pulmón	0.105 ± 0.013	0.202 ± 0.024	0.042 ± 0.007	0.052 ± 0.007
Corazón	0.096 ± 0.012	0.548 ± 0.082	0.022 ± 0.004	0.105 ± 0.012
Músculo	0.069 ± 0.012	0.193 ± 0.033	0.071 ± 0.016	0.201 ± 0.038
Riñón	2.719 ± 0.232	4.652 ± 0.355	2.276 ± 0.134	0.719 ± 0.053

Se realizó adicionalmente los cocientes tumor/tejido, los cuales se muestran en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Valores del cociente Tumor/ tejido.

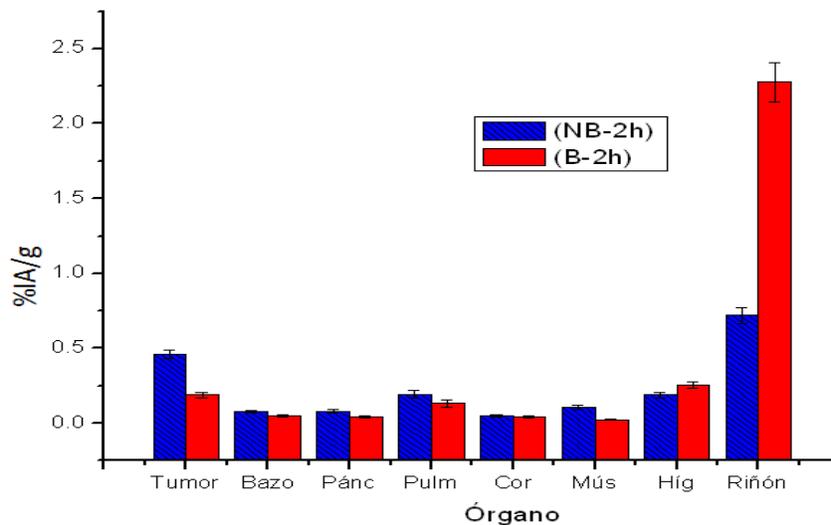
Cociente	B (1 h)	NB (1 h)	B (2 h)	NB (2 h)
Tumor/Hígado	0.843 ± 0.190	4.537 ± 0.186	3.877 ± 0.247	5.974 ± 0.001
Tumor/Bazo	0.849 ± 0.185	3.340 ± 0.183	4.870 ± 0.260	5.680 ± 0.174
Tumor/Páncreas	0.956 ± 0.192	2.144 ± 0.197	1.440 ± 0.259	2.383 ± 0.187
Tumor/Pulmón	3.380 ± 0.210	3.886 ± 0.195	4.523 ± 0.250	8.846 ± 0.197
Tumor/Corazón	3.698 ± 0.212	1.432 ± 0.2.27	8.636 ± 0.2.67	4.380 ± 0.177
Tumor/Músculo	5.145 ± 0.261	4.068 ± 0.250	2.676 ± 0.310	2.289 ± 0.250
Tumor/Riñón	0.130 ± 0.172	0.168 ± 0.152	0.083 ± 0.143	0.639 ± 0.137

Durante la adquisición de imágenes se colocaron simultáneamente un ratón bloqueado y uno no bloqueado, en ambos el radiopéptido tuvo una biodistribución por una hora antes de adquirir el estudio, véase Gráfica 5.2. En este gráfico se observa que el tumor cuyos receptores fueron bloqueados presenta ~45% menor captación del radiofármaco que el tumor que no fue bloqueado, en términos de porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido. También se observa que el radiopéptido al no unirse a sus receptores específicos tiende a acumularse en órganos como el hígado y el riñón.



