



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS**

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ESTUDIOS PRECLÍNICOS CON RADIOFÁRMACOS  
PARA DETERMINAR ACUMULACIÓN DE PLACA  $\beta$ -AMILOIDE COMO  
AUXILIARES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER  
MEDIANTE IMAGEN MICROPET**

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

PRESENTA:  
**SANTIAGO BURGOS PUENTES**

TUTOR PRINCIPAL  
DR. MIGUEL ÁNGEL ÁVILA RODRÍGUEZ  
INSTITUTO DE FÍSICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. MARÍA ELENA MARTÍNEZ PÉREZ  
INSTITUTO DE FÍSICA

DR. ARTURO AVENDAÑO ESTRADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE DEL 2023



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

que presenté para obtener el grado de \_\_\_\_\_ es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

**(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)**

A mis padres,  
Adriana y Arnoby

## Agradecimientos institucionales

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias (Física), por acogerme y brindarme las herramientas para realizar mi maestría.
- Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada para el apoyo de mis estudios de Posgrado.
- A la Coordinación General de Estudios de Posgrado (CGEP) de la UNAM, por la beca otorgada para la conclusión de mi maestría.
- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la DGAPA-UNAM, por la beca PAPIIT para la obtención de mi grado.
- A los proyectos de investigación que han financiado parcialmente este trabajo, la Secretaría de Educación, Ciencia Tecnología e Innovación de la Ciudad de México proyecto SECTEI/226/2021, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM proyecto PAPIIT IT201623, al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología proyecto PRONACES 322512.
- A la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón, incluido el Laboratorio de Investigación Preclínica microPET y todo su personal, por suministrar los radiofármacos y los equipos técnicos necesarios para la ejecución de mi proyecto.
- Al Departamento de Bioquímica y al Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas de la Facultad de Medicina de la UNAM, por proporcionar los modelos animales necesarios para la realización de este trabajo.
- A mi Comité Tutor, encabezado por el Dr. Miguel Ángel Ávila-Rodríguez, por su disposición y apoyo en la conducción de este trabajo.
- Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la Universidad, por los recursos otorgados para participar en el LXV Congreso Nacional de Física, realizado en la ciudad de Zacatecas del 02 al 07 de octubre del 2022.

## ÍNDICE

1. Introducción y antecedentes.....	5
Objetivo general .....	8
Objetivos específicos .....	8
2. Marco teórico.....	10
2.1. Demencia, enfermedad de Alzheimer y otros tipos .....	10
2.2. Etiología y patofisiología de la Enfermedad de Alzheimer (EA).....	11
2.3. Imagen molecular por Tomografía por Emisión de Positrones (PET).....	13
2.4. Radiofármacos PET para la Enfermedad de Alzheimer .....	14
2.5. Análisis cuantitativo de imágenes PET .....	16
2.5.1. Métodos compartimentales.....	17
2.5.2. Métodos gráficos .....	19
3. Metodología experimental.....	26
3.1. Producción del [ <sup>11</sup> C]PIB .....	26
3.2. Producción del [ <sup>18</sup> F]CNEURO-120.....	27
3.3. Estudios dinámicos PET .....	29
3.4. Análisis cuantitativo de las imágenes.....	30
3.5. Estadística .....	31
4. Resultados y discusión .....	32
4.1. Estudios microPET con [ <sup>11</sup> C]PIB.....	32
4.2. Estudios microPET con [ <sup>18</sup> F]CNEURO-120.....	48
4.3. Estudios PET de ratas con [ <sup>11</sup> C]PIB y [ <sup>18</sup> F]CNEURO-120 .....	57
4.4. Estudio de estabilidad <i>in vivo</i> con [ <sup>18</sup> F]CNEURO-120 .....	62
5. Conclusiones .....	65
Referencias .....	68

## 1. Introducción y antecedentes

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que, de forma progresiva y constante, conduce a la pérdida de las capacidades cognitivas y de la memoria, desorientación, trastornos del lenguaje y cambios de conducta, incidiendo de forma negativa en la calidad de vida de los pacientes. La EA es una de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes y con un continuo crecimiento de casos, estimándose un alcance para el año 2050 de alrededor de 115 millones de casos en todo el mundo y de más de 3.5 millones en México [1]. Estas cifras han motivado a fijar especial atención y a estudiar los cambios moleculares y celulares que se llevan a cabo durante la progresión de la enfermedad. Numerosos estudios han verificado que la presencia en el cerebro de depósitos proteicos: ovillos neurofibrilares (ONF) y placas seniles, están implicados en el proceso que conduce a la degeneración neuronal progresiva y a la muerte neuronal. Las placas seniles están formadas por depósitos de péptidos  $\beta$ -amiloides ( $\beta$ A) de 39-42 aminoácidos [2], mientras que los ONF resultan de la hiperfosforilación de la proteína tau. La acumulación de las placas  $\beta$ A y su excesiva generación se identifica como el factor de riesgo primario en la progresión de la EA. Las primeras consecuencias son desviación de la función sináptica normal, que se traduce posteriormente en pérdida sináptica y neuronal [3]. Éste puede considerarse el estadio inicial de la enfermedad, en adelante lo que ocurre es un desequilibrio permanente entre la producción y eliminación de las placas  $\beta$ A, así como la formación de ovillos neurofibrilares que contienen a la proteína tau y que conducen a alteraciones en las propiedades neuronales.

Conocer la patogénesis de la EA ha permitido desarrollar, entre otras cosas, métodos para tratar la enfermedad con un enfoque de placas, atacando especialmente las aglomeraciones de placas  $\beta$ A. No obstante, uno de los principales retos sigue siendo el diagnóstico temprano de la EA. En principio, el único diagnóstico certero que puede hacerse de esta enfermedad implica la visualización de estructuras patológicas

*postmortem* [4]. Dado que se trata de una enfermedad irreversible y silenciosa con una larga fase preclínica, se vuelve fundamental poder establecer un diagnóstico temprano, tal que se pueda intervenir a tiempo y lograr que los tratamientos sean más efectivos, además de permitir a los pacientes una planificación de vida de cara al futuro. Se ha comprobado que la implementación de una terapia temprana puede retardar el inicio de la manifestación de la EA en cinco años y disminuir su prevalencia en un 50% [5], [6]. Por otra parte, los depósitos de péptidos  $\beta$ A pueden aparecer hasta 20 años antes de que se manifiesten los primeros síntomas de la enfermedad, convirtiéndose en un blanco molecular relevante para el diagnóstico temprano [7].

Estudios *in vivo* y no invasivos con imágenes médicas funcionales han sido utilizados para investigar la detección temprana de la EA a partir de marcadores con afinidad por las placas de  $\beta$ A. Algunos de estos estudios se han realizado mediante técnicas de imagen como la resonancia magnética, utilizando nanopartículas magnéticas como marcadores de  $\beta$ A [8]. Sin embargo, por sus ventajas en cuanto al uso de radiomarcadores, prevalecen los estudios de imagen mediante tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés); siendo una técnica de imagen nuclear molecular en rápido desarrollo y que permite, de forma no invasiva, visualizar procesos moleculares o celulares *in vivo* a partir de la distribución espacio-temporal de radiofármacos específicos para marcar blancos moleculares. La imagen PET ha demostrado ser un método especialmente útil para detectar y dar seguimiento a un gran número de patologías oncológicas, neurológicas y cardiológicas.

El radiomarcador emisor de positrones más utilizado para marcar placas de amiloide es el [ $^{11}\text{C}$ ]-Pittsburgh compound B ([ $^{11}\text{C}$ ]PIB), su rápida entrada en el cerebro, el buen rendimiento radioquímico, su actividad específica, así como su costo accesible y la unión específica y prolongada que tiene con las placas de  $\beta$ A lo han convertido en el estándar de oro para estudios de imágenes PET [9]. A pesar de los atributos que tiene este marcador, su vida media de 20 minutos limita su distribución a hospitales y centros de

diagnóstico distantes del centro de producción. Aunque se han aprobado algunos radiofármacos para detección de placa  $\beta$ A marcados con el radioisótopo [ $^{18}\text{F}$ ] como el [ $^{18}\text{F}$ ]flutemetamol, [ $^{18}\text{F}$ ]florbetapir y [ $^{18}\text{F}$ ]florbetaben, al tener patente, es difícil implementar su producción por los altos costos y las condiciones no aceptables que imponen los dueños de dichas patentes.

El Centro de Neurociencias de Cuba (CNEURO) desarrolló recientemente una molécula denominada CNEURO-120 (o Amylovis) marcada con el radioisótopo [ $^{18}\text{F}$ ] para la detección de placas  $\beta$ A [10]. De acuerdo con sus resultados, el radiofármaco se obtiene con un rendimiento satisfactorio ( $24.2 \pm 1.4\%$ ), alta pureza radioquímica ( $> 99\%$ ) y actividad molar de entre 351 a 616 GBq/ $\mu\text{mol}$ . La lipofilicidad se midió mediante el logP, el valor calculado fue de  $2.46 \pm 0.06$  [10]. Los resultados de los ensayos *in vitro* de unión en secciones seriadas de cerebro *postmortem* de ratones transgénicos 3xTG revelaron un perfil de unión eficaz para la detección de placas  $\beta$ A. En el ensayo de biodistribución utilizando ratones sanos de 10-12 semanas de edad [10], el [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 mostró una rápida penetración en cerebro (7 %ID/g a los 5 minutos después de la inyección) y una rápida eliminación ( $0,11 \pm 0,03$  %ID/g a los 60 minutos). Por otro lado, los resultados de estudios de biodistribución realizados en el mismo trabajo reportan una actividad máxima más rápida en ratones sanos (2 minutos) comparada con la de ratones transgénicos (pico de actividad máxima a los 23-25 minutos post-inyección), indicando una cinética de absorción más lenta. Los autores proponen que este resultado puede estar relacionado justamente con la unión específica que tiene el [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 a las placas de  $\beta$ A en regiones del cerebro. Los resultados que obtuvieron sugieren que el [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 puede ser un potencial radiomarcador de la EA. Sin embargo, en el reporte no se incluyen las imágenes microPET, no realizan un análisis cuantitativo y tampoco verifican si hay regiones del cerebro con captación específica, por lo que los estudios preclínicos realizados no son

concluyentes o suficientes para dar el siguiente paso de su evaluación en humanos en las distintas fases clínicas.

Es imprescindible encontrar nuevos radiomarcadores con propiedades semejantes o mejores que sus antecesores y que puedan satisfacer la disponibilidad de recursos necesarios para su producción. Aunque la Facultad de Medicina de la UNAM es pionera en México en imagen molecular PET y, en su Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón se produce una amplia variedad de radiofármacos, aún no se cuenta con ningún radiofármaco específico para el diagnóstico diferenciado de la EA. La producción del [ $^{11}\text{C}$ ]PIB y [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 en la UNAM sería un paso valioso para utilizar eventualmente dichos radiofármacos en el diagnóstico de la EA de manera no invasiva mediante imagen molecular PET.

### Objetivo general

Analizar de forma cuantitativa estudios preclínicos en ratones sanos y en un modelo transgénico de la EA para evaluar la afinidad de un fármaco radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  como un potencial marcador PET de la placa  $\beta$ -amiloide.

### Objetivos específicos

- Adquirir estudios microPET con el radiofármaco [ $^{11}\text{C}$ ]PIB para usarlo como estándar de oro en la evaluación de la placa beta amiloide.
- Adquirir estudios microPET con el radiofármaco [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 para evaluar su posible afinidad por las placas beta amiloide.
- Realizar un análisis cuantitativo de las imágenes preclínicas adquiridas con ambos radiofármacos para su comparación.
- Obtener evidencia científica sobre la especificidad de los radiofármacos para detectar de manera no invasiva depósitos de placas beta amiloide.

En el primer capítulo se presenta una descripción general del problema de investigación que se abordó en este trabajo. Se incluye en la introducción un panorama global sobre la incidencia de la EA, los antecedentes asociados con la detección de  $\beta$ -amiloide y las razones que justifican la realización de esta investigación.

El segundo capítulo es una revisión teórica sobre los conceptos más importantes que conciernen a la tesis. Se discuten particularidades sobre la etiología de la EA y otras generalidades de las enfermedades neurodegenerativas. En el marco teórico también se describe la técnica de imagen empleada para la obtención de las imágenes y se hace una presentación detallada de los métodos que serán utilizados para el análisis cuantitativo de las mismas.

El tercer capítulo corresponde a los métodos experimentales empleados en la investigación. Se detallan las consideraciones técnicas y los parámetros usados en todos los pasos, desde la producción de los radiofármacos hasta la adquisición de las imágenes microPET y el análisis cuantitativo de los datos.

En el cuarto y quinto capítulo se presentan los resultados obtenidos y las conclusiones, respectivamente. Los resultados se desglosan de acuerdo con el radiofármaco empleado para proceder posteriormente a compararlos. Además, se incluyen también los resultados de estudios adicionales realizados con otro modelo de EA en ratas y de un estudio de estabilidad *in vivo* realizado con [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120. En las conclusiones se repasan los principales resultados obtenidos que, a su vez, permiten discutir sobre el problema inicialmente planteado y sobre el cumplimiento de los objetivos propuestos. En este capítulo final también se mencionan las limitaciones que tuvo la investigación y se hacen recomendaciones para trabajos futuros.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Demencia, enfermedad de Alzheimer y otros tipos

La demencia es un concepto utilizado para referirse a un conjunto de enfermedades que involucran el deterioro grave y progresivo de varias funciones cerebrales. Los síntomas asociados a la demencia son variados y dependen del grado de avance en el que se encuentre la enfermedad y de la enfermedad en sí misma. Dentro de los síntomas más comunes se incluyen pérdida de memoria, dificultad para concentrarse, cambios de humor, pérdida de equilibrio, problemas motores, entre otros [11].

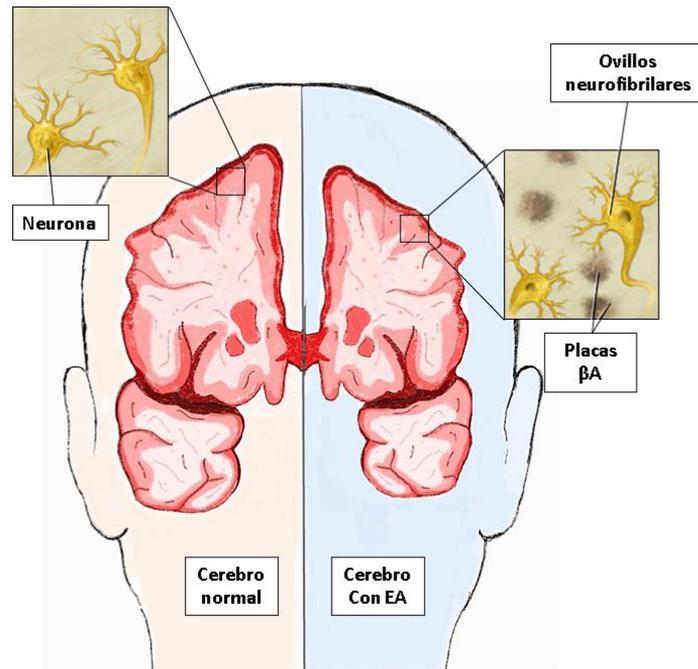
La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común. Fue descrita por primera vez en el año 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer [11] y representa del 60 al 80% de los casos de demencia. Se estima que para el año 2050, una de cada 85 personas en todo el mundo desarrollará esta enfermedad [12]. La edad es el principal factor de riesgo de la EA y los avances en el cuidado de la salud que permiten una mayor esperanza de vida han llevado a un aumento constante en la incidencia de la enfermedad [13]. Después de la EA, el deterioro cognitivo vascular es la segunda forma más común de demencia en términos de incidencia y prevalencia. El diagnóstico de demencia vascular pura es poco común, representando menos del 10% de los casos de demencia. Sin embargo, es un factor relevante que influye en la demencia de etiología múltiple o mixta, principalmente asociada con la patología de EA y que representa aproximadamente el 30-40 % de todos los casos [14]. Con una incidencia menor, están la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (PDD) [15] y la degeneración lobar frontotemporal. Esta última se caracteriza por ser un trastorno neurodegenerativo considerablemente devastador y de inicio temprano que involucra afecciones en los lóbulos frontales o temporales, o ambos.

Aunque la mayoría de los casos de demencia se relacionan con enfermedades progresivas e irreversibles, la detección y tratamiento temprano podrían ralentizar los problemas cognitivos asociados y con ello, los síntomas más graves de cada tipo de demencia.

## 2.2. Etiología y patofisiología de la Enfermedad de Alzheimer (EA)

Teóricamente se ha propuesto una ruta que describe la progresión de la EA desde sus estadios más tempranos hasta los más avanzados. Aunque dicha ruta ha sido parcialmente verificada mediante diversos estudios, la patogénesis y evolución de la enfermedad no se conoce con completa exactitud. Así mismo el diagnóstico certero de la enfermedad solo es posible mediante estudios *post-mortem* [4].

Se conocen varias características neuropatológicas relacionadas con la EA. La primera de estas características son los depósitos proteicos extracelulares de placas seniles, formadas por péptidos  $\beta$ -amiloides ( $\beta$ A) de 39-42 aminoácidos. La acumulación de estas placas es considerada el factor de riesgo primario de la EA [3] (Figura 1). Por otra parte, está también la acumulación de ovillos neurofibrilares (ONF), que resultan de la hiperfosforilación de la proteína tau. Típicamente, esta proteína estabiliza microtúbulos que permiten la comunicación axonal de largo alcance, sin embargo, en su forma hiperfosforilada afecta la organización de los microtúbulos e interfiere directamente con el transporte y la organización estructural del compartimento axonal [3]. Además de las placas  $\beta$ A y los ONF de proteína tau, se han identificado otros procesos que también están implicados en la patogénesis de la enfermedad, entre ellos están la neuroinflamación y el hipometabolismo de glucosa [16].



**Figura 1.** Comparación entre cerebro sano y cerebro con Enfermedad de Alzheimer. Modificado a partir de [17].

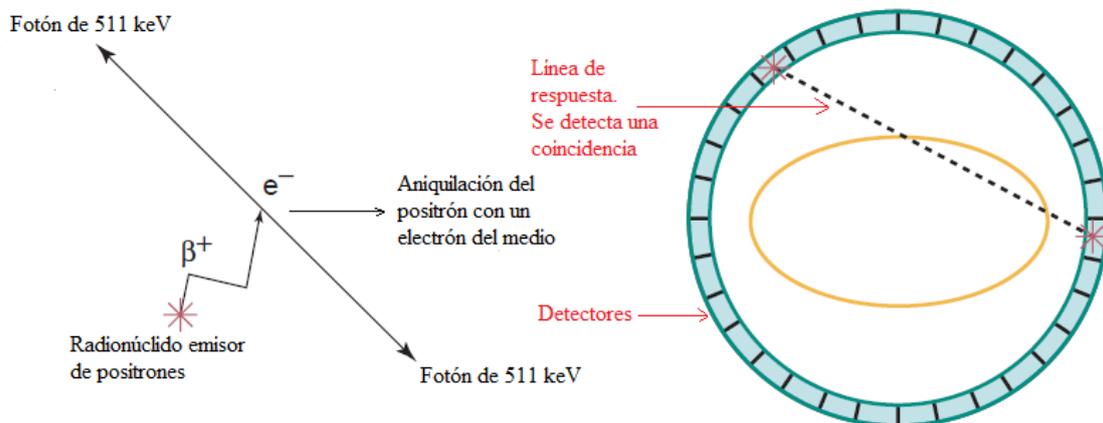
Se han identificado tres genes como probables causantes de la EA de aparición temprana. El primero en reconocerse fue el APP, que codifica la proteína precursora del amiloide. Posteriormente se identificaron el PSEN1 y PSEN2, que codifican la presenilina 1 y 2, respectivamente, y que también están involucrados en la producción de las placas  $\beta A$  [13]. La acumulación de péptidos  $\beta A$  puede aparecer de 15 a 20 años antes de que se manifiesten los primeros síntomas clínicos de la enfermedad [3], lo que motiva aún más a estudiar dichas placas como blancos moleculares potenciales para el diagnóstico diferenciado y temprano de la EA.

El deterioro cognitivo leve (DCL) se considera la etapa prodrómica de la enfermedad que, si bien puede ser debida a la EA, también hay probabilidad de que sea causada por otros tipos de demencia. Generalmente, luego de las primeras etapas lo que ocurre es una acumulación progresiva en los niveles de placas seniles  $\beta A$ , así como de ONF, conduciendo a procesos neuropatológicos asociados con una progresiva pérdida neuronal y de sinapsis, lo que desencadena posteriormente en atrofia cerebral [14].

### 2.3. Imagen molecular por Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

La Tomografía por Emisión de Positrones se basa en la detección simultánea de fotones de aniquilación después de la administración de un fármaco marcado con material radiactivo que decae emitiendo positrones (antipartícula del electrón). Estas sustancias típicamente se conocen como radiofármacos o radioligandos. La técnica de imágenes PET refleja la concentración de actividad del radiofármaco dentro de un organismo y puede brindar información cuantitativa de la cinética del marcador y del proceso fisiológico bajo estudio.

Los fotones de aniquilación de 511 keV son detectados en coincidencia mediante un arreglo circular de detectores que registran dichos eventos (Figura 2), este principio es el que permite localizar espacial y temporalmente el lugar dentro del cuerpo del paciente en el cual se concentra el emisor de positrones.



**Figura 2.** Aniquilación de positrón con electrón. Geometría en un escáner PET para detectar las coincidencias. Imagen modificada a partir de [18].

La calidad de la imagen en PET depende fundamentalmente de la energía promedio de los positrones emitidos, el tamaño de los detectores, el radio del escáner y de la electrónica de salida asociada. Las imágenes obtenidas pueden ser estáticas, registrando el número de cuentas en un determinado tiempo fijo, o se puede seguir un protocolo de adquisición de datos dinámicos, adquiriendo una serie de imágenes en función del tiempo desde la administración del radiofármaco hasta alcanzar cierto nivel de equilibrio.

## 2.4. Radiofármacos PET para la Enfermedad de Alzheimer

Los radiofármacos más utilizados en PET para estudiar la EA tienen como blancos moleculares los depósitos de placas  $\beta$ A, los agregados de proteína tau y la disminución del metabolismo cerebral. Si bien buena parte de estos marcadores permiten discriminar pacientes con EA o DCL de controles sanos, la placa  $\beta$ A es un blanco de especial interés por ser uno de los procesos más relevantes involucrados en la patofisiología de la enfermedad, así como los altos niveles de placas seniles que pueden encontrarse en sujetos con EA en comparación con los niveles de ONF.

El primer estudio *in vivo* de PET para evaluar placas  $\beta$ A se realizó en el año 2002 a un paciente con EA utilizando el radiomarcador canónico por excelencia para este blanco molecular, el derivado de tioflavina [ $^{11}\text{C}$ ]6-OH-BTA-1, o N-methyl- [ $^{11}\text{C}$ ]2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([ $^{11}\text{C}$ ]PIB) [16]. Se ha comprobado que este marcador permite discriminar entre pacientes con EA de controles sanos, mostrando diferencias significativas en los valores de captación estandarizados (SUV, por sus siglas en inglés) en varias regiones del cerebro [19]. Su captación en humanos se distribuye en las cortezas frontal, medial y parietal lateral posterior, precúneo, corteza occipital, cortezas laterales temporales y cuerpo estriado. Su alta afinidad y especificidad por las placas  $\beta$ A lo convirtieron en el estándar de oro actual para estos estudios, además su patrón de captación también permite predecir la fenotipificación<sup>1</sup> del DCL a EA [20]. Sin embargo, la vida media del  $^{11}\text{C}$  es de apenas 20 minutos, lo que limita su uso y ha promovido el desarrollo de una nueva generación de trazadores marcados con  $^{18}\text{F}$ , ampliando la vida media a 110 minutos. A la fecha se han aprobado para uso clínico 3 fármacos radiomarcados con  $^{18}\text{F}$ : [ $^{18}\text{F}$ ]flutemetamol, [ $^{18}\text{F}$ ]florbetapir y [ $^{18}\text{F}$ ]florbetaben; además, un cuarto ([ $^{18}\text{F}$ ]AZD4694) se encuentra en la fase III de las pruebas. El más investigado a la fecha ha sido el [ $^{18}\text{F}$ ]florbetapir, que es comparable con el [ $^{11}\text{C}$ ]PIB y ha demostrado destacable sensibilidad y especificidad por las placas  $\beta$ A

---

<sup>1</sup> Transición entre las etapas prodrómicas y sintomáticas [41].

[12]. Cada radiofármaco tiene sus beneficios en comparación con los otros y tienen, cada uno, sus correspondientes protocolos. Sin embargo, estos radiofármacos tienen patente, por lo que implementar su producción es económicamente inviable, sin considerar las condiciones inaceptables que imponen las empresas dueñas de las patentes para su producción.

Un estudio reciente [10] mostró que la molécula 2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno(5) marcada con el radioisótopo  $^{18}\text{F}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  o  $[^{18}\text{F}]\text{Amylovis}$ ), tiene una mayor afinidad por las placas de  $\beta\text{A}$  que el estándar comúnmente usado. Los resultados preliminares que obtuvieron sugieren el potencial que podría tener el  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  como radiomarcador de la EA, pero no son concluyentes al respecto. Además, no hicieron un análisis cuantitativo de las imágenes y tampoco especifican si hay regiones del cerebro con captación específica, por lo que no se puede evaluar si éstas tienen alguna asociación relevante con los cambios moleculares que se dan en la patogénesis de la enfermedad.

También se han hecho estudios con otros radiofármacos para investigar la relación de la EA con otras características neuropatológicas asociadas. Por ejemplo, El  $[^{18}\text{F}]\text{AV-1451}$  (o  $[^{18}\text{F}]\text{Flortaucipir}$ ) es el más aplicado y a la fecha, el único aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) para marcaje de la proteína tau. Tiene una afinidad 25 veces mayor por la proteína tau que por las placas  $\beta\text{A}$  y ha demostrado una cinética favorable [16]. Para el caso de neuroinflamación, el radiofármaco más estudiado es el  $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ , que tiene alta afinidad por la proteína translocadora 18 kDa (TSPO), involucrada en el proceso neuroinflamatorio [12]. El metabolismo de glucosa típicamente se ha estudiado con el  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ . La manifestación característica del FDG en demencia por EA es el hipometabolismo en la parte posterior del cerebro con un patrón característico que resulta siendo un fuerte indicador de la severidad y avance de la enfermedad [16].

A nivel preclínico, los estudios con el estándar de oro [ $^{11}\text{C}$ ]PIB se han realizado con diferentes modelos de ratón transgénico como el APP23, Tg2576, APP<sup>swe</sup>-PS1dE9 [21], [22], entre otros. Estudios previos han mostrado que la unión del radiofármaco a las placas  $\beta\text{A}$  es fuertemente dependiente del modelo de ratón transgénico y de la edad de los animales [21]. Pese a la dependencia de la unión del fármaco con el modelo, varios estudios han probado que en el caso de ratones transgénicos APP23 (con la mutación APP Swedish) se identifica alta captación del radiofármaco en hipocampo, corteza frontal y neocorteza a partir de los 17 meses de edad [21], [22]. Con otros radioligandos se ha observado alta captación en corteza, estriado y mesencéfalo en ratones mayores a los 18 meses con la misma mutación [23].

## 2.5. Análisis cuantitativo de imágenes PET

En la práctica clínica rutinaria, las imágenes PET adquiridas suelen ser analizadas mediante inspección visual o, a lo sumo, con métodos semicuantitativos como el valor de captación estándar (SUV, por sus siglas en inglés) que, formalmente, se define como el cociente entre la concentración de actividad medida a través de la imagen PET en una región de interés y la actividad inyectada normalizada por el peso del sujeto [24]. No obstante, esto puede verse como un ineficiente uso de la información, dado que la imagen son datos que pueden aportar un mayor entendimiento sobre los procesos fisiológicos involucrados en diversas patologías. La información puede ser mejor aprovechada si se utilizan métodos cuantitativos que relacionen la cinética de distribución de los radiofármacos con el proceso fisiológico bajo estudio. Mediante ecuaciones operacionales que describen la interacción del fármaco con el tejido es posible obtener estimaciones de diferentes parámetros de interés biológico como el volumen de distribución ( $V_T$ ) o el potencial de unión (BP, por sus siglas en inglés).

El análisis de imágenes estáticas suele realizarse a través de métodos como el análisis píxel por píxel, análisis estadístico o análisis por cocientes. En el caso de las

imágenes dinámicas, los métodos se basan en modelos compartimentales o en simplificaciones de estos, como los métodos gráficos de Patlak y Logan [26].

### 2.5.1. Métodos compartimentales

Los modelos compartimentales permiten modelar los procesos dinámicos que ocurren en un tejido de interés mediante la descomposición por compartimentos del sistema fisiológico involucrado. Los modelos compartimentales pueden ser de 1, 2 o  $n$  compartimentos dependiendo de la complejidad del proceso y de la variedad de cambios que pueda presentar la especie química (Figura 3). Cada uno de los compartimentos se asocia con un estado químico del radiotrazador o con la región física en la cual se encuentra homogéneamente distribuido.

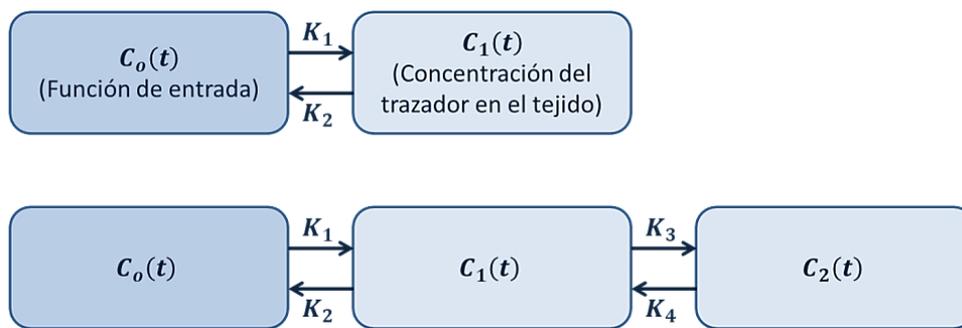


Figura 3. Modelo compartimental de un tejido (superior) y de dos tejidos (inferior).

El trazador inyectado puede estar presente en el tejido en un número determinado de estados físicos o químicos y es transferido entre los distintos compartimentos a una tasa constante ( $K_i$ ) que es proporcional a la concentración del trazador en el compartimento. Las flechas indican las posibles vías de transferencia que puede seguir el trazador y dependen de que la captación sea reversible o irreversible [25]. El cambio de concentración en uno de los compartimentos es una función lineal de las concentraciones en todos los demás compartimentos, esto es:

$$\frac{dC_i(t)}{dt} = f_i(C_o(t), C_1(t), C_2(t), \dots, C_n(t))$$

Típicamente, el primer compartimento ( $C_o(t)$ ) es conocido como función de entrada y se asocia con la concentración de trazador en sangre o plasma. Su medida es

experimental y normalmente se obtiene extrayendo sangre del individuo bajo estudio de forma frecuente luego de la inyección. Los demás compartimentos representan la concentración del trazador en determinada región o en determinado estado químico. La presencia del trazador en el compartimento puede ser en forma de ligando libre en plasma, ligando en tejido no unido específicamente o ligando unido específicamente a un receptor [26].

El caso más simple de los modelos compartimentales es el modelo de 1 compartimento de tejido (2-compartimentos en total). En este caso se tiene el compartimento correspondiente a la función de entrada ( $C_o(t)$ ) conectado con el compartimento de tejido ( $C_1(t)$ ) mediante 2 constantes de distribución  $K_1$  y  $k_2$ . Cualquier modelo compartimental puede ser descrito en términos de un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias lineales de primer orden con coeficientes constantes. Para el caso de 2-compartimentos, se tiene:

$$\frac{dC_1(t)}{dt} = K_1 C_o(t) - k_2 C_1(t)$$

$K_1$  es la constante de distribución de transferencia de la sangre (o plasma) al tejido ( $mL/cm^3/min$ ) y  $k_2$  es la constante de distribución de transferencia del tejido a la sangre ( $1/min$ ). Por convención,  $K_1$  suele escribirse en mayúscula para diferenciarla de las demás constantes, dado que tiene distintas unidades de medida. La solución a la ecuación diferencial puede obtenerse mediante la transformada de Laplace y considerando la condición inicial  $C(0) = 0$ , con lo cual:

$$\begin{aligned} C(t) &= K_1 \int_0^t e^{-k_2(t-\tau)} C_o(\tau) d\tau \\ &\cong K_1 \sum_{\tau=0}^{\tau=t} e^{-k_2(t-\tau)} C_o(\tau) \Delta\tau \\ &= K_1 [e^{-k_2 t} C_o(0) + e^{-k_2(t-1)} C_o(1) + e^{-k_2(t-2)} C_o(2) + \dots + C_o(t)] \end{aligned}$$

$C(t)$  (Bq/mL) es la concentración como función del tiempo de trazador en el tejido. Dicha concentración es medida mediante la técnica PET y puede interpretarse como la función de respuesta a la función de entrada  $C_o(t)$ . La ecuación anterior evidencia una dependencia de  $C(t)$  en el tiempo  $t$  con las concentraciones de  $C_o(t)$  en tiempos anteriores. Para el caso de 3-compartimentos (2 compartimentos de tejido) el razonamiento es análogo. Son necesarias ahora 2 ecuaciones diferenciales para calcular las curvas de concentración en función del tiempo de los 2 compartimentos de tejido [25], [26]:

$$\frac{dC_1(t)}{dt} = K_1 C_o(t) - (k_2 + k_3)C_1(t) + k_4 C_2(t)$$

$$\frac{dC_2(t)}{dt} = k_3 C_1(t) - k_4 C_2(t)$$

Como previamente se mencionó, un caso particular es el de la captación irreversible. En tal caso, el trazador se queda atrapado en uno de los compartimentos y se puede establecer  $k_4 = 0$ , con lo cual:

$$\frac{dC_1(t)}{dt} = K_1 C_o(t) - (k_2 + k_3)C_1(t)$$

$$\frac{dC_2(t)}{dt} = k_3 C_1(t)$$

Aunque los modelos compartimentales son los métodos matemáticos más precisos y confiables para describir la dinámica del trazador en el tejido de interés [25], su complejidad numérica y la estricta necesidad de extraer sangre arterial para obtener la función de entrada hacen necesario buscar simplificaciones que permitan una adecuada descripción del proceso, con menos complicaciones teóricas y experimentales. Los métodos gráficos son una herramienta conveniente para cumplir dicho propósito.

### 2.5.2. Métodos gráficos

Para estimar los parámetros de interés que permiten explicar el curso temporal de los datos obtenidos mediante PET es necesario ajustar una función al modelo compartimental empleado. Cuando el ajuste no es lineal, se encuentran inconvenientes

asociados con la carga computacional, así como con una amplia variación y mala identificación de los parámetros. Por lo anterior, se han propuesto diferentes métodos para “linealizar” los datos basados en un ajuste lineal por mínimos cuadrados. Los dos modelos de linealización más utilizados son el Gráfico de Logan [28], usado cuando hay captación reversible, y el Gráfico de Patlak [29], empleado para trazadores con captación irreversible [25]. Ambos formalismos se basan en la idea de proveer un método de análisis completamente gráfico que no dependa del modelo.

### 2.5.2.1. Gráfico de Patlak

El análisis gráfico de Patlak es un enfoque de linealización utilizado cuando la captación es irreversible. En este formalismo se parte de la idea de que, en principio, pueden existir  $n$  compartimentos con captación reversible en los que el trazador entra y sale. Sin embargo, luego de alcanzar determinado tiempo, las concentraciones en dichos compartimentos siguen el comportamiento de la concentración de trazador en plasma, es decir, no cambia su proporción (Figura 4). A partir de este punto de “equilibrio” cualquier cambio en la concentración total del tejido será debido únicamente al cambio en el compartimento irreversible [27].

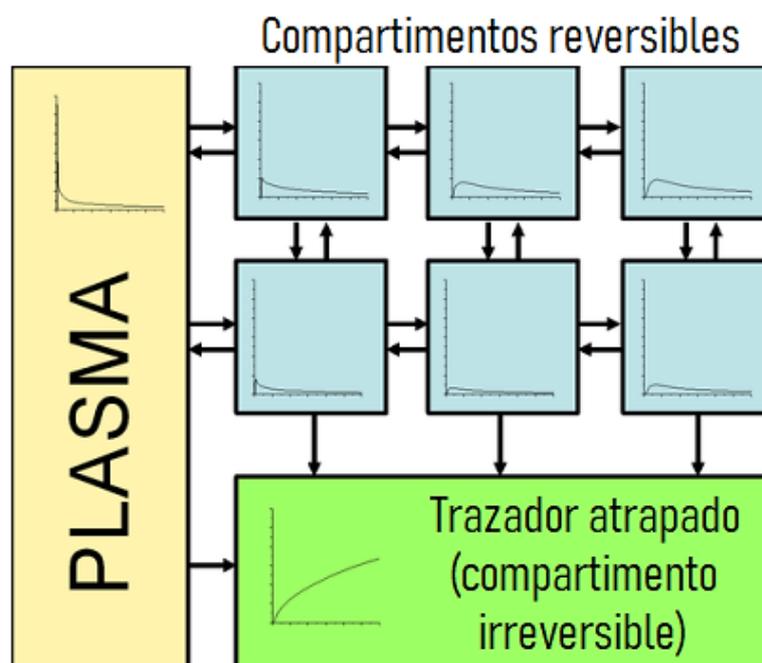


Figura 4. Equilibrio en los compartimentos reversibles. Modificada a partir de [27].

Cuando se logra el equilibrio, la gráfica se vuelve lineal y la pendiente representa la tasa de transferencia neta,  $K_i$ , que indica la cantidad de trazador acumulado en el tejido respecto de la cantidad de trazador disponible en el plasma y se mide en  $min^{-1}$  o  $\frac{mL \text{ tejido}}{mL \text{ plasma} * min}$ . La ecuación operativa del gráfico se puede derivar a partir de un modelo de 2 compartimentos individuales y está dada en su forma general por:

$$\frac{C_{ROI}(t)}{C_o(t)} = K_i \frac{\int_0^t C_o(u) du}{C_o(t)} + \beta$$

donde  $\beta$  representa el intercepto con el *eje y*. El *eje y* corresponde a los volúmenes de distribución (proporción de concentración de marcador en tejido y normalizada respecto a la concentración en plasma) en función del tiempo. El *eje x* representa la integral de la concentración en plasma normalizada respecto a la concentración en plasma (Figura 5).

El análisis gráfico de Patlak es una simplificación útil y ahorra tiempo de cómputo de forma significativa. Sin embargo, requiere escaneos PET dinámicos considerablemente largos y la curva de plasma para la función de entrada debe medirse desde el momento de la inyección del marcador hasta la finalización del estudio.

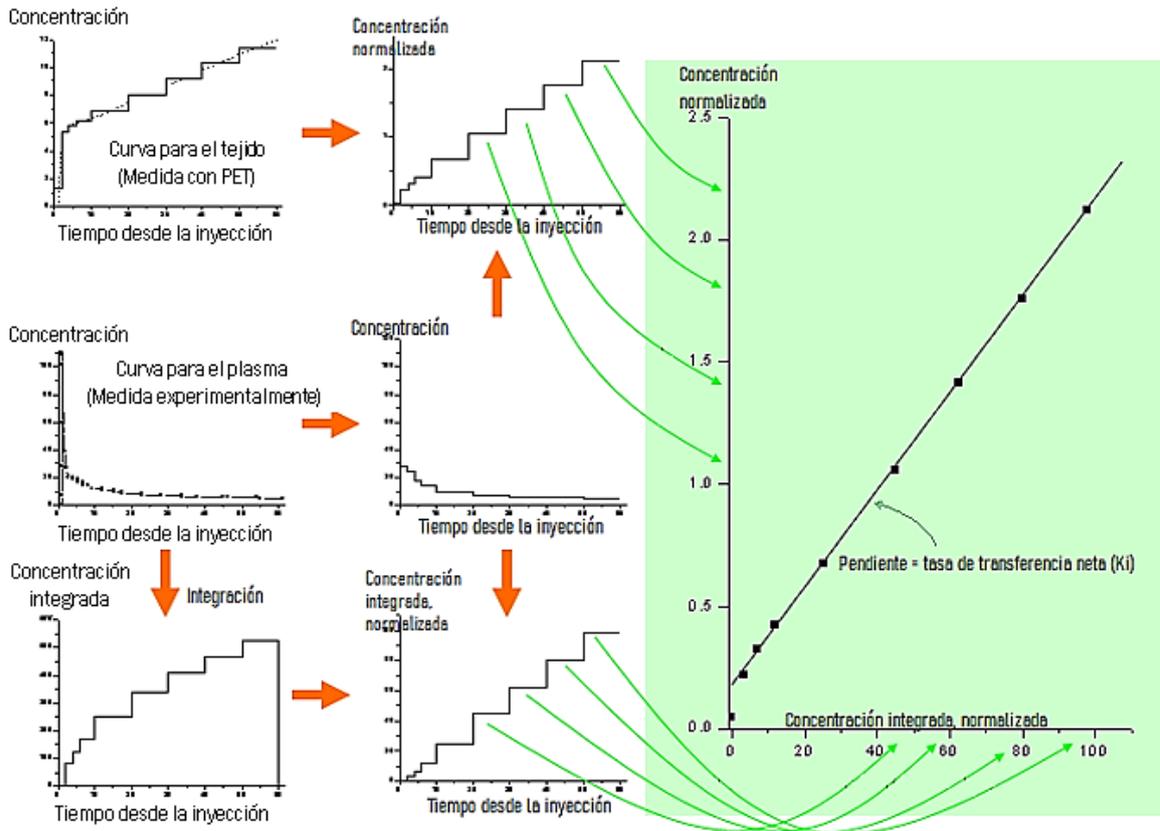


Figura 5. Elaboración del gráfico de Patlak. Modificada a partir de [27].

### 2.5.2.2. Gráfico de Logan

El gráfico de Logan es un algoritmo muy utilizado en análisis cuantitativo PET para captación reversible gracias a su simple implementación matemática y rendimiento computacional. El gráfico se deriva a partir de la integración del conjunto de ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento del trazador en los tejidos de interés, su forma general es la que se muestra a continuación [28]:

$$\frac{\int_0^t C(u)du}{C(t)} = \alpha \frac{\int_0^t C_o(u)du}{C(t)} + \beta$$

$C(t)$  representa la curva actividad-tiempo en el tejido de interés,  $C_o(u)$  es la curva actividad-tiempo en plasma,  $\alpha$  y  $\beta$  son la pendiente y el intercepto con el eje y, respectivamente. El diagrama de Logan permite estimar el volumen de distribución ( $V_T$ ) de equilibrio a través de una equivalencia directa con la pendiente de la recta luego de que se ha alcanzado la linealidad, es decir,  $\alpha = V_T$ . La linealidad se logra cuando el

intercepto ( $\beta$ ) es constante. El volumen de distribución es una relación entre la concentración del trazador en la región de interés y la concentración del trazador en el plasma una vez alcanzado el equilibrio [29]. Además, si se cuenta con una región de referencia es posible determinar el potencial de unión (BP, por sus siglas en inglés) a partir de la razón entre los volúmenes de distribución de la región de interés y la de referencia:

$$BP = \frac{V_T}{V_T^{ref}} - 1$$

El concepto de potencial de unión es especialmente importante cuando se quiere cuantificar la relación entre la densidad de receptores y la afinidad del radioligando por los mismos. Particularmente, el BP se define como el producto entre la densidad del receptor ( $B_{max}$ ) y la constante de disociación de equilibrio del radioligando ( $K_D$ ) [30]. Dado que la constante  $K_D$  es inversamente proporcional a la afinidad de unión del ligando, el BP también puede definirse como el producto entre el  $B_{max}$  y la afinidad de unión.

$$BP = \frac{B_{max}}{K_D} = B_{max} \times \text{afinidad}$$

Los métodos gráficos representan una buena simplificación a los modelos compartimentales, pero siguen requiriendo en la mayoría de los casos muestras de plasma o exploraciones dinámicas muy largas, lo que termina desvaneciendo de algún modo el carácter no-invasivo de la técnica PET. Existen otras simplificaciones a los modelos compartimentales que reemplazan el muestreo de plasma por una función de entrada basada en la curva de actividad-tiempo de una región de referencia con captación específica inexistente (o muy baja). Estos modelos consideran 2 regiones, una región objetivo que tiene captación específica del trazador y una región de referencia con captación no específica. Una de las simplificaciones al gráfico de Logan se conoce como el Modelo de Logan con tejido de referencia (LRTM, por sus siglas en inglés). El LRTM supone que hay una región de referencia con concentración de actividad  $C_{REF}(t)$  y con una constante de aclaramiento promedio de tejido-plasma ( $k'_2$ ).