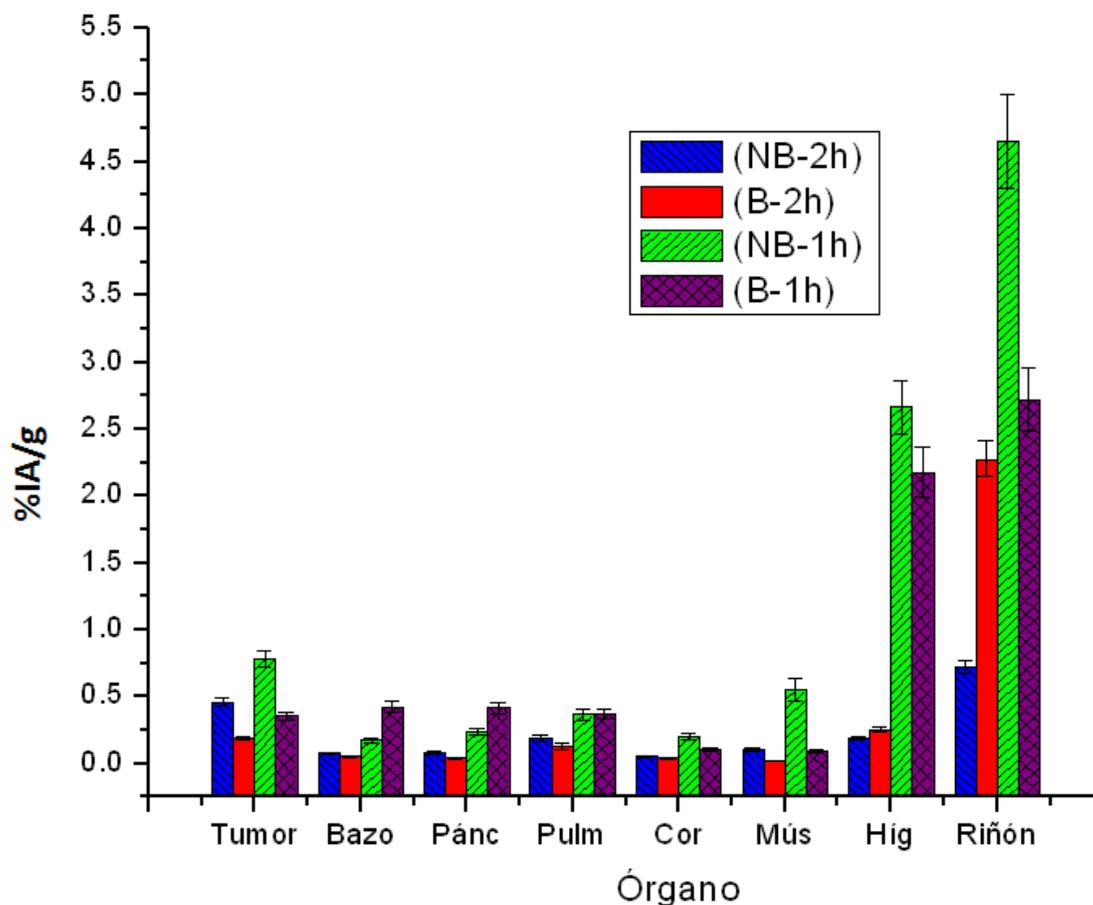
**Gráfica 5.2.** Captación del radiofármaco en diferentes tejidos para una biodistribución de una hora (1h). NB= ratones no bloqueados, B= ratones bloqueados, Pánc= páncreas, Pulm= pulmón, Cor= corazón, Mús= músculo e Híg= Hígado.

De manera similar se realizó un estudio también con un ratón atómico bloqueado (B) y uno no bloqueado (NB), pero en este caso la biodistribución del radiopéptido fue por dos horas antes de adquirir la imagen, véase Gráfica 5.3. También en términos de porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido, la captación del radiofármaco por el tumor no bloqueado sigue siendo ~42% mayor comparado con el que posee los receptores ocupados por el c(RGDfK).



**Gráfica 5.3.** Captación del radiofármaco en diferentes tejidos para una biodistribución de dos hora (2h). NB= ratones no bloqueados, B= ratones bloqueados, Pánc= páncreas, Pulm= pulmón, Cor= corazón, Mús= músculo e Híg= Hígado.

Un visión más general es observada en la Gráfica 5.4, en la cual se nota que el tumor presenta afinidad por el RGD que actúa como ligando para las integrinas tipo  $\alpha_v\beta_3$ ; en comparación a cuando la neoplasia tiene saturados los receptores. La forma de eliminación del radiopéptido se ve reflejada en la actividad presente en los riñones, mientras la alta captación del hígado indica la metabolización del radiopéptido por este órgano.



**Gráfica 5.4.** Comparación de la captación de los diferentes órganos. NB= ratones no bloqueados, B= ratones bloqueados, Pánc= páncreas, Pulm= pulmón, Cor= corazón, Mús= músculo e Híg= Hígado.