La concentración en el tejido de interés  $C_{VOI}(t)$  es normalizada y graficada como función de la concentración de actividad normalizada en el tejido de referencia. Este modelo permite obtener la relación de volumen de distribución (DVR) a partir de la pendiente de la gráfica descrita por la ecuación de regresión lineal, que está dada por:

$$\frac{\int_0^T C_{VOI}(t) dt}{C_{VOI}(T)} = DVR \left[ \frac{\int_0^T C_{REF}(t) dt + \frac{C_{REF}(T)}{k_2'}}{C_{VOI}(T)} \right] + int$$

El DVR o pendiente incluye un término de error que disminuye con el tiempo. A partir de determinado tiempo de equilibrio  $t^*$  el intercepto ( $int$ ) se vuelve constante y la pendiente puede ser determinada con un error mínimo. El potencial de unión (BP) puede ser calculado a partir de la relación  $DVR = BP + 1$ . El tiempo  $t^*$  se puede interpretar como el tiempo después del cual no se observan aumentos significativos en la pendiente y usualmente es determinado mediante la aplicación de otros modelos como el modelo de tejido de referencia multilíneal (MRTM) o el modelo simplificado de tejido de referencia (SRTM, por sus siglas en inglés).

El modelo simplificado de tejido de referencia utiliza un modelo de 1-compartimento de tejido tanto para la región de interés como para la región de referencia (Figura 6).

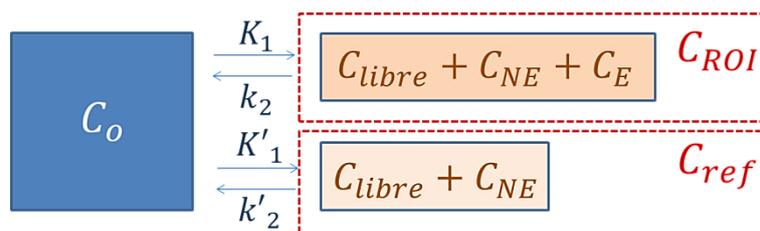


Figura 6. Modelo simplificado de tejido de referencia.

En la Figura 6 se identifican las dos regiones consideradas en el modelo,  $C_{ROI}$  es la concentración en la región de interés, que resulta de una combinación de compartimentos que incluye la concentración de trazador libre ( $C_{libre}$ ), trazador no unido específicamente ( $C_{NE}$ ) y trazador unido específicamente ( $C_E$ ). La región  $C_{ref}$  representa la concentración en la región de referencia y combina los compartimentos asociados

con la concentración de trazador libre y de trazador no unido específicamente. El SRTM se puede utilizar cuando el modelo de dos compartimentos (1 compartimento de tejido) puede describir de forma adecuada la cinética del radiofármaco, de ahí que se pueda realizar la simplificación y sustituir la función de concentración en plasma. La ecuación diferencial que describe el modelo está dada por [26]:

$$\frac{dC_{ROI}(t)}{dt} = R_1 \frac{dC_{ref}(t)}{dt} + k_2 C_{ref}(t) - \frac{k_2}{1 + BP_{ND}} C_{ROI}(t)$$

donde  $R_1 = \frac{k_2}{k_2'}$  y  $BP_{ND}$  es un parámetro conocido como potencial de unión no desplazable y se relaciona con la densidad de receptores y su afinidad por determinado trazador. La solución de la ecuación se obtiene por transformada de Laplace y está dada por:

$$C_{ROI}(t) = R_1 C_{ref}(t) + \left[ k_2 - \frac{R_1 k_2}{1 + BP_{ND}} \right] C_{ref}(t) \otimes e^{-\frac{k_2}{1 + BP_{ND}} t}$$

Los parámetros que se consideran en el SRTM:  $R_1$ ,  $BP_{ND}$  y  $k_2$  pueden ser calculados tanto con métodos de ajuste no-lineales como lineales, así como mediante análisis espectral o con enfoque de función base. Estimar dichos parámetros hace posible producir imágenes paramétricas en la escala de alguno de los parámetros considerados en el modelo [26].

### 3. Metodología experimental

#### 3.1. Producción del [ $^{11}\text{C}$ ]PIB

El radionúclido  $^{11}\text{C}$  se obtiene mediante la reacción nuclear  $^{14}\text{N}(p, \alpha)$ , bombardeando en un ciclotrón con un haz de protones de 11 MeV un blanco gaseoso de [ $^{nat}\text{N}$ ] $\text{N}_2$  mezclado con 1 o 2% de  $\text{O}_2$ . La abundancia natural del  $^{14}\text{N}$  ( $\geq 99\%$ ) hace que no sea necesario utilizar un blanco enriquecido isotópicamente. Con el  $\text{O}_2$  añadido se logra obtener un producto gaseoso ( $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ ) que no se pega en las paredes del cuerpo del blanco. La energía umbral para que se produzca dicha reacción nuclear es de 3132.27 keV [31]. El radionúclido es producido en el acelerador de partículas tipo ciclotrón Eclipse HP (Siemens) de la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón de la Facultad de Medicina de la UNAM. El Carbono-11 producido en el ciclotrón se descarga en forma de [ $^{11}\text{C}$ ] $\text{CO}_2$  y se retiene en una trampa criba molecular mientras los demás gases son descartados. El tamiz molecular es calentado a  $200^\circ\text{C}$  para liberar el compuesto que será burbujeado en una solución de  $\text{LiAlH}_4$  para formar [ $^{11}\text{C}$ ]Metanolato. Se aumenta la temperatura a  $100^\circ\text{C}$  hasta secar la solución y se añade  $\text{HI}$  para formar [ $^{11}\text{C}$ ]Yoduro de metilo ( $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ ). El [ $^{11}\text{C}$ ] $\text{CH}_3\text{I}$  es destilado hacia un reactor con triflato de plata ( $\text{AgOTf}$ ) que se calienta a  $190^\circ\text{C}$  para formar triflato de metilo ( $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ ), que es un producto mucho más reactivo y, por lo tanto, aumenta la eficiencia de marcado. El triflato de metilo se transfiere y se atrapa en un cartucho  $t\text{C}18$  precalentado a  $65^\circ\text{C}$  y precargado con el precursor, en este último paso se lleva a cabo la reacción de marcado. Todos los pasos previamente descritos se resumen en el diagrama de la Figura 7.

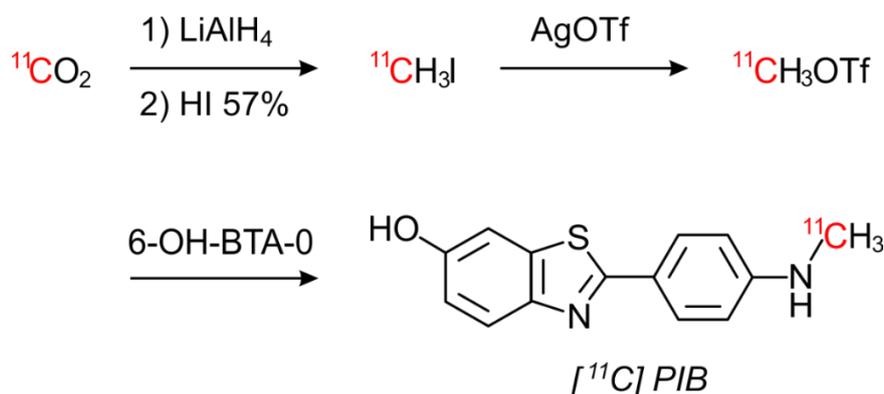


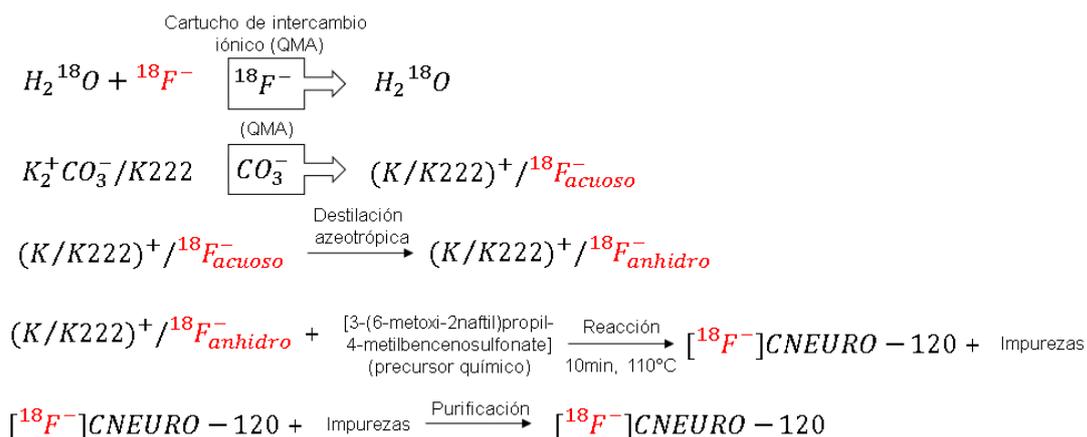
Figura 7. Diagrama de la síntesis de  $[{}^{11}\text{C}]\text{PIB}$ .

El proceso se desarrolla en un módulo de síntesis química Trasis All-in-One de la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón, que utiliza un método desarrollado por la empresa TRASIS con un casete de uso único y un kit de reactivos desarrollados por la misma empresa. La eficiencia de síntesis típica es  $\geq 10\%$  y la duración del proceso, una vez optimizado, desde el inicio de la descarga del  ${}^{11}\text{C}$  hasta la colección del  $[{}^{11}\text{C}]\text{PIB}$  en el vial de producto final es de aproximadamente 20 minutos.

Finalizado el marcado se procede con la purificación, que se realiza mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizando una fase móvil de ACN/H<sub>2</sub>O (60/40 v:v) y una columna C18.

### 3.2. Producción del $[{}^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$

Hay varios canales para la producción del  ${}^{18}\text{F}$ ; típicamente, la vía más utilizada es a través de la reacción nuclear  ${}^{18}\text{O}(p,n)$ , cuya energía umbral es de 2574.8 keV [31]. Usando un blanco líquido de  $[{}^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  isotópicamente enriquecido con oxígeno-18 ( ${}^{18}\text{O} \geq 97\%$ ) se obtiene  ${}^{18}\text{F}$  iónico ( $\text{F}^-$ ). La producción del anión  $[{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$  se lleva a cabo mediante irradiación con protones de 11 MeV en el Ciclotrón de la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón. El radiofármaco se produce mediante síntesis química por un método de sustitución nucleofílica en un módulo de síntesis TRACERlab FX-FN (GE Healthcare).



**Figura 8.** Diagrama de la síntesis de [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120.

La Figura 8 es un diagrama que resume el proceso de síntesis del [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120. El anión [ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$  obtenido del ciclotrón y suspendido en el agua isotópicamente enriquecida del blanco es atrapado en un cartucho de intercambio iónico (QMA: Quaternary Methyl Ammonium). Una vez atrapado en el cartucho, es eluido del mismo haciendo pasar una solución acuosa de carbonato de potasio (K $_2^+$ CO $_3^-$ ) con Kryptofix 2.2.2 (K-222) en acetonitrilo. El Kryptofix actúa como catalizador para mejorar la reactividad de los iones de fluoruro. El (K/K 222) $^+$ /[ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$ <sub>acuoso</sub> eluido se envía al vaso de reacción para evaporar completamente por destilación azeotrópica y obtener (K/K 222) $^+$ /[ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$ <sub>anhidro</sub>. Al residuo anhidro se le añade el precursor químico disuelto en acetonitrilo y se incuba (110°C, 10 min) en un vaso de reacción cerrado herméticamente, este último paso es conocido como sustitución nucleofílica y permite obtener el [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120. La purificación se realiza en dos pasos, el primero por cromatografía de líquidos (HPLC), usando una columna semi-preparativa de C18 y una fase móvil de acetonitrilo:agua en una proporción 70:30. La solución del pico de interés colectada del HPLC es diluida con agua inyectable y se atrapa en un cartucho de fase sólida. Por último, el producto es eluido del cartucho con 1 ml de etanol. La formulación final se realiza diluyendo con solución salina y añadiendo polisorbato 80 como estabilizador. La esterilización del radiofármaco se realiza por filtración mediante un filtro con una membrana de porosidad 0.22  $\mu\text{m}$ . El precursor químico [3-(6-metoxi-2-

naftil)propyl-4-metilbencenosulfonate] requerido para la síntesis química del radiofármaco [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 es proporcionado por colaboradores del proyecto en Cuba.

### 3.3. Estudios dinámicos PET

Las imágenes se obtienen en un equipo MicroPET Focus 120 (Siemens/CTI, Knoxville, TN, USA) del Laboratorio de Investigación Preclínica MicroPET de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para la obtención de los datos, se evalúan dos grupos: i) grupo de ratones transgénicos 3xTg para la enfermedad de Alzheimer ( $n = 7$ , 6 machos, 1 hembra) y ii) un control ( $n = 1$ , 1 macho). Estos ratones transgénicos contienen tres mutaciones asociadas con la EA (APP Swedish, MAPT P301L y PSEN1 M146V) y muestran patología tanto de placas A $\beta$  como de ONF. Los depósitos de placas aparecen desde los 6 meses en la corteza frontal y se vuelven más prominentes a partir de los 12 meses de edad [33]. La población de estudio con sus principales datos se presenta en la Tabla 1. Los animales fueron suministrados por el Departamento de Bioquímica y por el Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, adscritos a la Facultad de Medicina de la UNAM. Unos animales son estudiados con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120, otros con [<sup>11</sup>C]-Pittsburgh Compound B ([<sup>11</sup>C]PIB), y 3 de ellos con ambos fármacos. Las adquisiciones con los diferentes radiofármacos se realizan con al menos 3 días de separación. Se administra cada radiomarcador en un solo bolo por la vena de la cola ( $32.449 \pm 11.174$  MBq) con el animal bajo anestesia gaseosa inducida con 5% de isoflurano y mantenida durante todo el estudio entre el 1-3%. Además, se vigilan y controlan los parámetros fisiológicos (temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria, saturación de oxígeno, presión sanguínea) con un equipo Physiological Monitoring System (Harvard Apparatus). El protocolo fue aprobado por la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para las primeras adquisiciones dinámicas con el [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 se toman imágenes cerebrales durante 90 minutos desde el momento de la inyección en modo dinámico con la siguiente secuencia de *frames*: 1x60

s, 4x30 s, 4x60 s, 2x120 s, 4x300 s y 6x600 s, durante el primer minuto se inyecta el radiofármaco. Otros estudios dinámicos sólo se realizan durante 30 minutos de acuerdo con los *frames*: 4x30 s, 3x60 s, 5x180 s y 2x300 s. La razón por la cual se modificó la secuencia de frames en algunos estudios será discutida en el siguiente capítulo.

**Tabla 1.** Características de la población de estudio (TG = transgénico, WT = wild type, M = macho, H = hembra; \* indica que es el mismo animal).

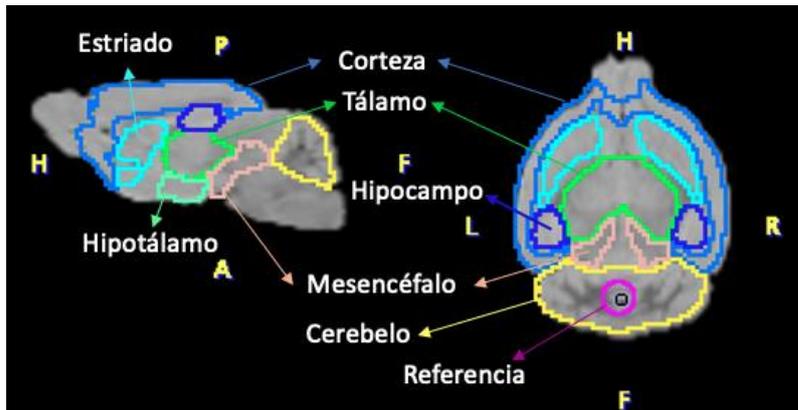
Animal	Etiqueta	Sexo	Peso (g)	Edad (meses)
1	WT	M	35.20	8
2	TG1	M	34.97	8
3	TG2	M	34.40	8
4	TG5*	H	31.36	12
5	TG8	M	36.00	14
6	TG9	M	31.00	13
7	TG10	M	30.70	14
8	TG11	M	29.45	15
9	TG5*	H	29.28	15
<b>Promedio ± SD</b>			32.9±2.5	-

Las imágenes cerebrales adquiridas con el [<sup>11</sup>C]PIB se obtienen durante una hora, desde el momento de la inyección en modo dinámico con los siguientes frames: 1x10 s, 4x30 s, 3x60 s, 5x180s y 4x600 s, los primeros 10 segundos son para la inyección del radiofármaco. Además, antes de realizar cada uno de los estudios PET con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 se adquiere un estudio de transmisión durante 515 s con una fuente de <sup>57</sup>Co para corregir por atenuación. El estudio de transmisión no se realiza en las adquisiciones con [<sup>11</sup>C]PIB para aprovechar la máxima actividad del radiofármaco durante su corta vida media.

### 3.4. Análisis cuantitativo de las imágenes

El análisis cuantitativo de las imágenes se realiza mediante el software PMOD (v. 4.3, PMOD Technologies LLC). El programa permite utilizar sus módulos de Kinetic Modeling (PKIN) y Parametric Mapping (PXMOD) para obtener los parámetros de interés y las correspondientes imágenes paramétricas en cada caso. Después de corregir las imágenes por movimiento y suavizar con un filtro gaussiano (FWHM = 0.8

mm) es posible normalizarlas para hacer un co-registro de éstas al atlas anatómico de tomografía computarizada Ma-Benveniste-Mirrione disponible en el software [36], [37]. Lo anterior permite localizar las regiones de interés: corteza (0.14916 cm<sup>3</sup>), estriado (0.02576 cm<sup>3</sup>), tálamo (0.0282 cm<sup>3</sup>), hipocampo (0.024992 cm<sup>3</sup>), mesencéfalo (0.011768 cm<sup>3</sup>) e hipotálamo (0.011568 cm<sup>3</sup>); así como la región de referencia (una porción del cerebelo de 0.00216 cm<sup>3</sup>) que se requiere para aplicar el modelo de Logan con tejido de referencia (Figura 9).



**Figura 9.** Imagen de cerebro de rata normalizado y segmentado en base al atlas anatómico Ma-Benveniste-Mirrione de PMOD.

Del software también se pueden obtener las curvas de actividad-tiempo, los volúmenes de distribución, los potenciales de unión no desplazables para las regiones consideradas y las imágenes paramétricas en escala de potencial de unión.

### 3.5. Estadística

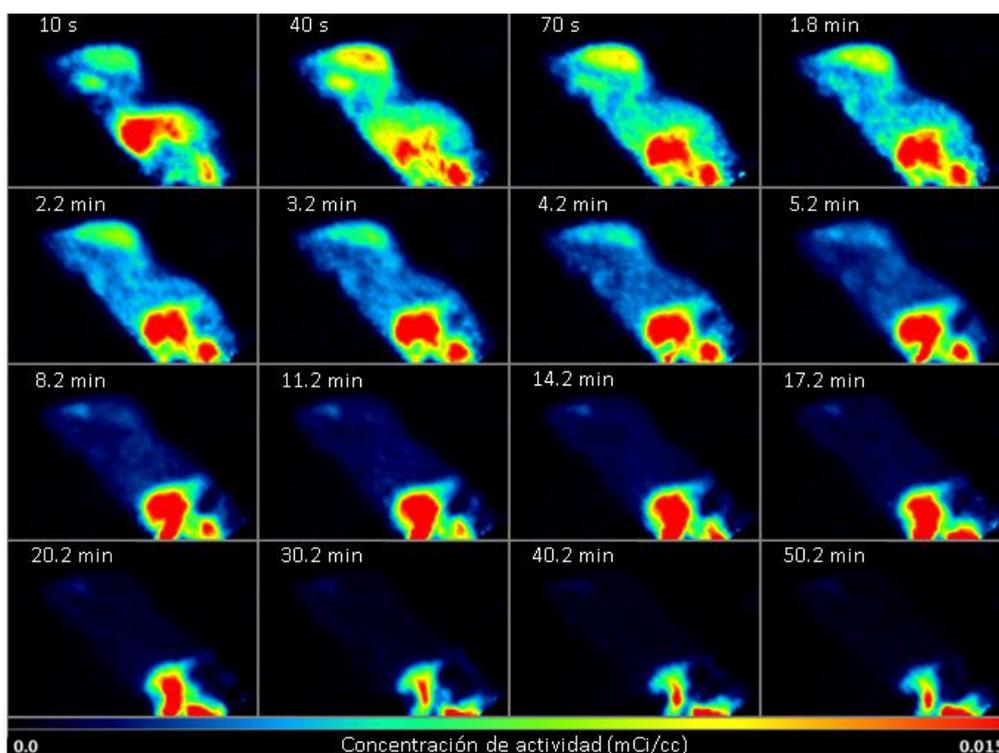
Los resultados obtenidos son presentados como media  $\pm$  desviación estándar ( $\bar{x} \pm \sigma$ ) (para casos en los que la  $n \geq 2$ ). Los datos se examinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor para comparar los valores de los volúmenes de distribución (DVR) en las VOIs de ratones WT, grupo de ratones transgénicos adultos jóvenes (8 a 11 meses) y grupo de ratones transgénicos adultos envejecidos (12 a 15 meses). El análisis se realizó para los estudios adquiridos tanto con [<sup>11</sup>C]PIB como con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellos valores-p menores a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## 4. Resultados y discusión

Los productos finales del [ $^{11}\text{C}$ ]PIB y del [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 fueron sometidos a pruebas de control de calidad, incluyendo inspección visual, medición de pH, pureza radionuclídica, pureza radioquímica y esterilidad (integridad de membrana del filtro de esterilización). Ambos radiofármacos pasaron el control de calidad, garantizándose así la identidad y pureza de los productos.

### 4.1. Estudios microPET con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB

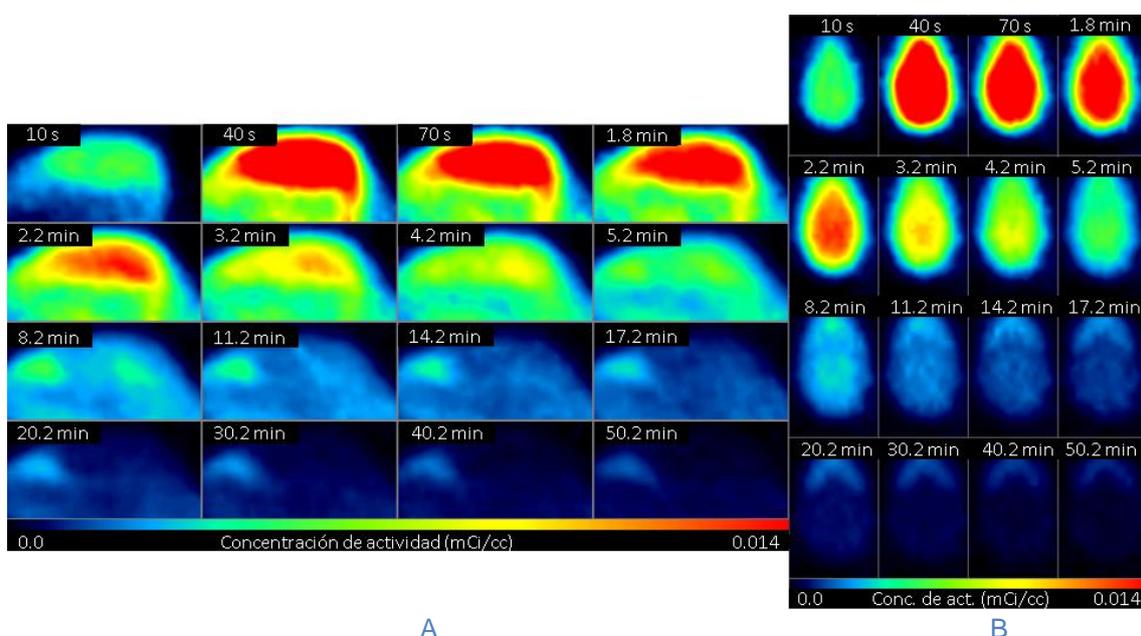
Una imagen PET típica obtenida de un ratón macho transgénico de 8 meses con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB, corregida por movimiento y con la aplicación de un filtro gaussiano de 0.8 mm se presenta en la Figura 10.



**Figura 10.** Adquisición PET de 60 min con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB para ratón 3xTG de 8 meses.

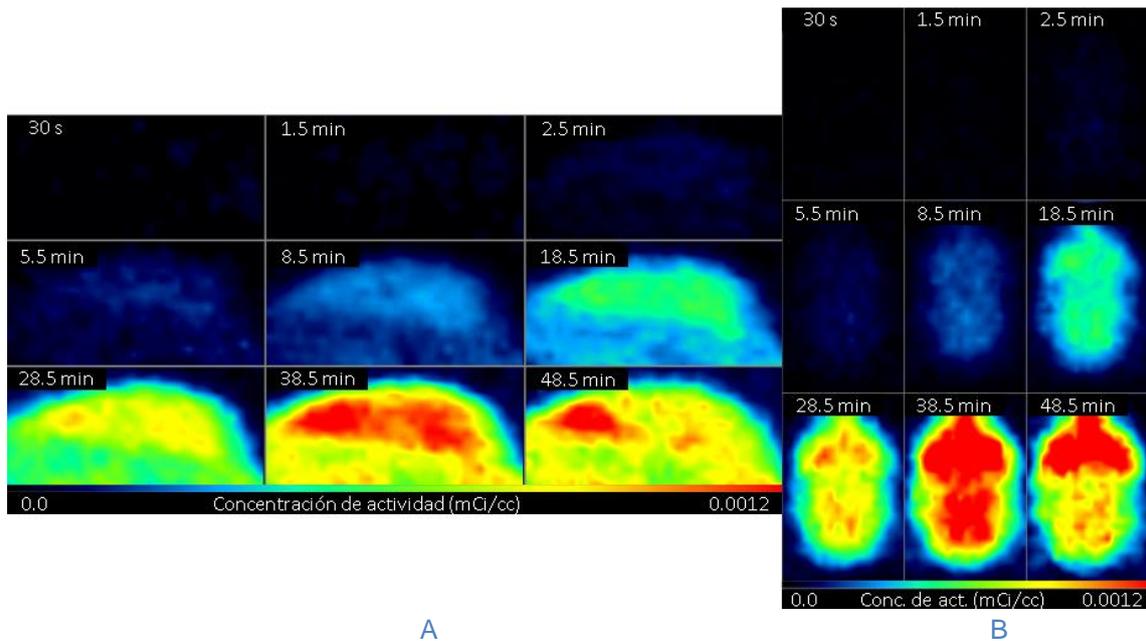
La imagen permite corroborar que el [ $^{11}\text{C}$ ]PIB cruza rápidamente la barrera hematoencefálica, alcanzándose una concentración de actividad máxima en cerebro entre los 30 segundos y el primer minuto post-inyección (p.i.). Además, hay considerable actividad en órganos como el hígado, riñones, bazo e intestinos, consistente con las vías de eliminación del radiofármaco.

El procedimiento de normalización al atlas anatómico de referencia permite una mejor visualización del cerebro de los animales, aprovechando adecuadamente el rango dinámico de las imágenes. La Figura 11 es una adquisición microPET dinámica de 60 minutos a un ratón hembra transgénico de 12 meses, la imagen está recortada a la región de interés (cerebro) y fue normalizada al atlas de interés.



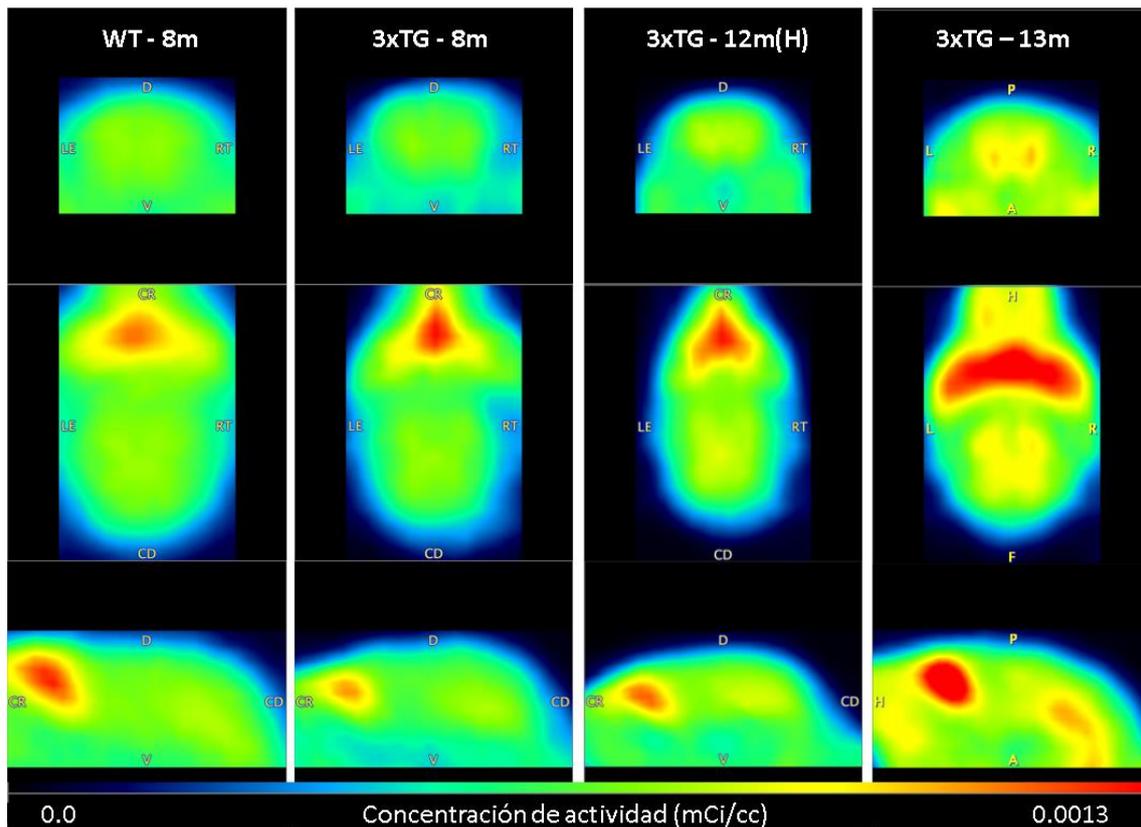
**Figura 11.** Adquisición PET de 60 min con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  para ratón 3xTG (hembra) de 12 meses. La imagen está normalizada al atlas anatómico de referencia y se muestra en su (A) corte sagital y (B) corte coronal.

Las Figura 10 y Figura 11 revelan una farmacocinética de absorción del  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  similar en términos de una rápida entrada al cerebro y su posterior eliminación, con presencia importante de actividad en el bulbo olfatorio. No obstante, para ratones de 14 meses en adelante la cinética cambia considerablemente. En animales transgénicos mayores desaparece el pico de actividad máxima registrado durante los primeros minutos p.i. y en cambio, el radiofármaco se empieza a acumular en el cerebro y bulbo olfatorio; conservando alta concentración de actividad en estos órganos, incluso en los tiempos más tardíos (Figura 12).



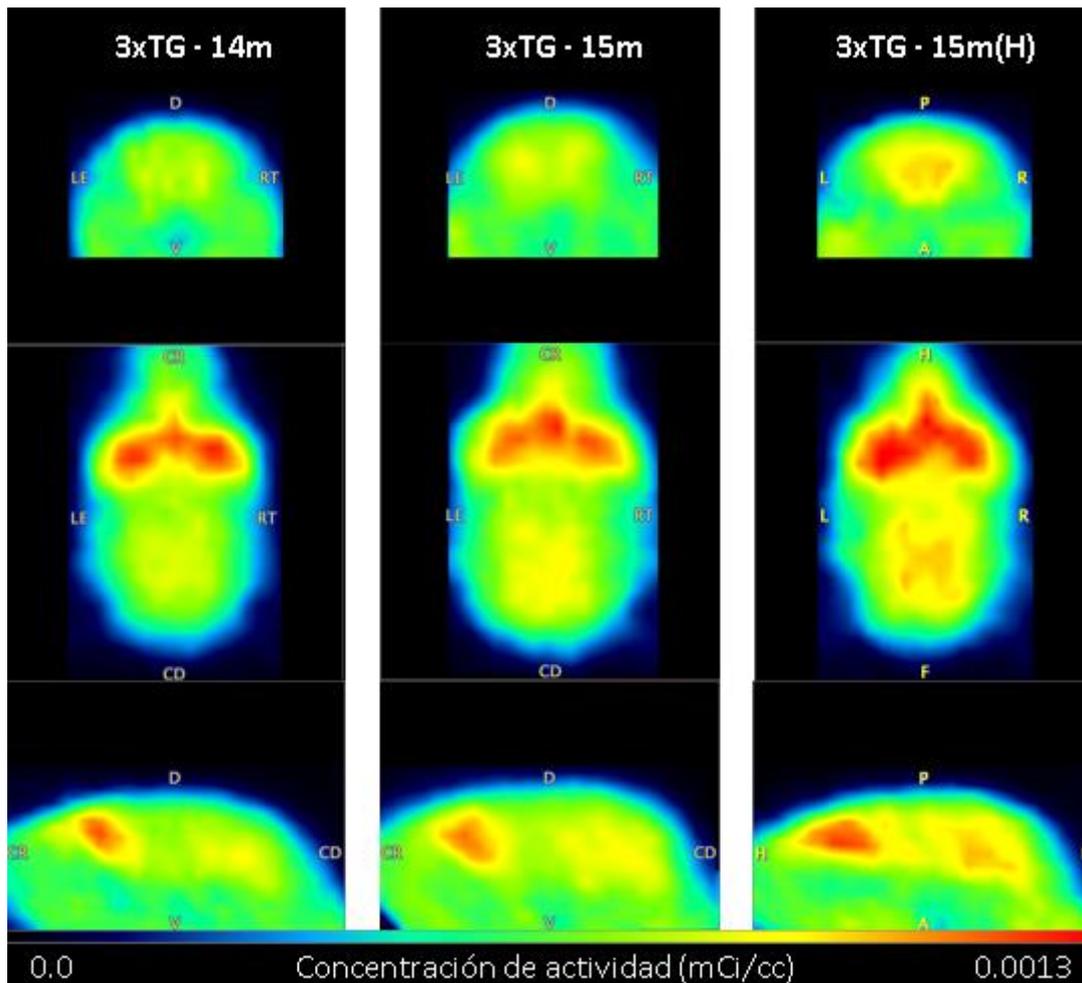
**Figura 12.** Adquisición PET de 60 min con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  para ratón 3xTG (hembra) de 15 meses. Imagen normalizada en su (A) corte sagital y (B) corte coronal.

Al comparar el control (WT, 8 meses) con los ratones transgénicos de diferentes edades es posible verificar que el  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  es captado mucho más en animales 3xTG de mayor edad. En la Figura 13 se evidencia que hay mayor concentración de actividad en regiones cerebrales de animales viejos (13 meses) en comparación con el control y el animal transgénico más joven (8 meses). Se observa captación nasal no-específica pero relevante en todos los casos.



**Figura 13.** Promedio de los últimos frames de las adquisiciones dinámicas microPET de 60 min con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  a un ratón WT y distintos ratones 3xTG de 8 a 13 meses de edad (H: hembra), mostrados en sus diferentes cortes (axial, coronal y sagital).

A pesar de la variabilidad biológica, todos los ratones transgénicos de 12 meses en adelante tienen una mayor concentración de actividad cerebral en comparación con el control y el animal más joven. Las imágenes promedio de las adquisiciones dinámicas de 60 minutos realizadas a ratones de 14 y 15 meses se presentan en la Figura 14. El ratón de 15 meses denotado con "H" es la misma hembra que se presentó en la Figura 13 pero más envejecida. Las imágenes de las hembras (a los 12 y 15 meses) revelan diferencias entre ellas, la concentración de actividad es visiblemente mayor en el cerebro de la de mayor edad. Todas las imágenes están en la misma escala y se normalizaron respecto a la actividad inyectada.

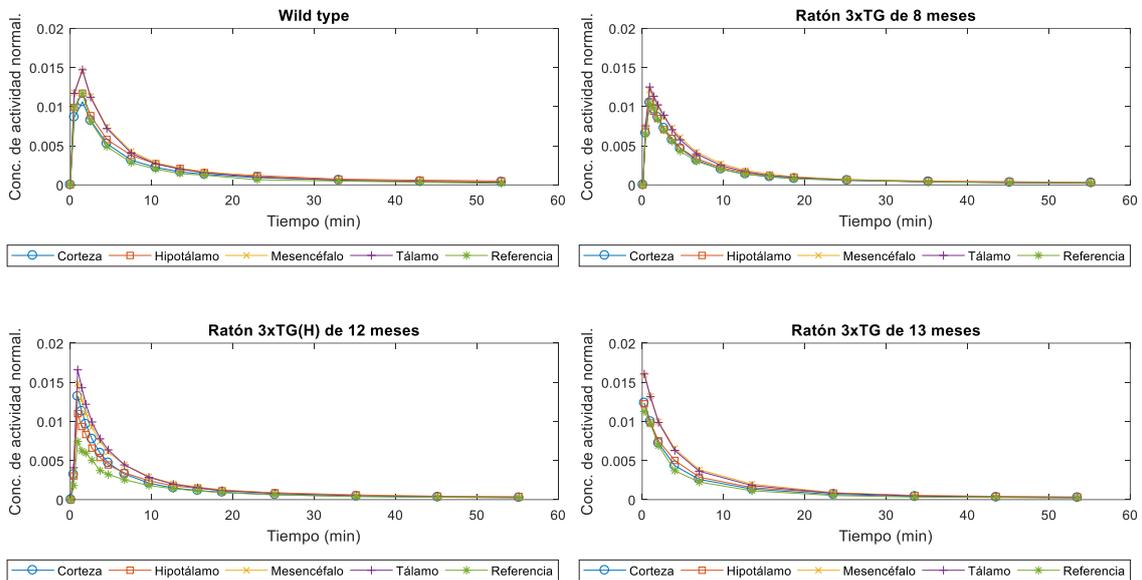


**Figura 14.** Promedio de los últimos frames de las adquisiciones dinámicas microPET de 60 min con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  a distintos ratones 3xTG de 14 a 15 meses de edad (H: hembra), mostrados en sus diferentes cortes (axial, coronal y sagital).

Estudios previos han reportado que la carga  $\beta\text{A}$  incrementa significativamente con la edad en ratones transgénicos hembra y siempre es considerablemente mayor que en ratones macho de la misma edad [32]. Las imágenes promedio de los animales transgénicos de 15 meses de distintos sexos de la Figura 14 comprueban que, en efecto, la concentración de actividad es mayor en la hembra en comparación con el macho de la misma edad.

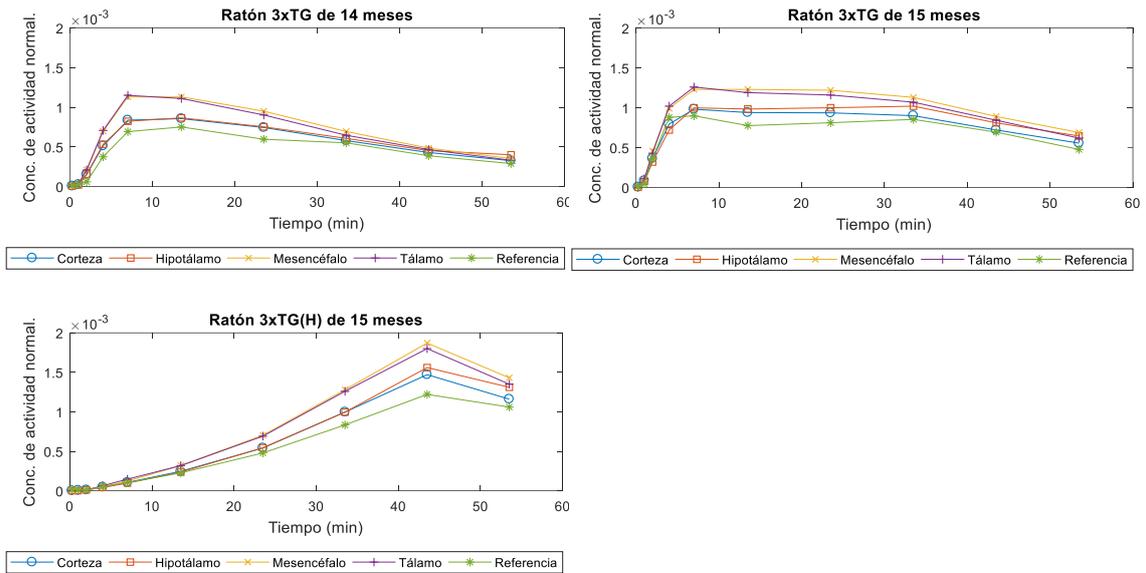
En la Figura 15 se presentan las curvas de actividad-tiempo (TAC, por sus siglas en inglés) del ratón WT y de los animales 3xTG de 8 a 13 meses de edad. Los valores se obtienen para la región de referencia y para los diferentes volúmenes de interés. Las TACs evidencian un pico de concentración de actividad máxima y posteriormente una rápida eliminación. La tendencia de las curvas es similar en los 4 animales y no muestran

diferencias relevantes entre el ratón control y los ratones 3xTG después del pico de actividad máxima.



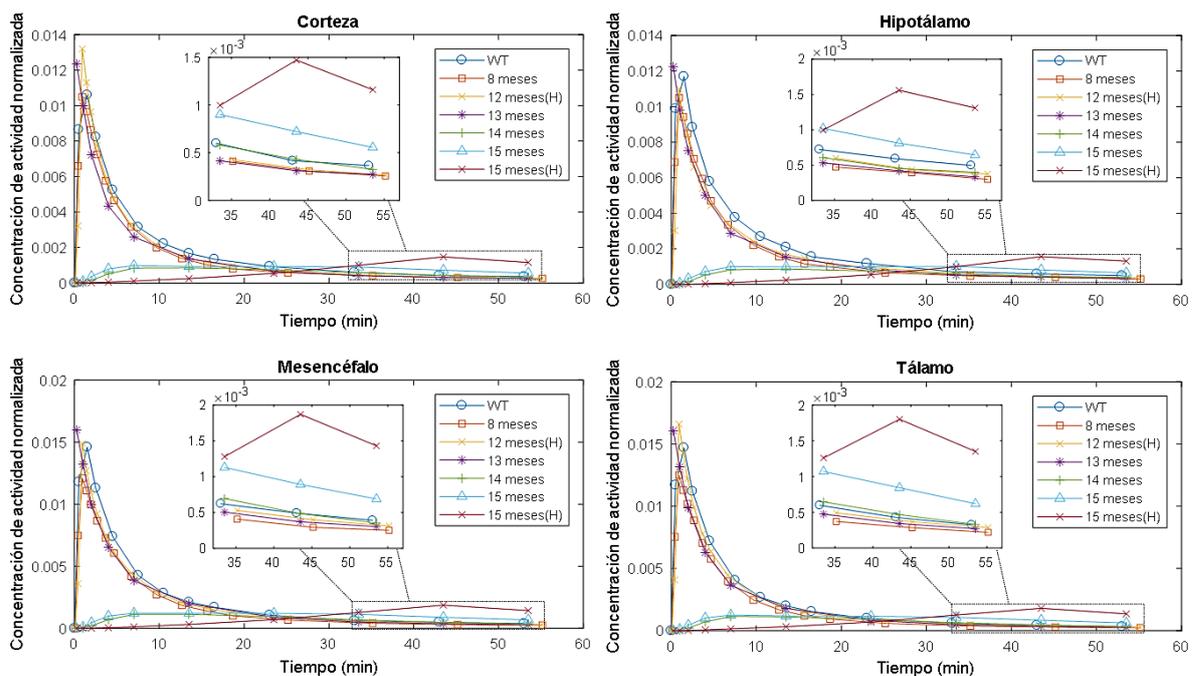
**Figura 15.** Curvas actividad-tiempo obtenidas de estudio dinámico PET con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  para VOIs y referencia de ratón WT y distintos ratones 3xTG de 8 a 13 meses de edad (H = Hembra, normal. = normalizada).