## Referencias

Bruus-Jensen K, Poetheko Thorsten, Schottelius Margret, Hauser Andrea, Schwaiger Marku, Hans-Jürgen; *Chemoselective hydrazone formation between HYNIC-functionalized peptides and  $^{18}\text{F}$ -fluorinated aldehydes*. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33:173-183.

Chen Xiaoyuan, Park Ryan, Shahinian Antony H, Tohme Michel, Khankaldyyan Vazgen, Bozorgzadeh Mohammed H, Bading James R, Moats Rex, Laug Walter E, Conti Peter S.  *$^{18}\text{F}$ -labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis*. Nuclear Medicine and Biology. 2004; 31:179-189.

Decristoforo Clemens, Faintuch-Linkowski B, Rey Ana, Guggenberg Elisabeth von, Rupprich Marco, Hernandez-Gonzalez I, Rodrigo Teodoro, Haubner Roland. [ *$^{99\text{m}}\text{Tc}$* ]HYNIC-RGD for imaging  $\alpha\text{v}\beta_3$  expression. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33: 945-952.

Haubner Roland, Weber Wolfgang A, Beer Ambros J, Vabuliene Eugenija, Reim Daniel, Sarbia Mario, Becker Karl-Friedrich, Goebel Michael, Hein Rüdiger, Wester Hans-Jürgen, Kessler Horst, Schwaiger Markus. *Noninvasive Visualization of the Activated  $\alpha\text{v}\beta_3$  Integrin in Cancer patients by Positron Emission Tomography and [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD*. Plos Medicine. March 2005, 2: Issue 3.

Lee Yun Sang, Jeong Jae Min, Kim Hyung Woo, Chang Young Soo, Kim Young Joo, Hong Mee Kyung, Rai Ganesha B, Chi Dae Yoon, Kang Won Jun, Kang Joo Hyun, Lee Dong Soo, Chung June-Key, Lee Myung Chul, Suh Young-Ger. *An improved method of  $^{18}\text{F}$  peptide labeling: hydrazone formation with HYNIC- conjugated c(RGDyK)*. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33:667-683.

Liu Shuang. *Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin  $\alpha\text{v}\beta_3$  -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency*. Reviews. Bioconjugate Chemistry. December 2009; 20(12):2199-2213.

Zhang Xianzhong, Cai Weibo, Cao Feng, Schreibmann Eduard, Wu Yun, Wu Joseph C, Xing Lei, and Chen Xiaoyuan.  *$^{18}\text{F}$ -Labeled Bombesin Analogs for Targeting GRP Receptor-Expressing Prostate Cancer*. The Journal of nuclear medicine. March 2006; 47: No. 3.

## Capítulo 6. Conclusiones

Se radiomarcó el [Tyr<sup>3</sup>]-Octrétido y el c(RGDyK) conjugados previamente con el HYNIC como agente quelante, con el emisor de positrones <sup>18</sup>F en forma química de fluorobenzaldehído ([<sup>18</sup>F]FB-CHO). Con el método de marcado que se utilizó se obtuvieron rendimientos que oscilan entre el 60-88% para el péptido incubado junto al fluorobenzaldehído, y un rendimiento total de radiomarcado de 18-26%, partiendo de la actividad total del <sup>18</sup>F con la que se inició. El método de marcaje ofrece la posibilidad de extenderse al radiomarcado de otros diferentes péptidos como la bombesina (BN) y la ubiucidina (UBI) por mencionar algunos.

Ambos péptidos se obtuvieron en formulación farmacéutica con una pureza radioquímica >95%. Se realizaron estudios preclínicos con el radiopéptido [<sup>18</sup>F]FB-CH=N-HYNIC-RGD en ratones atómicos con tumores inducidos de la línea celular C6, correspondiente a un modelo tumoral murino de glioblastoma. Las imágenes por microPET mostraron la visualización de la neoplasia y se verificó la especificidad *in vivo* del radiopéptido para las integrinas tipo  $\alpha_v\beta_3$  sobre-expresadas en el proceso de vascularización tumoral (angiogénesis) y metástasis (invasión a tejidos). Este proceso se verificó comparando las imágenes de dos ratones de los cuales uno fue bloqueado con c(RGDfK), antes de la aplicación del radiofármaco y comparándolo con el no bloqueado (método de bloqueo de receptores). Se observó cinco veces más captación en el ratón no bloqueado comparado con el ratón cuyos receptores fueron bloqueados.