El comportamiento de las TACs cambia considerablemente en los ratones transgénicos de 14 meses en adelante. En principio, desaparece el pico de actividad máxima y se hacen visibles diferencias entre las VOIs (Figura 16). Las curvas revelan una acumulación progresiva de actividad desde el inicio de la adquisición y una lenta eliminación que se prolonga aún más en los ratones de mayor edad, llegando incluso a recorrerse el pico máximo hasta los 43 minutos p.i. en el ratón hembra de 15 meses. En todos los casos, el mesencéfalo y tálamo son las VOIs con los mayores valores de concentración de actividad. Todas las curvas presentadas son de concentración de actividad normalizada por la actividad inyectada.



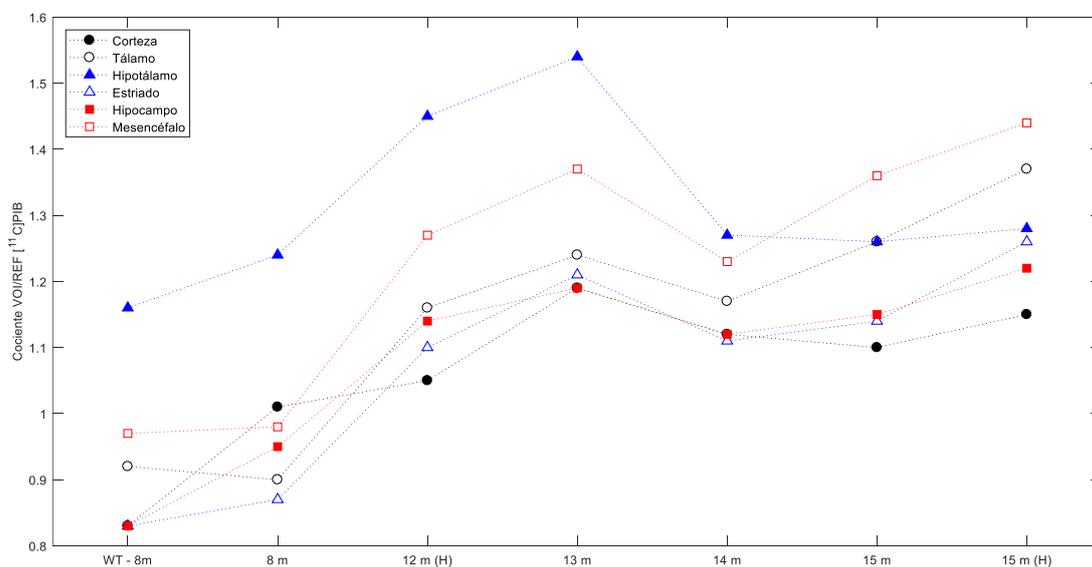
**Figura 16.** Curvas actividad-tiempo obtenidas de estudio dinámico PET con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  para VOIs y referencia de distintos ratones 3xTG de 14 y 15 meses de edad (H = Hembra).

Al comparar los valores de concentración de actividad normalizada en las VOIs de los diferentes ratones se encuentran diferencias entre los ratones más viejos (15 meses) con el WT y los animales más jóvenes (Figura 17). Después de 30 p.i. los valores de concentración de actividad en las VOIs (corteza, hipotálamo, mesencéfalo y tálamo) son mayores en los ratones de 15 meses en comparación con los demás animales. La diferencia es aún mayor en el ratón hembra (denotada con "H" en las gráficas).



**Figura 17.** TACs para corteza, hipotálamo, mesencéfalo y tálamo de un ratón WT y ratones 3xTG de diferentes edades. H = hembra.

Una medida útil para cuantificar y comparar los valores de concentración de actividad de los dos radiofármacos en las diferentes VOIs es el cociente VOI/REF, donde REF corresponde a una región con baja o nula captación. Este cociente es independiente de la actividad inyectada y de la masa de los animales. Además, se ha demostrado en estudios realizados con otros radiofármacos que puede discriminar entre sujetos sanos de enfermos [33]. En este trabajo se calculó el cociente VOI/REF para los estudios realizados a ratones con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  en el intervalo de 40 a 60 minutos. Se tuvo en consideración la corteza, tálamo, hipotálamo, estriado, hipocampo y mesencéfalo (Figura 18). A pesar de la variabilidad biológica, los valores muestran una tendencia creciente con la edad, más prevalente en tálamo y mesencéfalo. El cociente es mayor en ratones transgénicos de mayor edad (15 meses hembra; corteza: 1.15, tálamo: 1.37, hipotálamo: 1.28, estriado: 1.26, hipocampo: 1.22, mesencéfalo: 1.44) en comparación con el ratón WT (8 meses; corteza: 0.83, tálamo: 0.92, hipotálamo: 1.16, estriado: 0.83, hipocampo: 0.83, mesencéfalo: 0.97) y el ratón más joven (8 meses; corteza: 1.01, tálamo: 0.90, hipotálamo: 1.24, estriado: 0.87, hipocampo: 0.95, mesencéfalo: 0.98).



**Figura 18.** Cociente VOI/REF de estudios microPET realizados con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  para las diferentes VOIs de ratón WT y ratones 3xTG de diferentes edades.

Los datos dinámicos fueron procesados para obtener el DVR de cada una de las VOIs consideradas usando un procedimiento de dos pasos que involucran el método

simplificado de tejido de referencia y el modelo de Logan con tejido de referencia. El análisis de las imágenes se realizó considerando una porción esférica de cerebelo de 0.8 mm de radio como tejido de referencia y un  $K_2$  obtenido del software PMOD. Para obtener los DVRs se aplicó primero el SRTM, que permite calcular las constantes  $k_2'$  requeridas en el LRTM. Para cada una de las 6 VOIs consideradas se obtuvo un  $k_2'$ . El promedio de estos valores ( $\overline{k_2'}$ ) obtenidos del SRTM se utilizó como parámetro de entrada en el LRTM. Este procedimiento de 2 pasos permite una estimación más razonable de la tasa de eliminación promedio  $k_2'$  [34]. El intervalo de tiempo de ajuste considerado en los modelos fue la duración total de cada adquisición dinámica y el tiempo de equilibrio  $t^*$  se determinó para cada estudio mediante un criterio de error máximo (Max Err.). En todos los casos se estableció un error máximo del 10%, lo que significa que la desviación entre la regresión y todas las mediciones debe ser inferior al 10%. Los valores detallados de las constantes utilizadas en los modelos se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Valores de  $k_2$ ,  $\overline{k_2'}$  y  $t^*$  utilizados en el LRTM para obtener los DVRs de estudios con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB.

Animal	Edad (meses)	Sexo	Masa (g)	$k_2$ (1/min)	$\overline{k_2'}$ (1/min)	$t^*$ (min)
WT	8	M	35.20	0.35	0.43051 ± 0.06387	3.5
TG2	8	M	34.40	0.29	0.29510 ± 0.02308	4.1
TG5	12	H	31.36	0.28	0.18850 ± 0.02762	4.1
TG9	13	M	31.00	0.39	0.32995 ± 0.04289	2.5
TG10	14	M	36.00	0.34	0.20123 ± 0.03752	5.5
TG11	15	M	29.45	0.25	0.27031 ± 0.05286	5.5
TG5	15	H	29.28	0.30	0.17283 ± 0.06832	5.5

Además de los 7 estudios dinámicos realizados con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB en el Laboratorio de Investigación Preclínica microPET de la Facultad de Medicina de la UNAM, también se incluyeron en el análisis estudios realizados en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM) con el mismo modelo de ratón transgénico. Los estudios fueron suministrados por colaboradores del proyecto y permitieron, entre otras cosas, incluir datos de animales control de mayor edad. Los detalles de los animales utilizados para los estudios provenientes del CUDIM se indican en la Tabla 3. El análisis cinético de las

imágenes obtenidas en el CUDIM se realizó con los mismos parámetros del análisis realizado para las imágenes obtenidas en la UNAM.

**Tabla 3.** Características de la población para estudios con [<sup>11</sup>C]PIB realizados en el CUDIM.

Animal	Edad (meses)	Sexo	n
WT	10	M	1
WT	12	M	1
3xTG	9	M	5
3xTG	10	M	1
3xTG	11	M	1

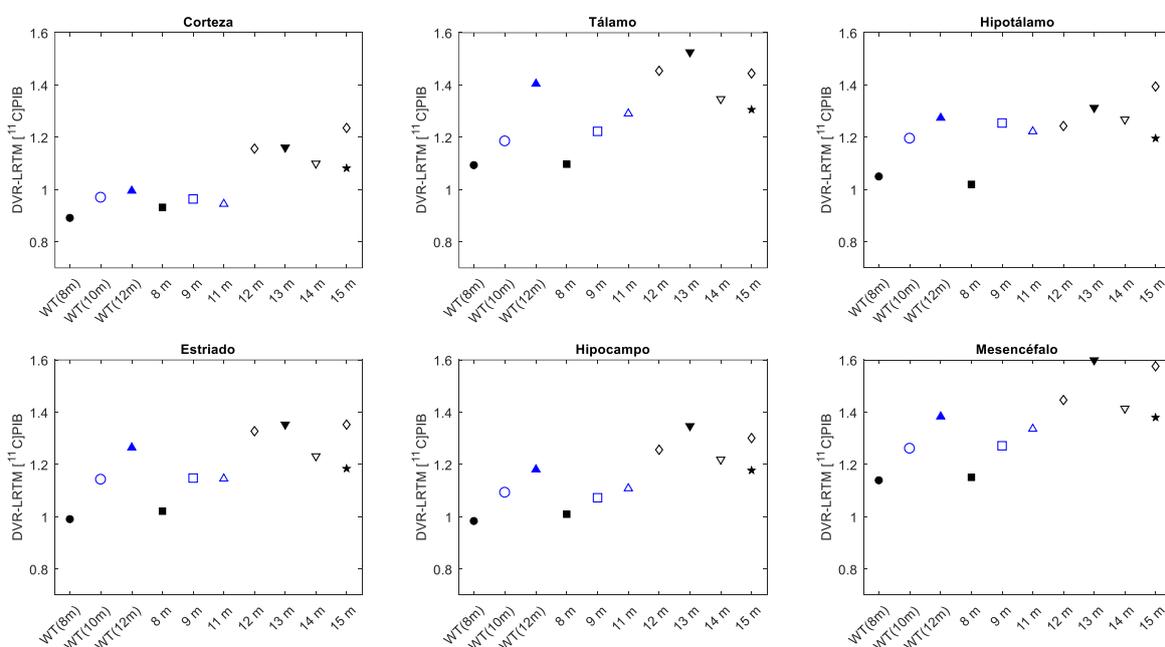
Los DVRs obtenidos son mayores en la corteza de los ratones 3xTG de mayor edad (12 a 15 meses) en comparación con los valores de los animales más jóvenes (8 a 11 meses) y de los controles (WT) (Figura 19). En el grupo de ratones WT y ratones 3xTG más jóvenes los valores en corteza son de  $0.9510 \pm 0.0550$  (machos, n=3) y  $0.9468 \pm 0.0159$  (machos, n=3), respectivamente. En ratones transgénicos mayores los DVRs aumentaron a 1.1565 (12 meses, hembra, n=1), 1.1609 (13 meses, macho, n=1), 1.0995 (14 meses, macho, n=1), 1.0815 (15 meses, macho, n=1) y 1.2356 (15 meses, hembra, n=1). Aunque los valores revelan una tendencia creciente con la edad de los animales, alcanzando máximos de 1.5991 en mesencéfalo y 1.5255 en tálamo (13 meses, macho, N=1), sólo en corteza hay diferencias significativas ( $p < 0.005$ ) entre el grupo de ratones transgénicos mayores (12 a 15 meses) con los ratones WT y el grupo de ratones 3xTG más joven (8 a 11 meses) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Análisis estadístico para comparar DVRs en corteza de grupo de ratones 3xTG mayores (12 a 15 meses) con grupo WT y grupo de ratones 3xTG menores (8 a 11 meses).

Prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene)	<b>p-valor = 0.256</b> (se acepta $H_0$ , hay homogeneidad de varianzas)	
ANOVA de un factor	<b>p-valor (entre grupos) = 0.001</b> (se acepta $H_1$ , existen diferencias entre los grupos)	
Post hoc (Tukey HSD)	<b>Grupo 3xTG mayor (12 a 15 meses, n=5)</b> <b>comparado con:</b>	<b>p-valor</b>
	Grupo WT (n=3)	<b>0.002</b>
	Grupo 3xTG joven (8 a 11 meses, n=3)	<b>0.002</b>

El aumento porcentual promedio del DVR en corteza de los ratones transgénicos viejos respecto de los controles es del 20.59% y del 21.12% respecto del grupo de

ratones jóvenes. Los resultados son consistentes con lo reportado para la patología de placas en ratones 3xTG. Los depósitos extracelulares de placa  $\beta A$  aparecen a partir de los seis meses en la corteza frontal y se vuelven más concurrentes de los 12 meses en adelante [35].



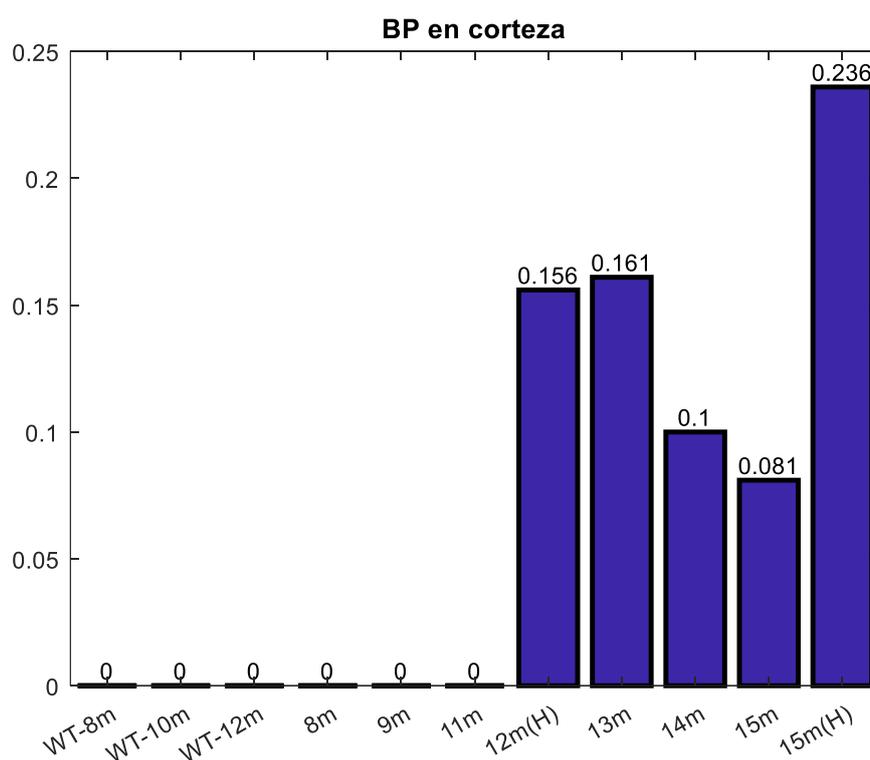
**Figura 19.** DVRs obtenidos mediante el LRTM para las diferentes VOIs de ratones WT y ratones 3xTG de diferentes edades con  $[^{11}C]PIB$ . Los símbolos en azul son de estudios realizados en CUDIM.  $\diamond$  representa un ratón hembra y su símbolo se conserva para indicar que el animal fue estudiado longitudinalmente en dos puntos temporales. WT = wild-type.

A pesar de que la normalización al atlas de referencia utilizado para la ubicación de las VOIs no permite una segmentación específica de la corteza para cuantificar únicamente en la corteza frontal y no promediar los valores en la totalidad del volumen, los DVRs permiten identificar la presencia de placas en ratones transgénicos a partir de los 12 meses de edad.

Tanto los DVRs de ratones WT como los de ratones 3xTG aumentan con la edad en tálamo, hipotálamo, estriado, hipocampo y mesencéfalo. Lo anterior indica que el  $[^{11}C]PIB$  también es captado de forma no-específica en dichas regiones, indistinto de la presencia o no de placa amiloide. La captación aumenta progresivamente con la edad de los animales, principalmente en tálamo y mesencéfalo.

Los DVRs obtenidos de los estudios realizados en la UNAM son consistentes con los cocientes VOI/REF, demostrando un incremento de los valores en todas las regiones de ratones envejecidos respecto de los valores en los controles y ratones más jóvenes.

Snellman y colaboradores [21] calcularon los DVRs en corteza de ratones hembra transgénicos APP23. Aunque el modelo de ratón transgénico utilizado en este proyecto es diferente (3xTG), tanto el APP23 como el modelo 3xTG contienen la mutación APP K670\_M671delinsNL (Swedish) [35], por lo que los resultados pueden ser comparables hasta cierto punto. En el estudio con hembras APP23 reportaron valores de 1.02 (7 meses), 0.98 (12 meses) y 1.19 (15 meses). Los DVRs calculados en corteza en este trabajo para los ratones 3xTG son de 0.93 (8 meses, macho), 1.16 (12 meses, hembra) y 1.24 (15 meses, hembra). Los valores de los animales 3xTG más envejecidos son ligeramente superiores a los DVRs de los ratones APP23 de la misma edad.

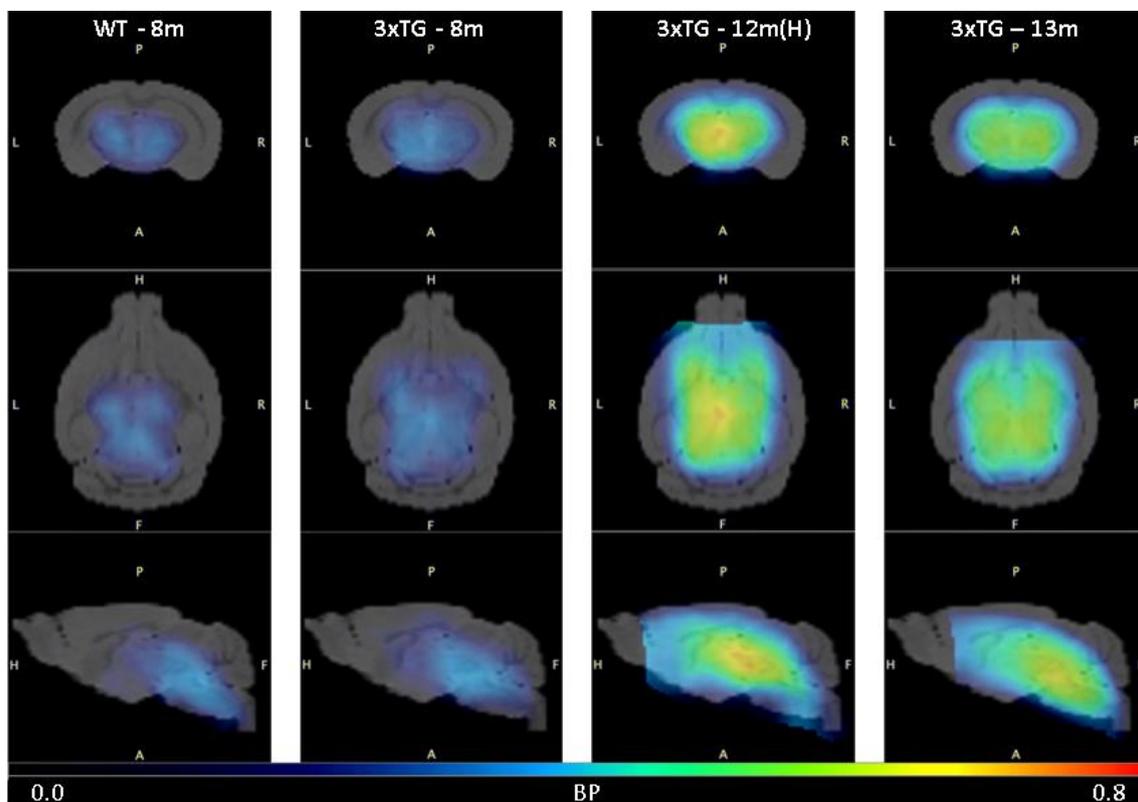


**Figura 20.** BPs en corteza obtenidos mediante el LRTM para ratón WT y ratones 3xTg de diferentes edades con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB. H = hembra.