Además del análisis de las imágenes, se calculó el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido, mediante la disección de órganos y tejidos, corroborando que el radiofármaco presenta captación en el tejido tumoral. Sin embargo, también se observa captación de radiofármaco en órganos como el hígado (metabolización), riñones y vejiga (eliminación). En contraste en órganos como el corazón, pulmón, etc. la captación fue pobre comparada con los órganos mencionados previamente.

Los resultados obtenidos en este estudio piloto con [<sup>18</sup>F]FB-CH=N-HYNIC-RGD sugieren que éste podría ser un buen candidato para evaluar angiogénesis en tumores del sistema nervioso y en aquellos que sobre-expresen integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , receptores presentes en la neovascularización.

## Trabajo a futuro

- 1.- Estudiar la farmacocinética del [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RGD, ver la depuración en sangre y realizar estudios de metabolitos en diferentes tejidos como el hígado, corazón y tejido tumoral entre otros. Posteriormente, comparar el producto con el [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD.
- 2.- Realizar estudios preclínicos adicionales del radiopéptido [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RGD en ratones atómicos para aumentar el tamaño de la muestra.
- 3.- Realizar pruebas de seguridad de acuerdo a la Norma MGA 0795 de la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, con la finalidad de evaluar posibles efectos secundarios durante un periodo de 24 horas, después de la administración a ratones sanos (de 25 g de peso) de 100  $\mu\text{g}$  de RGD (4000 mg/kg de peso)
- 4.- Realizar pruebas clínicas con el radiofármaco [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CH=N-HYNIC-RGD en voluntarios sanos.

## Referencias

Arteaga de Murphy C, Ferro Flores G. *Compuestos de Tecnecio*. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. 1ª Edición, impreso en México. Mayo de 2003.

Arteaga de Murphy C, Ferro Flores G. *Bombesina y Bombesinas Radiomarcadas*. Alasbinm Journal. Octubre 2005; 8(30).

Àvila-Rodríguez M. A, Zàrate-Morales A., Flores-Moreno A. *Cyclotron Production of Medical Radioisotopes*. American Institute of Physic, AIP C.P. 2010; 1265: 371-378.

BCIT. “British Columbia Institute of Technology” Health Sciences. Nuclear Medicine, Julio 2000.

Bruus-Jensen K, Poetheko Thorsten, Schottelius Margret, Hauser Andrea, Schwaiger Marku, Hans-Jqrgen; *Chemoselective hydrazone formation between HYNIC-functionalizad peptides and 18F-fluorinated aldehydes*. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33:173-183.

Chen Xiaoyuan, Park Ryan, Shahinian Antony H, Tohme Michel, Khankaldyyan Vazgen, Bozorgzadeh Mohammed H, Bading James R, Moats Rex, Laug Walter E, Conti Peter S. *<sup>18</sup>F-labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis*. Nuclear Medicine and Biology. 2004; 31:179-189.

Decristoforo C, Melendez-Alafort L, Sosabowski J.K, Mather S. Nuclear Medicine. 2000; 41: 1114- 1119.

Decristoforo Clemens, Faintuch-Linkowski B, Rey Ana, Guggenberg Elisabeth von, Rupprich Marco, Hernandez-Gonzalez I. Rodrigo Teodoro, Haubner Roland. [*Tc-99m*]HYNIC-RGD for imaging avh3 expression. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33: 945-952.

De Jong M, Breeman W. A, Bakker W.H et al. *Comparison of <sup>111</sup>In-labelled somatostatina analogous for tumor scintigraphy and radionuclide therapy*. Cancer Res. 1998; 58:437-441.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 9 Edición, Vol. 1. Secretaria de Salud. México 2008.

Ferro-Flores G, Arteaga de Murphy C, Rodríguez-Córtex J, Pedraza-López M, Ramírez-Iglesias M.T. *J. Nucl. Med. Commun.* 2006; 27:371-376.

Froidevaux S, Eberle A.N, Christe m., Sumanovski L, Heppeler A, Schmitt J.S, Eisenwiener K, Beglinger C, Macke H.R. *Int. J. Cancer.* 2002; 98:930-937.

Ganong William F. *Fisiología Médica.* El Manual Moderno S. A de C.V, 13<sup>a</sup> edición, Mex. 1992.

Gómez- Ullate R. Rafael, Serrano Álvarez Alonso. *Cromatografía Principios y Aplicaciones.* (<http://www.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>).