Los resultados del análisis cinético sugieren que, en efecto, hay captación del [ $^{11}\text{C}$ ]PIB en la corteza cerebral de ratones transgénicos envejecidos, mayormente pronunciada



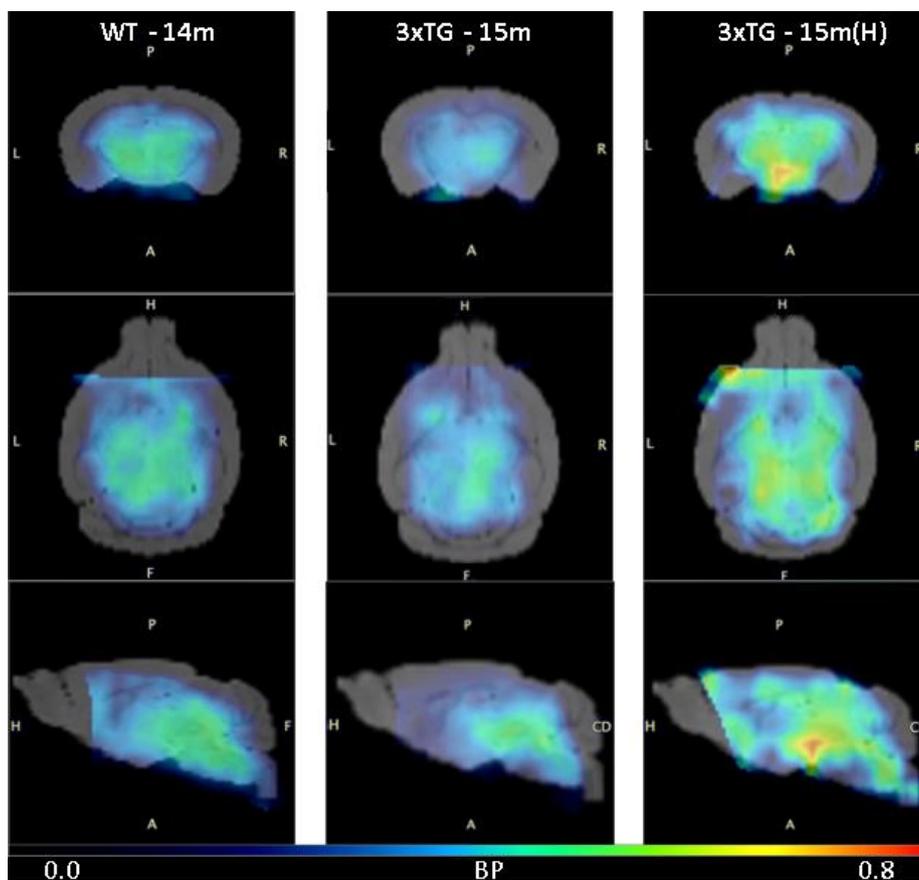
el mesencéfalo como volumen de interés, ya que fue la VOI con los mayores DVRs calculados del LRTM. La Figura 21 muestra las imágenes paramétricas del animal control y los animales transgénicos de 8, 12 y 13 meses. Los mapas en escala de BP demuestran que hay mayor captación del [ $^{11}\text{C}$ ]PIB en el cerebro de ratones envejecidos. A pesar de la variabilidad biológica, es evidente a superioridad en la captación que tienen los ratones transgénicos de mayor edad en comparación con la que tienen el control y el animal más joven. Aunque la captación se observa propagada en gran parte del cerebro, los mayores valores se concentran en tálamo y mesencéfalo, consistente con los resultados numéricos obtenidos anteriormente.



**Figura 21.** Imágenes paramétricas en escala de *BP* correspondientes a las adquisiciones PET realizadas en la UNAM con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB de ratón WT y ratones 3xTG de distintas edades, mostrados en sus diferentes cortes (axial, coronal y sagital).

Las imágenes paramétricas de los animales transgénicos más viejos estudiados también muestran captación del radiofármaco en el cerebro (Figura 22). El mapa en escala de BP de la hembra de 15 meses corrobora los resultados obtenidos del análisis

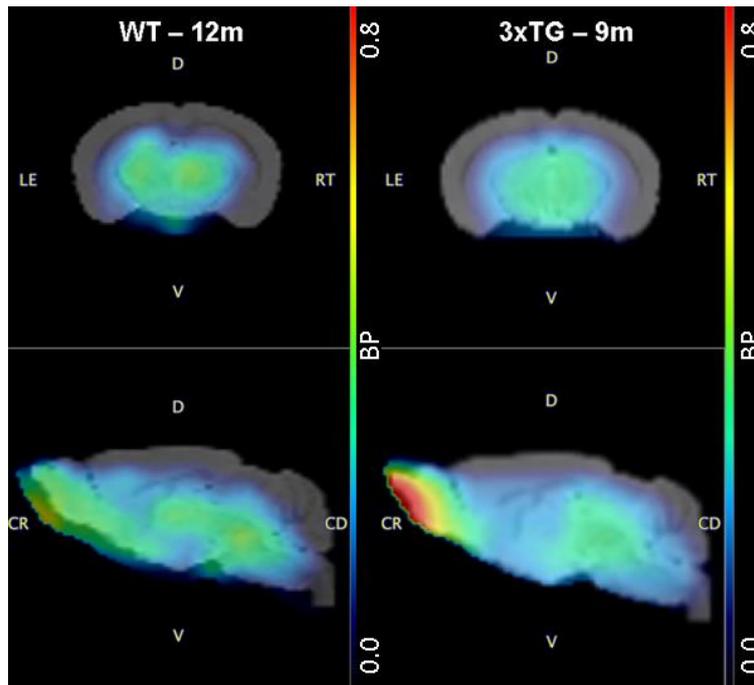
cinético. El [ $^{11}\text{C}$ ]PIB se capta en regiones cerebrales de ratones envejecidos mucho más que en ratones jóvenes.



**Figura 22.** Imágenes paramétricas en escala de *BP* correspondientes a las adquisiciones PET realizadas en la UNAM con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB de ratones 3xTg de 14 y 15 meses. H = Hembra, mostrados en sus diferentes cortes (axial, coronal y sagital).

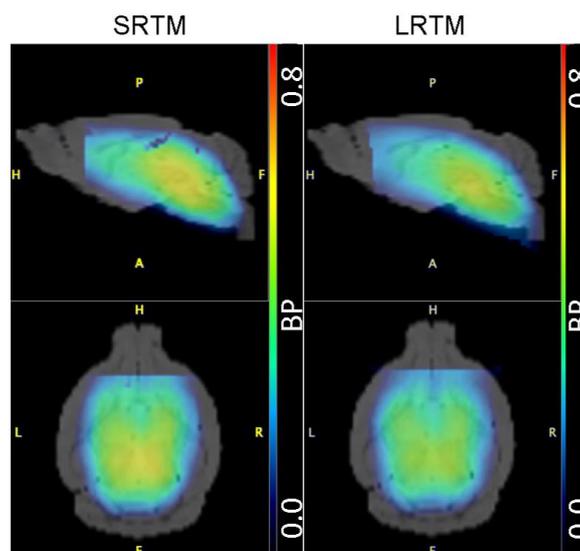
A pesar de que hay captación del radiofármaco en el cerebro, en ratones 3xTG de hasta 15 meses de edad todavía no es posible distinguir visualmente si la captación es por envejecimiento o por presencia de carga amiloide.

Si se compara el mapa paramétrico de un ratón 3xTG de 9 meses con el de un ratón WT de 12 meses (obtenidos a partir de los estudios dinámicos realizados en el CUDIM) (Figura 23) se observa captación cerebral en ambos casos. Sin embargo, la diferencia entre los DVRs de ratones transgénicos más viejos con los DVRs de los controles y de los más jóvenes sugieren la presencia de placas  $\beta\text{A}$  en la corteza cerebral de los animales 3xTG que, además, incrementa con la edad mucho más en hembras que en machos con el mismo modelo transgénico.



**Figura 23.** Imágenes paramétricas en escala de *BP* correspondientes a adquisiciones PET realizadas en el CUDIM con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB de ratón WT (12m) y ratón 3xTG (9m). Mostrados en sus cortes axial y sagital.

Todos los mapas paramétricos presentados fueron obtenidos mediante el modelo LRTM. Si se comparan las imágenes paramétricas en escala de *BP* obtenidas para el ratón 3xTG de 13 meses mediante los modelos LRTM y SRTM se encuentra un patrón de captación muy similar en ambos casos (Figura 24). Lo anterior está en coherencia con el alto coeficiente de correlación entre los DVRs calculados a partir de cada modelo.



**Figura 24.** Comparación de imágenes paramétricas obtenidas para el ratón 3xTG de 13 meses mediante los modelos SRTM (izquierda) y LRTM (derecha). Mostrados en sus cortes sagital y coronal.

#### 4.2. Estudios microPET con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120

Una imagen PET típica obtenida de un ratón macho transgénico de 8 meses con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120, corregida por movimiento y con la aplicación de un filtro gaussiano de 0.8 mm se presenta en la Figura 25.

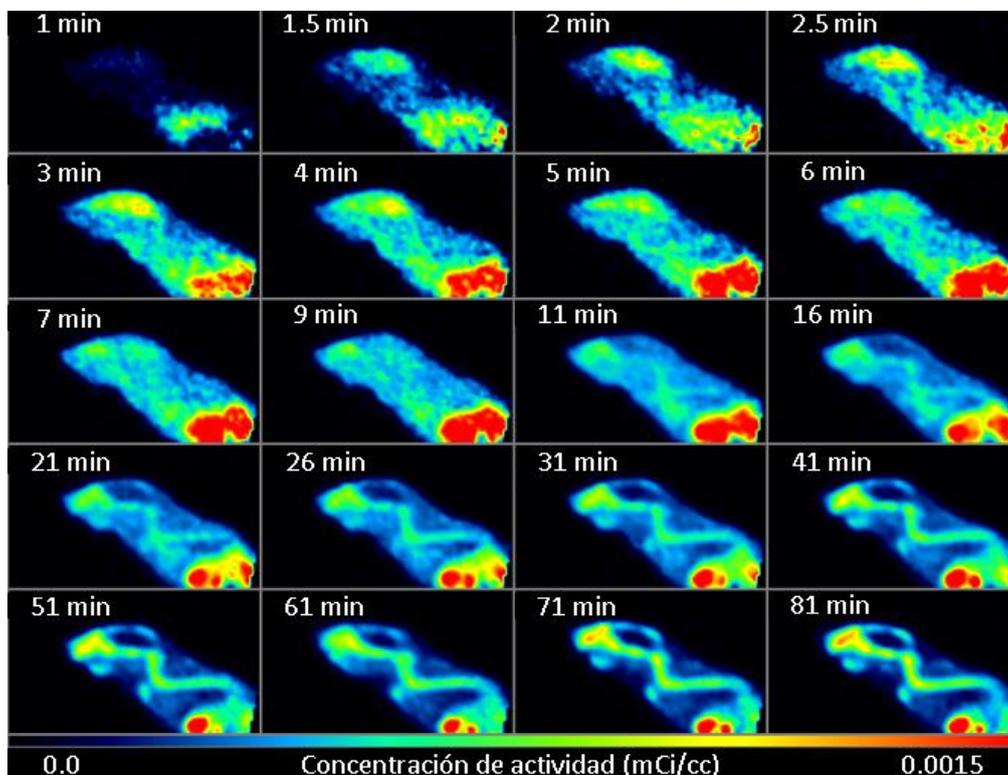
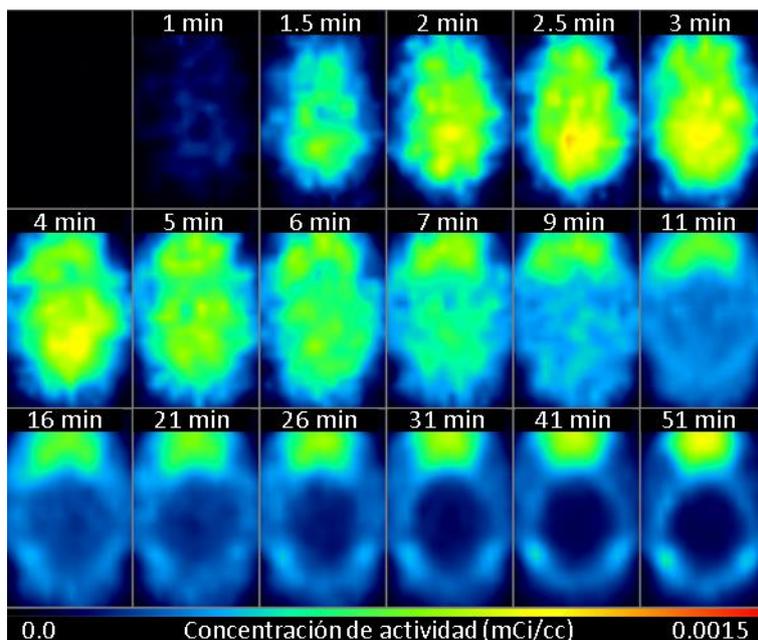


Figura 25. Adquisición PET de 90 minutos con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 de ratón 3xTG de 8 meses.

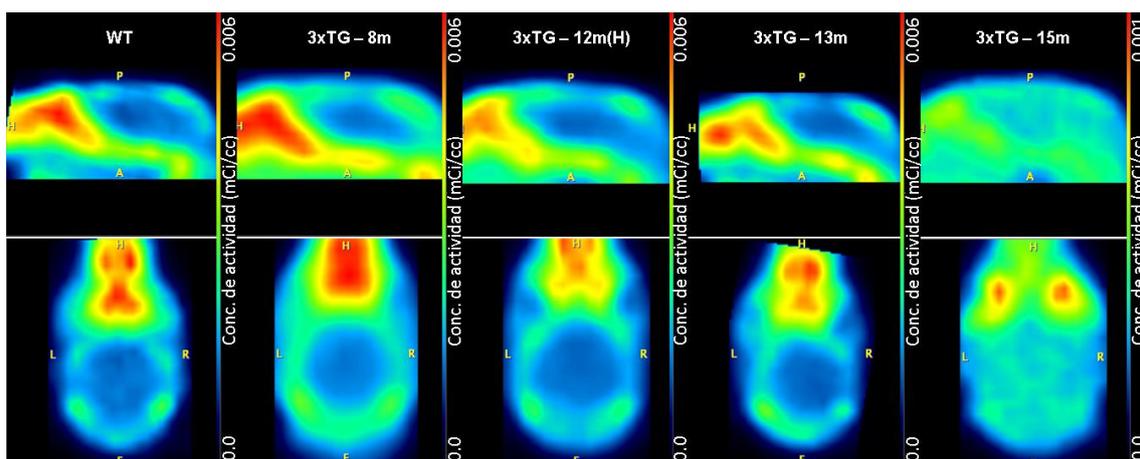
La imagen revela un pico de concentración de actividad en el cerebro antes de los 5 minutos p.i. y un rápido aclaramiento. Además, es inmediatamente destacable la alta concentración de actividad que se observa en hueso, mejor diferenciada a partir del minuto 16 p.i. En el trabajo de Rivera-Marrero et al. [10] reportaron alta captación en hueso atribuible a una defluoración *in vivo* del radiofármaco. Más adelante se demostrará que no necesariamente es el flúor libre el responsable de dicha captación.

Un corte coronal de la imagen dinámica recortada y normalizada al atlas anatómico de referencia (M. Mirrione) confirma la entrada del radiofármaco al cerebro, su posterior aclaramiento y finalmente la captación en hueso (Figura 26).



**Figura 26.** Adquisición PET con [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 de ratón 3xTG de 8 meses (corte coronal).

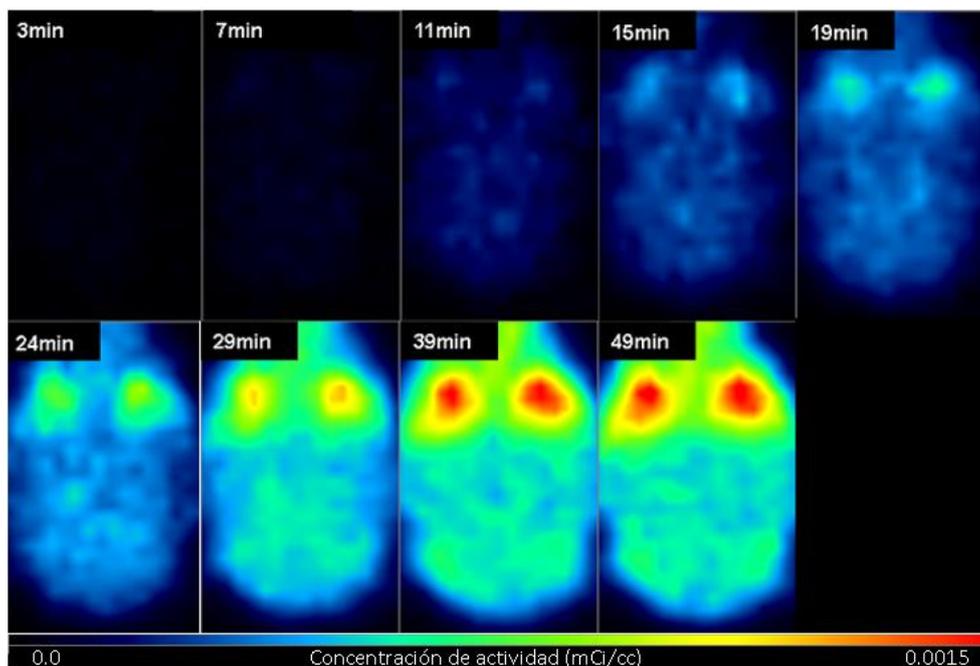
Análogo a lo que ocurría con el [ $^{11}\text{C}$ ]PIB, en ratones más viejos la cinética del [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 parece variar. En la Figura 27 se muestran las imágenes promedio de los últimos frames para los distintos estudios dinámicos realizados a los animales. Como se anticipaba, la concentración de actividad es predominante en hueso en todos los ratones, excepto en el ratón 3xTG de 15 meses. Aunque no hay actividad considerable en el cerebro del animal, la concentración en hueso se reduce y el aclarado en el interior del cerebro no es tan evidente como en los animales más jóvenes.



**Figura 27.** Promedio de frames de las adquisiciones dinámicas microPET con [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 a un ratón WT y distintos ratones 3xTG de 8 a 15 meses de edad. H = hembra, mostrados en sus cortes sagital y coronal.

Un corte coronal del estudio dinámico PET realizado al ratón 3xTG de 15 meses permite observar el cambio en la cinética de absorción que tiene el fármaco (Figura 28).

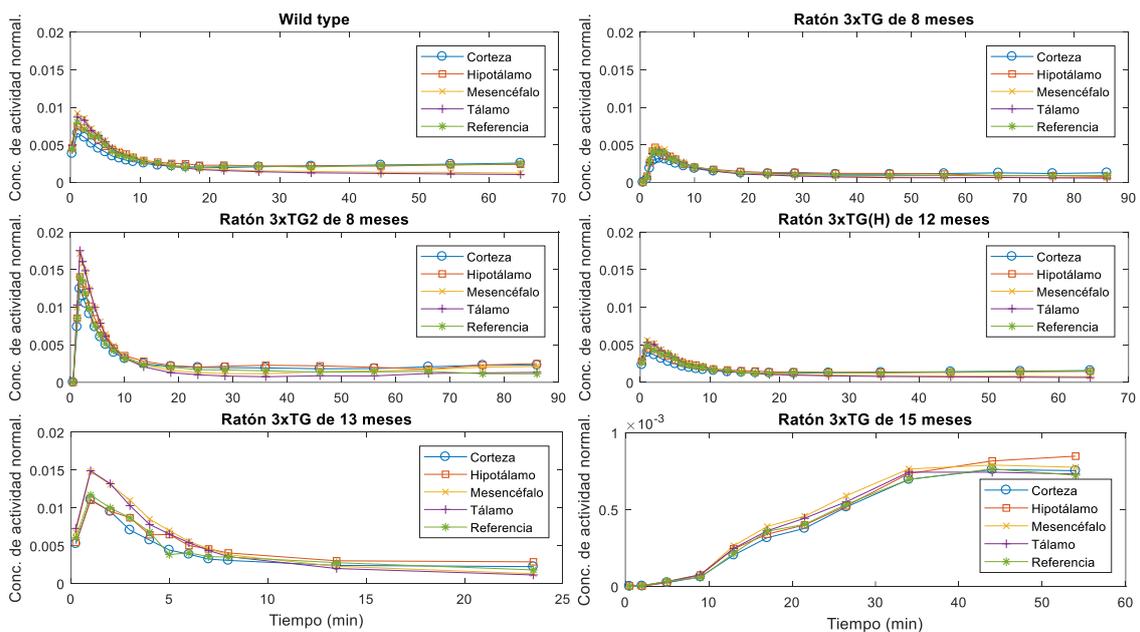
Similar a los resultados obtenidos con el [ $^{11}\text{C}$ ]PIB en ratones envejecidos, desaparece también con el [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 el pico de actividad máxima que se observaba en los animales más jóvenes durante los primeros minutos p.i. y hay una acumulación progresiva de concentración de actividad en cerebro y bulbo olfatorio. Sin embargo, pese a los cambios en la cinética, no se observa captación diferenciada del radiofármaco en ninguna región del cerebro del ratón transgénico envejecido.



**Figura 28.** Adquisición PET con [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 de ratona 3xTG de 15 meses. Corte coronal.