Saha Gopal B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy.* Fifth Edition, Springer. 2004.

Hanahan Douglas and Weinberg Robert A. *The Hallmarks of Cancer.* *Cell.* January 7, 2000. 100: 57-70.

Hart Harold, Craine Leslie E, Hart David J, *Química Orgánica.* Novena Edición, McGraw Hill. 1995.

Haubner Roland, Decristoforo Clemens. *Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting.* *Frontiers in Biosciences.* January 1, 2009; 14:872-886.

Haubner Roland, Weber Wolfgang A, Beer Ambros J, Vabulienė Eugenija, Reim Daniel, Sarbia Mario, Becker Karl-Friedrich, Goebel Michael, Hein Rüdiger, Wester Hans-Jürgen, Kessler Horst, Schwaiger Markus. *Noninvasive Visualization of the Activated  $\alpha_1\beta_3$  Integrin in Cancer patients by Positron Emission Tomography and [<sup>18</sup>F]Galacto-RGD.* *Plos Medicine*, March 2005, 2:Issue 3.

IAEA, Technical Report Series No. 465, *Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice*, International Atomic Energy, Vienna, 2008.

([http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs465\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs465_web.pdf))

[IAEA, Technical Report Series No. 468, *Cyclotron Produced Radionuclides: Physical Characteristics and Production Methods*, International Atomic Energy, Vienna, 2009.

([http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs468\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs468_web.pdf))

Krenning E.P, Kwekkeboom D.J, Bakker W.H, Breeman W.A, Kooij P.P, Oei H.Y, Van Hagen M, Postema P.T, de Jong M, Reubi J.C et al. *Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe1] and [<sup>123</sup>I-Tyr3]-Octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients.* *Eur. J.Nucl.Med.* 1993; 20:716-731.

Lee Yun Sang, Jeong Jae Min, Kim Hyung Woo, Chang Young Soo, Kim Young Joo, Hong Mee Kyung, Rai Ganesha B, Chi Dae Yoon, Kang Won Jun, Kang Joo Hyun, Lee Dong Soo, Chung June-Key, Lee Myung Chul, Suh Young-Ger. *An improved method of  $^{18}\text{F}$  peptide labeling: hydrazone formation with HYNIC- conjugated c(RGDyK)*. Nuclear Medicine and Biology. 2006; 33:667-683.

Lehninger Albert L., Nelson David L, Cox Michael M. *Principios de Bioquímica*. Segunda Edición, Omega S. A. Barcelona España. 1995.

Lin JT, Coy DH, Mantey SA, Jensen RT. *Peptide structural requirements for antagonism differ between the two mammalian bombesin receptor subtypes*. J Pharmacol Exp Ther. 1995; 275:285-95.

Liu Shuang. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin  $\alpha_v\beta_3$  –Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency. Reviews. Bioconjugate Chemistry. December 2009; 20(12):2199-2213.

Meléndez Alafort Laura. *Radiomarcado de Péptidos para Diagnóstico y Terapia*. Fac. de Medicina, UAEM, Mex. 2002. (www.quimicanuclear.org)

Miranda Javier. *Técnicas Analíticas de Origen Nuclear: Un curso Introductorio*. Segunda Edición. Instituto de Física-UNAM, Mex. 2000.

Mitrasonovic Petar M. *Advances in  $\alpha(v)\beta(3)$  Integrin- Targeting Cancer Therapy and Imaging with Radiolabeled RGD peptides*. Current Radiopharmaceuticals. 2009; 2:214-219.

Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio* (sección 5.1 roedores).

Pradhan TK, Katsuno T, Taylor JE, Kim SH, Ryan RR, Mantey SA, et al. *Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes*. Eur J Pharmacol. 1998; 343(2-3):275-287.

Poethko Thorsten, Schottelius Margret PhD, Thumshirn Goergette, Hersel Ulrich PhD, Herz Michael, Henriksen Gjermund PhD, Kessler Horst PhD, Schwaiger Markus MD, and Wester Hans-Juergen PhD. *Two-Step Methodology for High-Yield Routine Radiohalogenation of Peptides:  $^{18}\text{F}$ -Labeled RGD and Octreotide Analogs*. The Journal of Nuclear Medicine, Mayo 2004; 45:892-902.

RDS 111 Operating Instruction. December 2000.

Secretaría de Energía, Minas e Industria Paraestatal. Reglamento General de Seguridad Radiológica. Diario Oficial de la Federación. México, 1988.

Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M. *Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14)*. Clin Cancer Res. April 2002; 8(4):1139-46.

Shottelius M, Wester H.J, Reubi J.C, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M. Bioconjug Chem. 2002; 13:1021-1030.

Schottelius Margret, Wester Hans-Jürgen. Review Article: *Molecular imaging targeting peptide receptors*. Methods. 2009; 48:161–177.

Schuhmacher J, Zhang H, Doll J, Macke HR, Matys R, Hauser H et al. *GRP receptor targeted PET of a rat pancreas carcinoma xenograft in nude mice with a <sup>68</sup>Ga-labeled bombesin (6-14) analog*. J Nucl Med. 2005; 46: 691-9.

Speranza A, Ortosecco G, Castaldi E, Nardelli A, Pace L, & Salvatore M. *Fully automated synthesis procedure of 4-[18F]fluorobenzaldehyde by comercial synthesizer: Amino-oxi peptide labelling prosthetic group*. Appl. Radiat. Isot. 2009; 67:1664-1669.

Stangelberger A, Schally AV, Varga JL, Zarandi M, Szepeshazi K, Armatis P, et al. *Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone hormone-releasing hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice*. Clin Cancer Res. 2005; 11:49-57.

Tortora Gerard J., Reynolds Grabowski Sandra. *Principios de Anatomía Y Fisiología*. 9ª edición, Oxford University Press. Agosto de 2006.

Varvarigou A, Bouziotis P, Zikos Ch, Scopinaro F, De Vincentis G. *Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging*. Cancer Biother Radiopharm. 2004; 19:219-29.

Welch Michael J. Handbook of Radiopharmaceuticals. Ed. Wiley. 2003.

Zhang Xianzhong, Cai Weibo, Cao Feng; Schreibmann Eduard, Wu Yun, Wu Joseph C, Xing Lei, and Chen Xiaoyuan. *<sup>18</sup>F-Labeled Bombesin Analogs for Targeting GRP Receptor-Expressing Prostate Cancer*. The Journal of nuclear medicine. March 2006; 47: No. 3.

Zhang Xianzhong, Xiong Zhengming, Wu Yun, Cai Weibo, Tseng Jeffery R, Gambhir Sanjiv S. and Chen Xiaoyuan. *Quantitative PET Imaging of Tumor Integrin  $\alpha_v\beta_3$  Expression with  $^{18}F$ -FRGD2. The Journal of Nuclear Medicine.* January 2006; 47: No 1.

[1] <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/tumores-cerebrales>  
(Mayo de 2010)

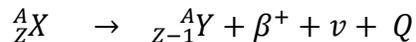
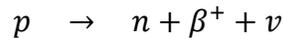
[2] [http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/adult\\_neuro\\_sp/brain.cfm](http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/adult_neuro_sp/brain.cfm)  
(Mayo de 2010)

## Apéndice A.

### A.1. Decaimiento $\beta^+$ y aniquilación del positrón

El decaimiento por positrones ( $\beta^+$ ) es una de las forma en la que ciertos radionúclidos llegan a un estado más estable (un estado mínimo de energía al que poseía anteriormente). Es un proceso debido a la interacción débil. Este tipo de decaimiento se favorece en núcleos ricos en protones, pero con número atómico bajo ( $Z \downarrow$ ), ya que conforme  $Z$  aumenta ( $Z \uparrow$ ) se favorece la captura electrónica, otra forma de decaimiento que compite con  $\beta^+$  y por consiguiente se llega al mismo elemento hija.

El decaimiento  $\beta^+$  se caracteriza por la transformación de un protón a un neutrón, conservándose la masa, es decir un radionúclido se transforma a otro elemento bajando en la línea de estabilidad ( $Z$  vs  $N$ ), es decir:



Dónde:

- ${}^A_Z X$ : Es un radionúclidos padre (inestable energéticamente y con  $Z \downarrow$ )
- ${}^A_{Z-1} Y$ : Es el átomo hija (puede ser estable o inestable)
- $\beta^+$ : Es el positrón o “partícula beta más” conserva la carga eléctrica.
- $\nu$ : Es un neutrino, partícula con masa despreciable generalmente, necesaria para la conservación de la masa.