Las TACs correspondientes las VOIs consideradas muestran el pico de concentración de actividad máxima esperado para el animal control y para los 3xTG más jóvenes (Figura 29). La tendencia de las curvas es similar en lo que respecta a la presencia del máximo de actividad y su posterior eliminación. Sin embargo, el máximo del pico de actividad varía considerablemente entre los distintos animales. Para el ratón de 15 meses el comportamiento de la TAC cambia sustancialmente. Desaparece el pico y se aprecia una aparente acumulación de actividad en todas las VOIs del cerebro hasta alcanzar cierto “equilibrio” que se refleja en la meseta de los tiempos tardíos de la curva. El cambio en las tendencias de las TACs para los ratones más envejecidos ya se había notado anteriormente en los estudios con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB de ratones de 14 meses en adelante. En el trabajo de Rivera-Marrero et al. [10] reportaron diferencias entre la cinética de

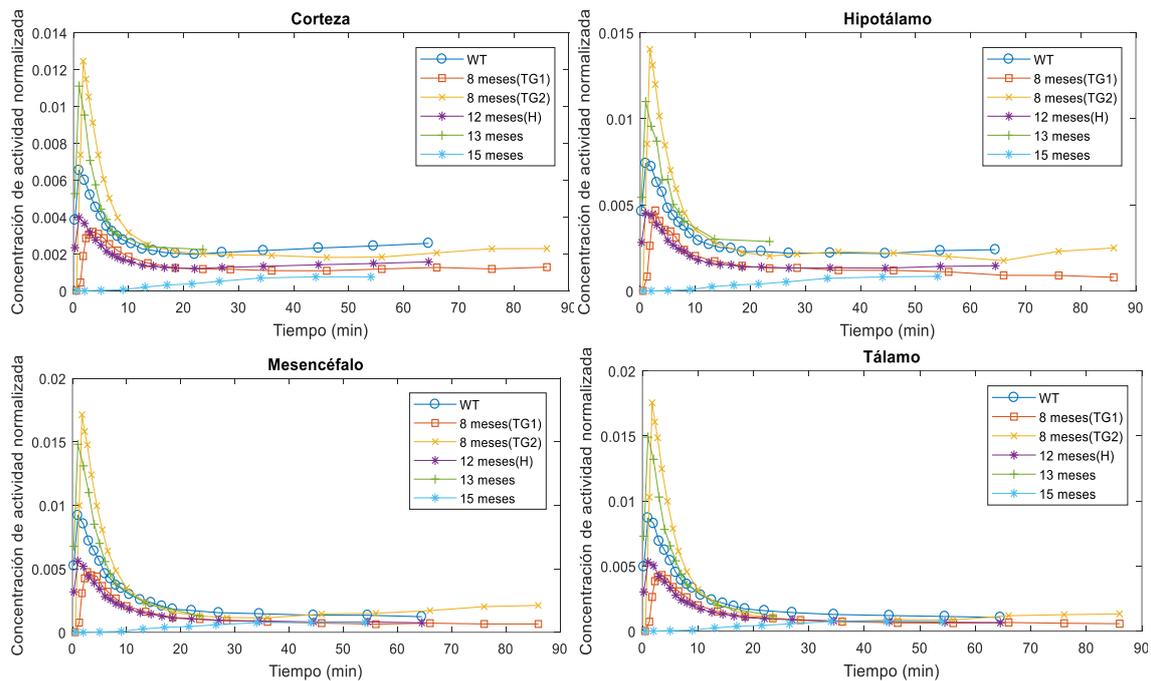
absorción de los ratones transgénicos estudiados y la de los controles. En sus resultados evidenciaron una cinética de absorción más lenta en animales APP<sup>sw</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup> de 12 meses, con un pico entre los 23-25 p.i. y un aclaramiento menos pronunciado en comparación con los controles. Sin embargo, su trabajo no evaluó diferencias en la cinética debidas a la edad de los animales y sugieren que el cambio que tienen las TACs respecto de los controles puede estar relacionado con la unión específica del marcador a las placas del cerebro. Nuestros resultados demuestran que el cambio en la cinética de absorción no es debido a captación específica del fármaco en el cerebro de animales con placas  $\beta$ A sino a algún proceso asociado con el envejecimiento de los ratones. Todas las curvas fueron obtenidas normalizando la concentración de actividad por la actividad inyectada.



**Figura 29.** TACs de las VOIs para ratón control y ratones 3xTg de 8, 12, 13 y 15 meses obtenidas de estudios PET con  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$ .

Las TACs de los diferentes animales muestran un pico de actividad máxima en el cerebro antes de los 5 minutos p.i. (excepto para el ratón de 15 meses). La diferencia entre los valores de la corteza e hipotálamo con respecto a las demás VOIs puede ser debido a un efecto de desbordamiento (spillover) provocado por la intensa señal exterior proveniente del hueso. El efecto de desbordamiento está relacionado con el efecto parcial de volumen y se ha demostrado que puede llegar a producir sobreestimaciones

en valores obtenidos para las VOIs [36]. Al comparar las TACs de cada VOI para los diferentes animales, las mayores diferencias se encuentran en corteza e hipotálamo, sin embargo, dado que estas regiones tienen porciones colindantes con la parte más exterior del cerebro, es probable que sus valores estén sesgados por los altos niveles de concentración de actividad en hueso. Por lo anterior, también parece que son estas VOIs las que presentan las mayores diferencias entre las TACs para los distintos animales (Figura 30).



**Figura 30.** TACs para corteza, hipotálamo, mesencéfalo y tálamo de un ratón WT y ratones 3xTG de diferentes edades.

Las curvas de actividad-tiempo revelan diferencias en las concentraciones de actividad de las VOIs principalmente durante los primeros frames, siendo el mesencéfalo y el tálamo los que alcanzan los valores más altos. Lo anterior no implica que haya captación específica en dichas regiones. Debido a que la diferencia ocurre durante los primeros minutos p.i., lo más probable es que el fármaco entre al cerebro y se distribuya de forma preferente en algunas regiones para después ser eliminado sin captarse específicamente. Además, como se advirtió antes, la señal exterior proveniente del hueso es tan intensa que incluso podría influir sobre los valores de las VOIs al interior del cerebro.

Con el propósito de filtrar al máximo posible la intensa señal externa al cerebro, el análisis cinético se realizó considerando la primera parte de cada estudio dinámico en el ratón WT y en ratones los transgénicos de 8, 12 y 13 meses de edad. Los datos fueron procesados para obtener el DVR de cada VOI usando el método de Logan con una porción de cerebelo de 0.8 mm de radio como tejido de referencia. Las constantes  $K_2'$  se obtuvieron para cada estudio del promedio de los valores para cada VOI, tal y como se realizó en el análisis con el [ $^{11}\text{C}$ ]PIB. El  $t^*$  fue determinado a partir del criterio de error máximo fijando un límite máximo de error del 10%. Los valores detallados utilizados para el análisis en cada estudio se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Valores de  $k_2$ ,  $\overline{k_2'}$  y  $t^*$  utilizados en el LRTM para obtener los DVRs de estudios con [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120.

Animal	Edad (meses)	Sexo	Masa (g)	$k_2$ (1/min)	$\overline{k_2'}$ (1/min)	$t^*$ (min)
WT	8	M	35.20	0.09	$0.10681 \pm 0.02513$	2.5
TG1	8	M	34.97	0.10	$0.11303 \pm 0.01891$	2.5
TG2	8	M	34.40	0.09	$0.10720 \pm 0.01558$	4.0
TG5	12	H	31.36	0.06	$0.07090 \pm 0.01024$	2.5
TG9	13	M	31.00	0.22	$0.28742 \pm 0.05543$	0.5
TG13	15	M	26.00	0.22	$0.25179 \pm 0.01206$	15

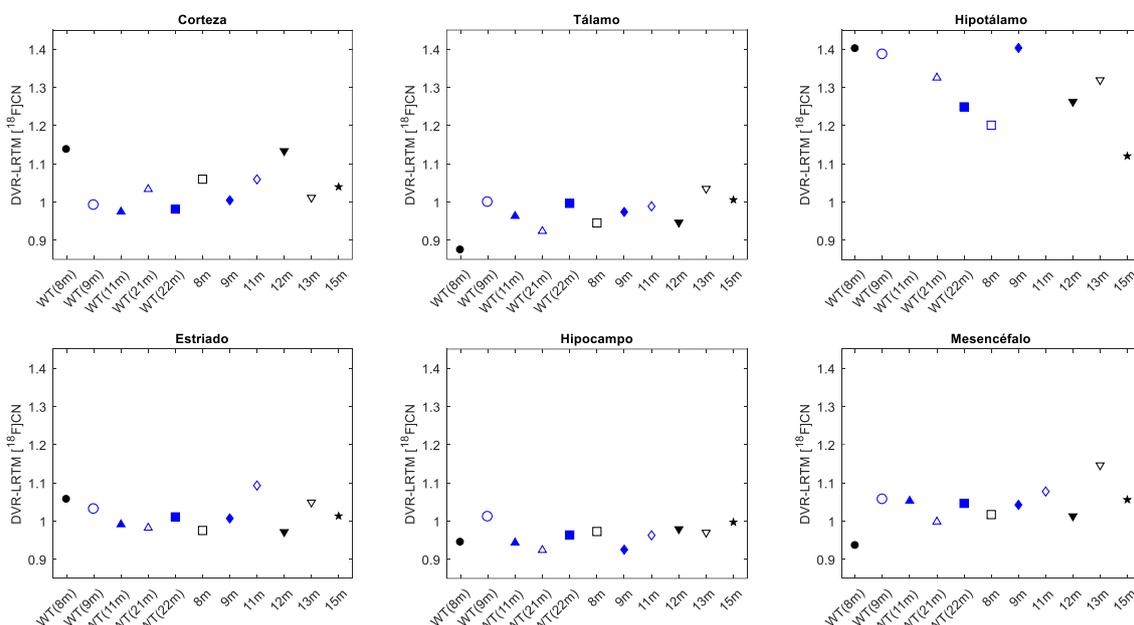
Además de los 6 estudios realizados en la UNAM, también se incluyeron en el análisis 13 estudios realizados en el CUDIM con animales 3xTG de hasta 12 meses de edad y animales WT de hasta 22 meses. Los detalles se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Características de la población para estudios con [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 realizados en el CUDIM.

Animal	Edad (meses)	Sexo	$n$
WT	9	M	1
WT	11	M	1
WT	21	M	1
WT	22	M	3
3xTG	9	M	5
3xTG	11	M	2

Los resultados descartan la captación específica y diferenciada en regiones cerebrales de ratones transgénicos de hasta 15 meses de edad. Los DVRs en la corteza no mostraron incremento significativo. Los valores calculados fueron de  $1.02 \pm 0.07$  para

controles (n=7),  $1.06 \pm 0.07$  a los 8 meses (n=2),  $1.00 \pm 0.06$  a los 9 meses (n=6),  $1.06 \pm 0.08$  a los 11 meses (n=2), 1.13 a los 12 meses (n=1), 1.01 a los 13 meses (n=1) y 1.04 a los 12 meses (n=1). En el mesencéfalo tampoco hubo aumento significativo, los DVRs incrementaron de  $1.02 \pm 0.08$  en los controles (n=7) a  $1.07 \pm 0.07$  en el grupo de animales 3xTG mayores (n=3, se incluyen los ratones de 12, 13 y 15 meses en este grupo). Para el caso del tálamo, el DVR pasó de  $0.95 \pm 0.05$  en el grupo WT a  $1.00 \pm 0.05$  en el grupo transgénico más envejecido (Figura 31). Los incrementos observados no son estadísticamente significativos en ninguna VOI.



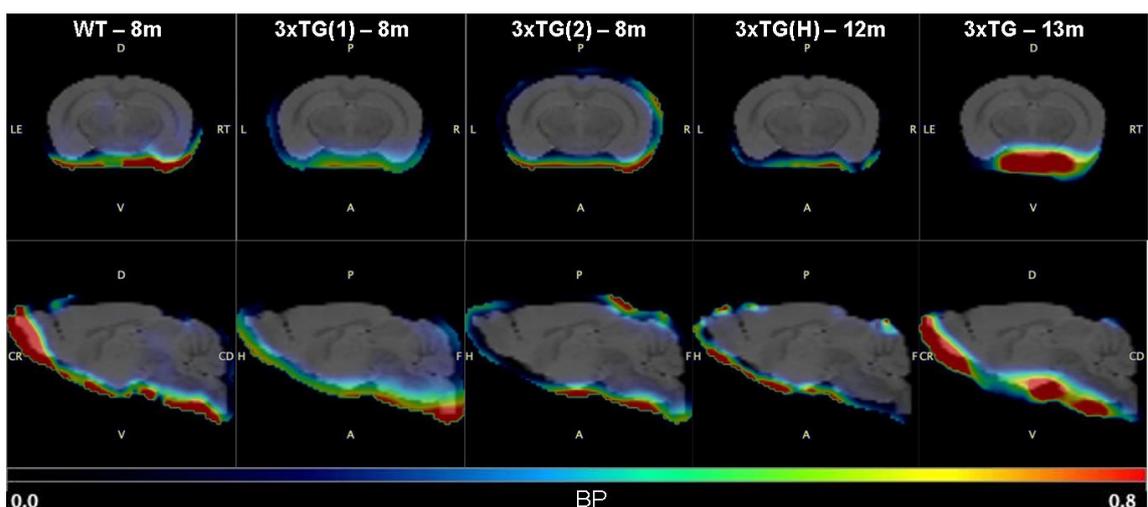
**Figura 31.** DVRs obtenidos mediante el LRTM para las diferentes VOIs de ratones WT y ratones 3xTG de diferentes edades con  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$ . Los símbolos en azul son de estudios realizados en el CUDIM. WT = wild-type.

Los resultados obtenidos de los DVRs mediante el LRTM y por el SRTM pueden ser comparados para evaluar la correlación entre ambos valores (Tabla 8). El coeficiente de correlación entre los datos ( $r = 0.880$ ) demuestra una fuerte correlación positiva entre los resultados y valida nuevamente la objetividad de los parámetros cuantitativos en la evaluación del proceso fisiológico. Únicamente se consideran los resultados del análisis realizado a los estudios adquiridos en la UNAM.

**Tabla 8.** BPs obtenidos mediante SRTM y DVRs obtenidos con SRTM y LRTM para cada animal en cada VOI.

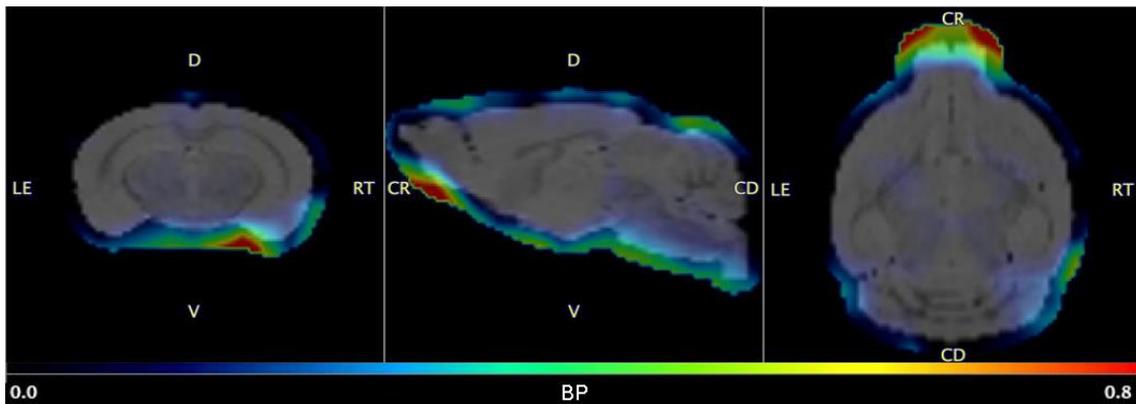
	WT			3xTG(1) de 8 meses			3xTG(2) de 8 meses		
	BP SRTM	DVR SRTM	DVR LRTM	BP SRTM	DVR SRTM	DVR LRTM	BP (SRTM)	DVR SRTM	DVR LRTM
Corteza	0.18068	1.181	1.137561	0	1.000	1.011165	0	1.000	1.108323
Tálamo	0	1.000	0.874721	0	1.000	0.951724	0.014626	1.015	0.938995
Hipotálamo	0.372237	1.372	1.401291	0.086762	1.087	1.142798	0.087456	1.087	1.259241
Estriado	0.045423	1.045	1.057021	0.017935	1.018	0.989173	0	1.000	0.961554
Hipocampo	0	1.000	0.944812	0	1.000	0.977191	0	1.000	0.968229
Mesencéfalo	0.000	1.000	0.936162	0.032878	1.033	1.012584	0.090145	1.090	1.021404
	Coeficiente de correlación			Coeficiente de correlación			Coeficiente de correlación		
	<b>0.977</b>			<b>0.937</b>			<b>0.571</b>		
	3xTG de 12 meses(H)			3xTG de 13 meses			3xTG de 15 meses		
	BP SRTM	DVR SRTM	DVR LRTM	BP SRTM	DVR SRTM	DVR LRTM	BP (SRTM)	DVR SRTM	DVR LRTM
Corteza	0	1.000	1.133618	0	1.000	1.011469	0.047841	1.048	1.039694
Tálamo	0	1.000	0.946519	0	1.000	1.034930	0	1.000	1.005806
Hipotálamo	0.149902	1.150	1.262301	0.163648	1.164	1.319151	0.162277	1.162	1.120292
Estriado	0	1.000	0.971640	0	1.000	1.048967	0.016918	1.017	1.013177
Hipocampo	0	1.000	0.979165	0	1.000	0.969984	0	1.000	0.997119
Mesencéfalo	0	1.000	1.012971	0.059862	1.060	1.146226	0.04231	1.042	1.055912
	Coeficiente de correlación			Coeficiente de correlación			Coeficiente de correlación		
	<b>0.843</b>			<b>0.976</b>			<b>0.976</b>		
	Coeficiente de correlación promedio								
	<b>0.880</b>								

Los mapas de potencial de unión correspondientes a los distintos animales son los que se muestran en la Figura 32. Las imágenes paramétricas se obtuvieron mediante el LRTM utilizando la misma región de referencia (porción de cerebelo) y el mesencéfalo como volumen de interés. Los resultados comprueban que no hay captación específica en regiones cerebrales de animales transgénicos. Pese a aplicar una máscara del cerebro durante el análisis cinético para filtrar señal exterior al cerebro, todavía en las imágenes se alcanzan a notar regiones con captación específica externas y que corresponden a hueso y/o bulbo olfatorio de los animales.



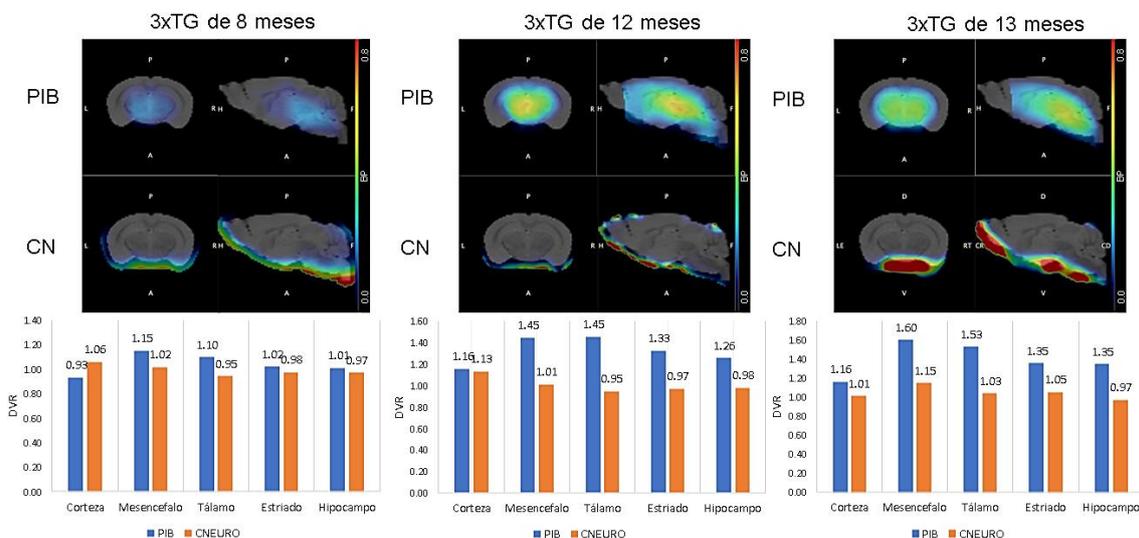
**Figura 32.** Imágenes paramétricas en escala de BP correspondientes a las adquisiciones PET realizadas en la UNAM con  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  de ratón WT y ratones 3xTG de distintas edades, mostradas en sus cortes axial y sagital.

Aunque la imagen promedio de los últimos frames para el ratón 3xTG de 15 meses cambió en comparación con las de los demás animales, la imagen paramétrica (Figura 33) descartó captación específica en el cerebro del animal. Los mapas paramétricos en escala de BP indican que el radiofármaco no es captado de forma específica en zonas cerebrales de ratones 3xTG de hasta 15 meses de edad, en lugar de ello, hay considerable captación en hueso y en bulbo olfatorio.



**Figura 33.** Imagen paramétrica en escala de BP correspondiente a la adquisición microPET con  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  de ratón 3xTG de 15 meses. Mostrada en sus cortes axial, sagital y coronal.

Si se comparan los estudios realizados con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  y  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  a los mismos ratones, se evidencia la diferencia en la captación que tienen cada uno de los radiofármacos (Figura 34). El  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  es captado en el cerebro de ratones en todos los casos, aumentando su concentración con la edad de los animales. Por su parte, el  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  solo es captado en hueso y bulbo olfatorio.



**Figura 34.** Comparación de imágenes paramétricas y DVRs de ratones 3xTG estudiados con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  y  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$ . Las imágenes se muestran en sus cortes axial y sagital.

Los DVRs obtenidos para los animales transgénicos de 8, 12 y 13 meses de edad también revelan diferencias en la captación de los dos radiofármacos considerados. En los ratones más envejecidos todos los valores son superiores en los estudios realizados con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB en comparación con el [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120. Además, se verifica que hay un aumento progresivo con la edad en los DVRs de ratones estudiados con el estándar de oro. Para los estudios con el radiofármaco radiomarcado con  $^{18}\text{F}$  no se evidencian incrementos considerables en los DVRs de ninguna VOI.