El valor  $Q$  de la reacción, se reparte como energía cinética entre el positrón y el neutrino.

El positrón al ser una antipartícula con carga eléctrica positiva, interacciona electrostáticamente con los electrones en el medio hasta perder su energía formando el positronio, estado formado entre un electrón y un positrón antes de aniquilarse. En el proceso de aniquilación se generan dos fotones, cuya energía es 511 keV para cada uno, los fotones viajan en sentido opuesto y siguen una trayectoria paralela ( $180^\circ$  uno respecto del otro). En algunos otros casos el positrón se aniquila cuando aún posee energía cinética, a este hecho se le conoce como “aniquilación en vuelo”, dando como consecuencia dos fotones que viajan a ángulos ligeramente diferentes de  $180^\circ$  uno respecto al otro ( $180^\circ \pm 0.3$ ). La energía  $Q$  se reparte entre las dos partículas emitidas durante la reacción nuclear, dando como resultados espectros continuo para el positrón y para los neutrinos, en ambos casos la energía máxima es  $Q$  y la energía promedio se encuentra entre  $1/3$  y  $1/2$  del espectro. Cabe mencionar que el espectro del positrón está ligeramente desplazado del origen lo que se debe a la repulsión electrostática con el núcleo atómico.

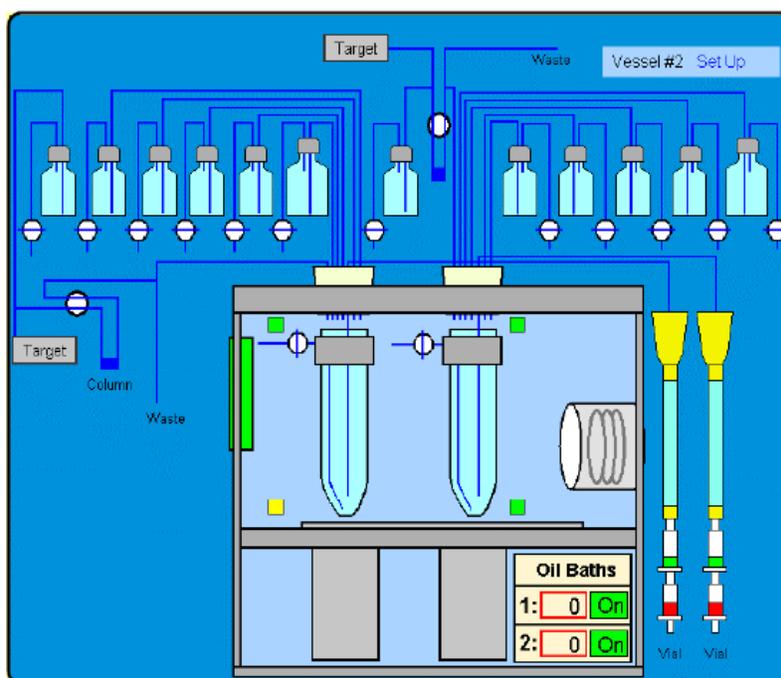
## Apéndice B.

### B.1 Manejo del módulo CPCU

Los pasos que se sigue en el manejo del módulo CPCU para llevar a cabo la radiosíntesis del [ $^{18}\text{F}$ ]FB-CHO son semiautomáticos, se controla el proceso desde una computadora (véase Figura B.1) y vigilando cada subproceso por medio de un sistema de videocámaras. Los pasos y parámetros son los siguientes:

- 1) Encender los baños de aceite (el primero a  $110^{\circ}\text{C}$  y el segundo a  $60^{\circ}\text{C}$ ) y verificar el flujo de He.
- 2) Preparar el módulo colocando los vasos de reacción, los stopper (tapones para presurizar), líneas y colocar los reactivos.
- 3) Correr el tiempo muerto del módulo CPCU (120 s), después iniciar la producción “Start Batch Production” y abrir el vial uno del primer baño.  
(El K-222/ $\text{K}_2\text{CO}_3$  eluye el  $^{18}\text{F}$  del QMA)
- 4) Elegir el modo manual del CPCU.
- 5) Seleccionar vial uno y seleccionar en blanco “target”. (El K-222/ $\text{K}_2\text{CO}_3$  llega al vaso de reacción junto con el  $^{18}\text{F}$ )
- 6) Verificar que la actividad disminuya en la celda caliente (ver el activimetro, tipo Capintec, INC modelo CRC- Ultra) y monitorear que el  $^{18}\text{F}$  caiga al vaso de reacción.
- 7) Cerrar el vial uno y cerrar el blanco “target” (el proceso inicia automáticamente)
- 8) Medir la actividad residual del QMA.
- 9) Se inicia la primera evaporación (automático).
- 10) Se añade el  $\text{CH}_3\text{CN}$  e inicia la segunda evaporación. (Evaporación Azeotrópica, el vaso de reacción sale completamente seco del primer baño de aceite)
- 11) Detener el proceso automático “Stop Batch production” durante el enfriamiento del vaso y elegir el modo manual.
- 12) Esperar que el vaso de reacción se enfríe aproximadamente 80 s.
- 13) Añadir el precursor y se burbujear por 100s para que el precursor adquiera actividad.
- 14) Transferir al segundo vaso de reacción. (Subir el elevador, mantener el burbujeo y añadir presión al primer vaso de reacción abriendo los viales sin reactivos).
- 15) Verificar que el precursor se encuentre en el segundo vaso y cerrar los viales que hicieron presión.
- 16) Ir a la página CPCU parámetros y seleccionar la opción “Lower VES 2” donde el parámetro es 12 s (tiempo que tarda en bajar el vaso al baño de aceite con temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ ) e iniciar el conteo por 10 min en el cual se lleva a cabo la reacción por sustitución nucleofílica.
- 17) Regresar a la página del CPCU “go to CPCU”

- 18) Burbujear con He cada 2 min por 3 s, durante los 10 min que tarda la reacción.
- 19) Inicializar el vaso de reacción dos, después de transcurridos los 10 min. (Opción modo manual)
- 20) Diluir el producto con H<sub>2</sub>O abriendo el vial 4 y burbujear. (Página del CPCU)
- 21) Transferir el producto diluido a la celda caliente abriendo viales sin reactivos.
- 22) Agregar 1/3 del H<sub>2</sub>O contenida en el vial 5 y repetir el proceso de transferencia hacia la celda caliente.
- 23) Repetir el paso 22 con los 2/3 de H<sub>2</sub>O restante del vial 5.
- 24) Apagar el CPCU “turn off”
- 25) Medir la actividad del producto (fluorobenzaldehido) atrapado en un cartucho C18 y medir la actividad del vial que contiene el desperdicio del producto.
- 26)



**Figura B1.** Módulo CPCU semiautomático permite controlar la radiosíntesis (Adaptada del manual de operaciones del RDS 111).

## Glosario

*Alícuota.* Fracción

*Covalente.* Tipo de enlace químico que se caracteriza por compartir electrones entre elementos, generalmente se da en elementos gaseosos no metálicos.

*Creta.* Punto máximo de la onda de radiofrecuencia con respecto a la posición de equilibrio.

*Destilación azeotrópica.* Destilación para una mezcla con dos sustancias con puntos de fusión diferentes, una sustancia posee un punto de fusión menor y la otra posee uno mayor. La mezcla de estas sustancias se comporta como un nuevo compuesto con punto de fusión menor lo que permite destilarlo a menor temperatura.

*Electrones Auger.* Forma alternativa a los rayos X característicos, por la que un átomo se desprende de energía, el espectro es discreto y las vacancias que generan a los electrones Auger se llenan con electrones de capas externas.

*Isótopo:* Átomo con el mismo número atómico, pero diferente número de neutrones.

*Liofilizar.* Método para deshidratar sustancias o compuestos orgánicos para preservarlos.

*Positrón.* Antipartícula del electrón, posee igual masa pero carga eléctrica opuesta.

*Radionúclido:* Núcleo atómico que decae emitiendo radiación.

*Recristalización:* Método químico empleado para la separación y purificación de una sustancia.

*Semipreparativa.* Columna con mayor cantidad de una resina, generalmente poseen un diámetro mayor a otras columnas lo que implica una mayor capacidad en el volumen de la muestra.

*Solución amortiguadora o Buffer.* Solución que amortigua la concentración de iones de Hidrógeno, es decir impide que una sustancia cambie de pH.

*Unidosis.* Actividad inyectada de un radiofármaco. (Dosis en este contexto no tiene que ver con la dosis depositada por la actividad que se inyecta)

*Valle.* Punto mínimo de la onda de radiofrecuencia con respecto a la posición de equilibrio.