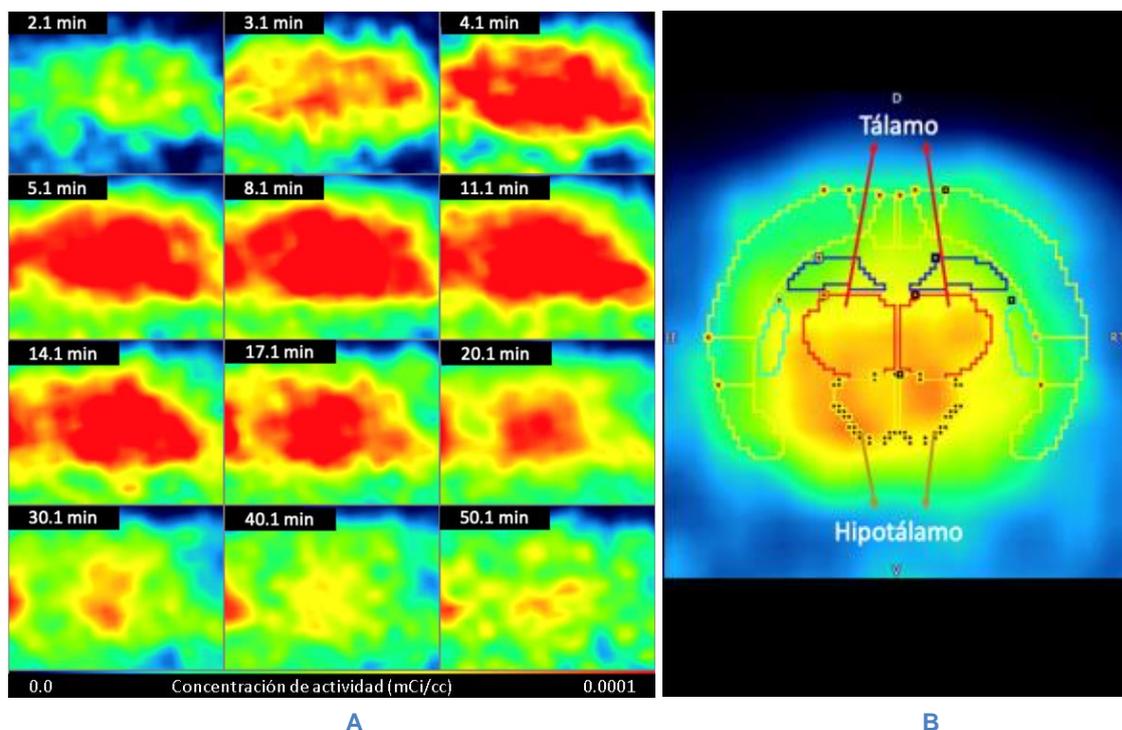
Este es el primer trabajo en el que se encuentran diferencias entre ratones 3xTG y WT con el radiofármaco considerado el estándar de oro para detección de placa  $\beta\text{A}$ . Trabajos previos han reportado que la imagen PET es una medida menos sensible para determinar carga amiloide en modelos de roedores [37]. De hecho, no se habían reportado diferencias significativas entre la captación cerebral del [ $^{11}\text{C}$ ]PIB en ratones transgénicos 3xTG de 4, 8, 12 y 16 meses de edad con ratones macho WT [37], [38]. Las diferencias encontradas en este trabajo entre los modelos de ratones, basadas en el análisis cinético, demuestran que los parámetros cuantitativos son medidas poderosas y objetivas para determinación de placa  $\beta\text{A}$ , incluso si la técnica tiene menor sensibilidad.

#### **4.3. Estudios PET de ratas con [ $^{11}\text{C}$ ]PIB y [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120**

Los valores cuantitativos obtenidos del análisis cinético sugieren que el [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 no es un radiofármaco específico para el marcaje de placa  $\beta\text{A}$  en el cerebro de ratones 3xTG de hasta 15 meses de edad. Con el propósito de confirmar si el radiofármaco es o no es un buen candidato para determinación de carga amiloide, se realizaron estudios microPET a modelos de ratas con EA creados mediante la inyección estereotáctica de agregados sintéticos de  $\beta\text{A}$ . La inyección de estos agregados induce la formación de placas amiloide en el cerebro [39]. Las ratas utilizadas para las adquisiciones tenían lesión bilateral en el hipotálamo o en los ventrículos y fueron suministradas por el Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas

de la Facultad de Medicina de la UNAM. Algunas fueron inyectadas con una parte de la secuencia de aminoácidos del péptido (25-35) y otras con la secuencia completa (1-42). Para la comparación, se consideró como control una rata sin lesión de la misma edad que la rata con lesión.

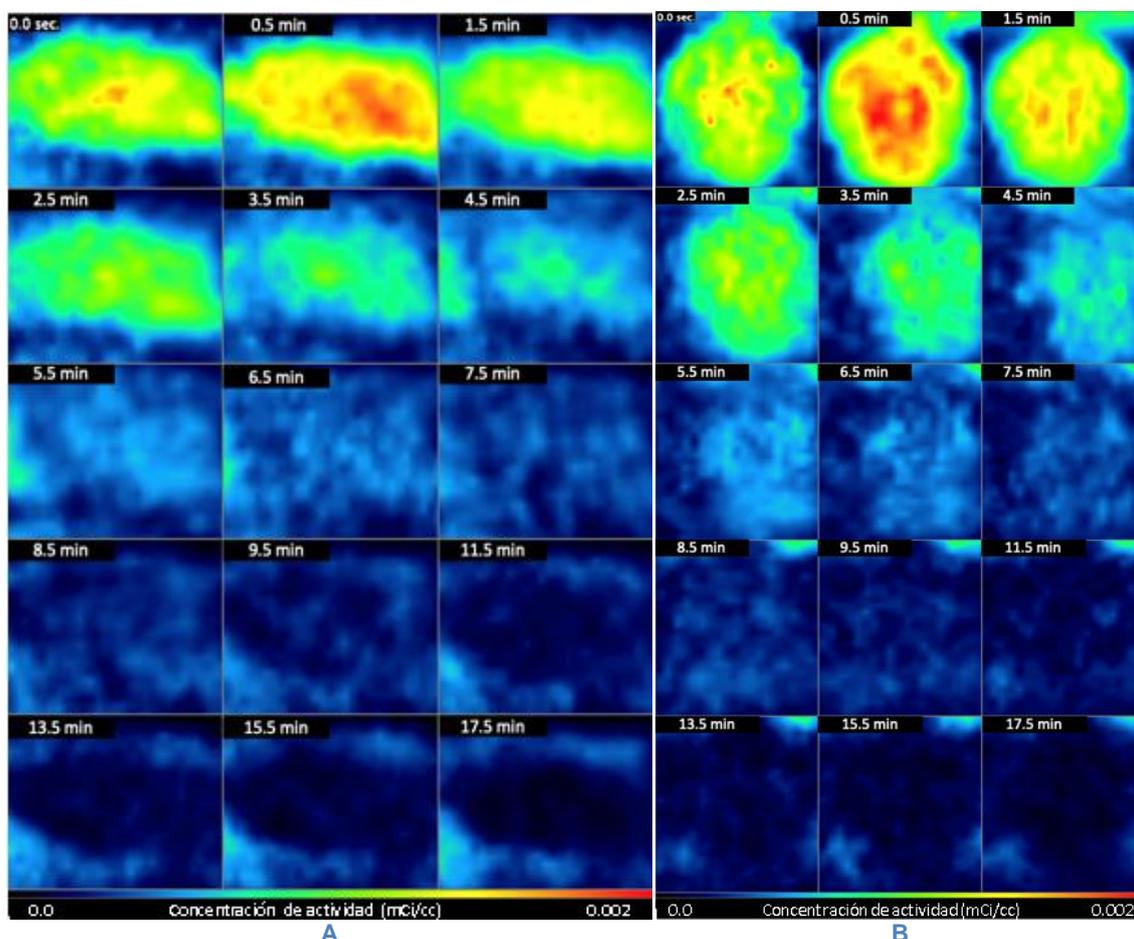
La Figura 35A muestra la adquisición dinámica PET de 60 minutos con [<sup>11</sup>C]PIB (Actividad inyectada = 0.438 mCi) realizada a una rata (*m* = 282 g) con modelo de EA lesionada en hipotálamo. La imagen se normalizó al atlas de rata W. Schiffer mediante una transformación rígida y un muestreo de 1 mm. En la figura se observa que el radiofármaco cruza la barrera hematoencefálica y después del aclarado es captado en regiones cerebrales correspondientes al hipotálamo y tálamo (Figura 35B).



**Figura 35.** A. Adquisición dinámica PET de 60 min con [<sup>11</sup>C]PIB de modelo de rata con EA lesionada en hipotálamo en el plano sagital y B. Promedio de los últimos frames mostrado en un corte axial. La imagen fue normalizada al atlas de rata W. Schiffer.

El mismo animal fue sometido a un estudio dinámico de 70 minutos con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 (Actividad inyectada = 0.4 mCi). La Figura 36 muestra las imágenes correspondientes a los primeros 18 minutos de la adquisición, posterior a este tiempo la mayor parte de la actividad se concentra en hueso. La imagen está normalizada al atlas de rata W.Schiffer. El radiofármaco cruza la barrera hematoencefálica y después es

eliminado rápidamente del cerebro. No se observa captación en ninguna región cerebral después del aclarado.



**Figura 36.** Adquisición dinámica PET de 70 min con  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  de modelo de rata con EA lesionada en hipotálamo en los planos: A. Sagital y B. Coronal.

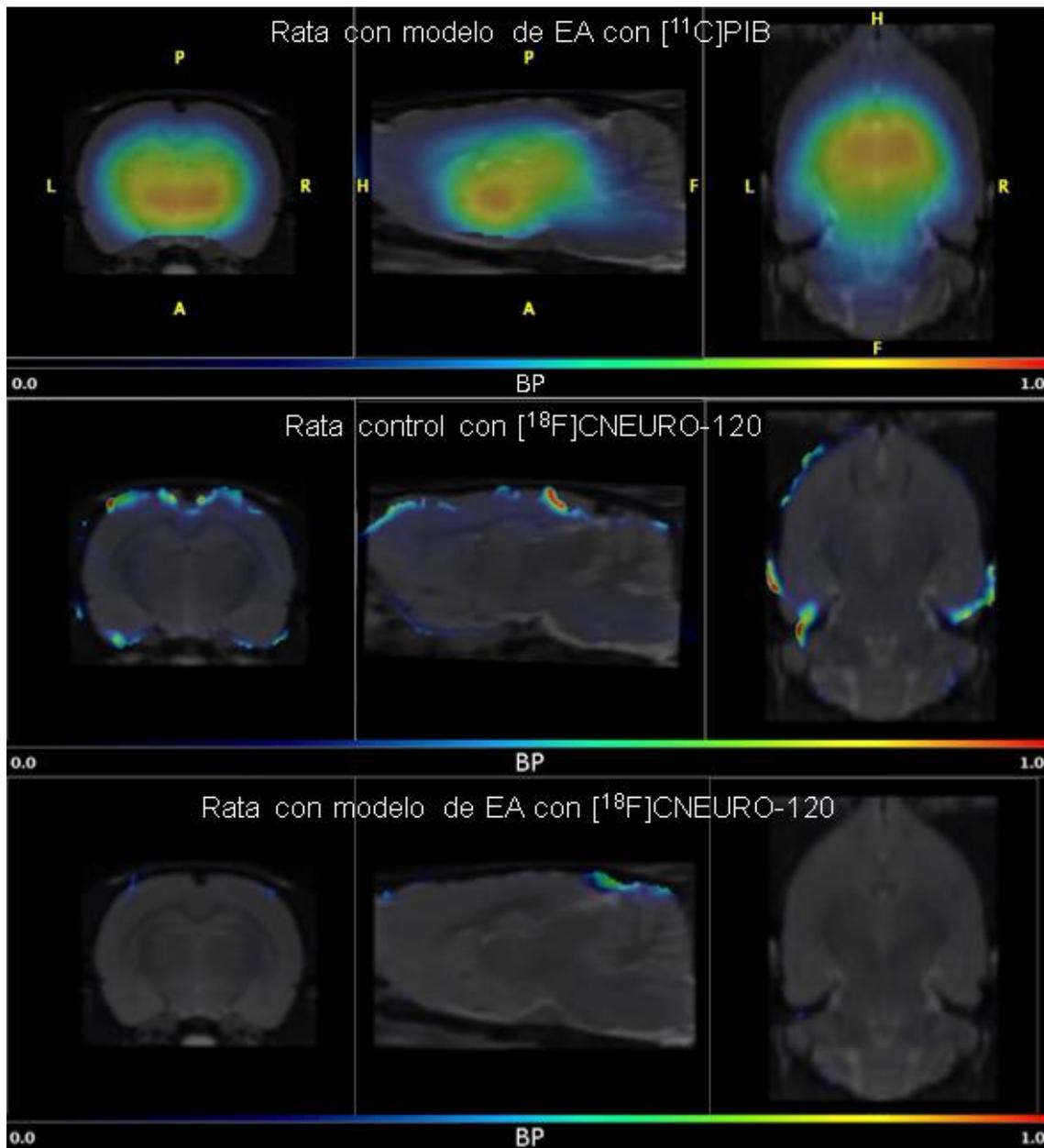
El análisis cinético se realizó con el modelo LRTM utilizando el hipotálamo como región de interés y el cerebelo como región de referencia. El análisis de los estudios realizados con el  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  se realizó considerando solo la primera parte de las adquisiciones (hasta el minuto 27). Lo anterior, con el propósito de reducir al máximo posible el efecto de desbordamiento. Para los estudios con el  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ , el análisis se realizó considerando la adquisición dinámica completa. Los valores de DVR obtenidos para las imágenes con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  demuestran diferencias relevantes entre el animal con modelo de la EA y el animal control. Los DVRs más altos están en tálamo (izq: 1.8068, der: 1.7972) e hipotálamo (izq: 1.7038, der: 1.7027). Estos valores son, aproximadamente, 2 veces más grandes que los obtenidos para la rata con lesión

estudiada con el [<sup>18</sup>F]CNEURO-120. Por su parte, los resultados de análisis para los estudios con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 no muestran diferencias relevantes entre el animal con modelo de EA y el control. Los valores son incluso ligeramente superiores en el control que en la rata con EA. Los DVRs detallados de cada VOI para cada estudio se presentan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Valores de DVR obtenidos mediante el LRTM para estudio dinámico con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 (t\*=6.5 min) y con [<sup>11</sup>C]PIB (t\*=8.1 min) a rata lesionada con modelo de EA.

VOI	<sup>18</sup> F]CNEURO-120		<sup>11</sup> C]PIB
	Control	Rata con EA	Rata con EA
Estriado izquierdo	1.216122	0.921902	1.480002
Estriado derecho	1.200028	0.934445	1.468041
Hipotálamo izq.	1.126144	0.909028	1.703779
Hipotálamo der.	1.132972	0.912728	1.702710
Mesencéfalo izq.	1.161672	1.009744	1.676725
Mesencéfalo der.	1.160055	0.999207	1.647796
Tálamo izquierdo	1.170687	0.970208	1.806805
Tálamo derecho	1.123784	0.969189	1.797212
Corteza Izquierda	1.28243	1.074467	1.141772
Corteza derecha	1.258936	1.005661	1.120846
Hipocampo izq.	1.193648	0.970843	1.555624
Hipocampo der.	1.162009	0.977127	1.521345

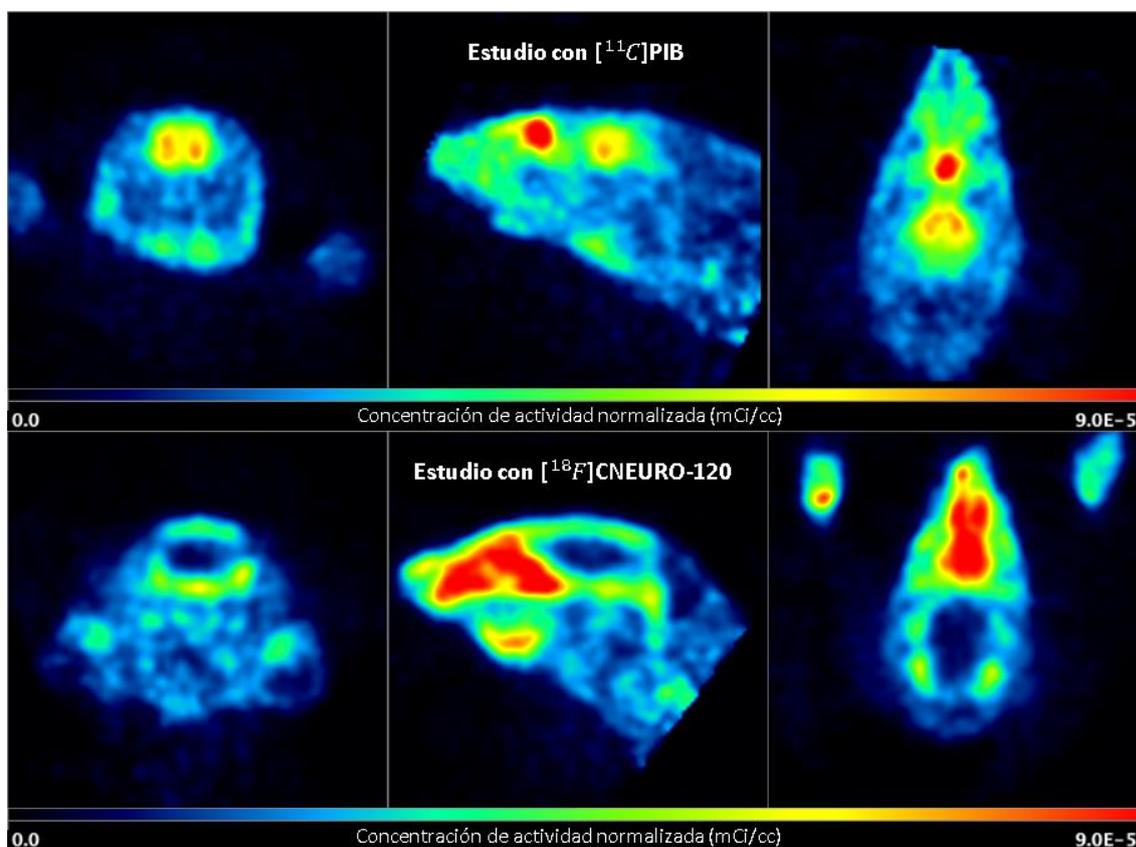
Los mapas en escala de potencial de unión obtenidos de los estudios con [<sup>11</sup>C]PIB revelan captación específica dentro del cerebro de la rata lesionada (Figura 37, fila superior), particularmente en zonas del hipotálamo y tálamo lo que resulta congruente con la lesión estereotáctica realizada a los animales. Las imágenes paramétricas obtenidas de los estudios con el [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 descartan la captación específica del fármaco en regiones cerebrales con presencia de placas βA (Figura 37, fila inferior). En lugar de ello, se observa señal proveniente de partes exteriores al cerebro, consecuencia de la alta concentración de actividad que hay en hueso.



**Figura 37.** Imágenes paramétricas en escala de BP para estudios dinámicos PET realizados con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  a rata con modelo de EA (fila superior), con  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  a rata control (fila intermedia) y con  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  a rata con modelo de EA (fila inferior). Las imágenes se muestran en sus diferentes cortes (axial, sagital y coronal).

La Figura 38 muestra las imágenes estáticas obtenidas con cada uno de los radiofármacos a modelo de rata lesionada en los ventrículos. La imagen con el  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  se adquirió durante 15 minutos y se dio un tiempo de biodistribución de 40 minutos. El resultado con el estándar de oro revela captación bilateral en el cerebro del animal, lo que no ocurre con el  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$ . Con apenas 28 minutos de biodistribución ya no se observa actividad en ninguna región interna del cerebro. La mayor parte de la actividad se concentra en cráneo y bulbo olfatorio. La imagen con el  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$

fue obtenida con un tiempo de adquisición de 10 minutos. Ambas imágenes están normalizadas por la actividad inyectada y fueron suavizadas mediante un filtro gaussiano de 0.2 mm.



**Figura 38.** Imágenes estáticas microPET de modelo de rata con EA lesionada en ventrículos obtenidas con  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  (fila superior) y  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  (fila inferior).

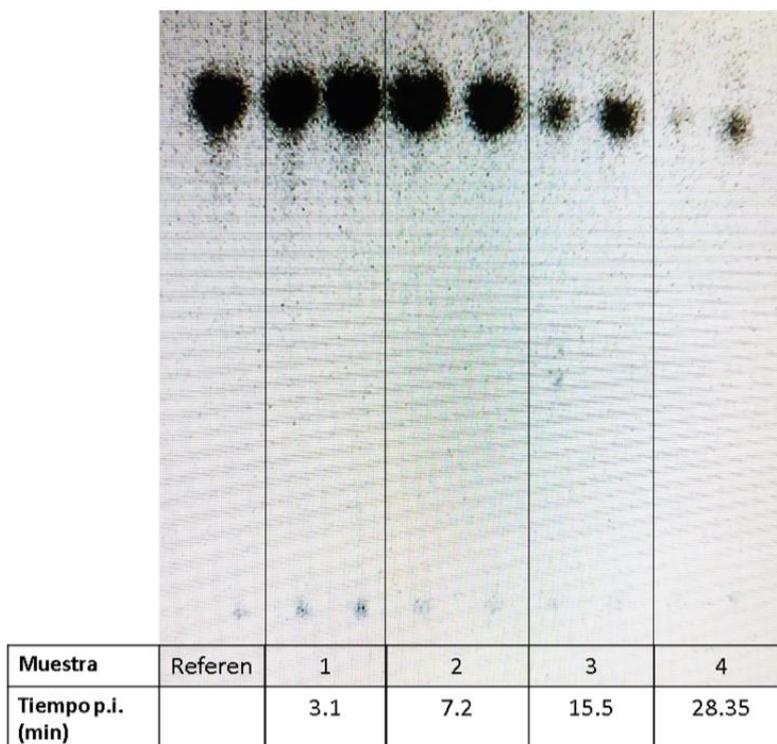
#### 4.4. Estudio de estabilidad *in vivo* con $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$

En todos los estudios realizados con  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  se evidenció alta captación en hueso, mejor diferenciada a partir del minuto 16 p.i. Para verificar o descartar que la captación en hueso esté asociada con flúor libre que se desprende *in vivo* del radiofármaco (como sugirieron en su trabajo Rivera-Marrero et al. [10]), se realizó un estudio de estabilidad *in vivo* mediante cromatografía en capa fina (TLC). Para el análisis se extrajeron muestras de sangre de  $1\mu\text{L}$  a diferentes tiempos p.i. del radiofármaco de una rata control. Las muestras se centrifugaron para obtener el plasma sanguíneo de cada una y fueron analizadas por TLC. Los detalles se presentan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Tiempos p.i. de las muestras de sangre extraídas de rata con su respectiva actividad en plasma.

$A_0 = 1.135 \text{ mCi}$	
Tiempo p.i. (min)	Actividad en plasma ( $\mu\text{Ci}$ ) (después de centrifugar)
3.1	35
7.2	18
15.5	3
28.35	0.5

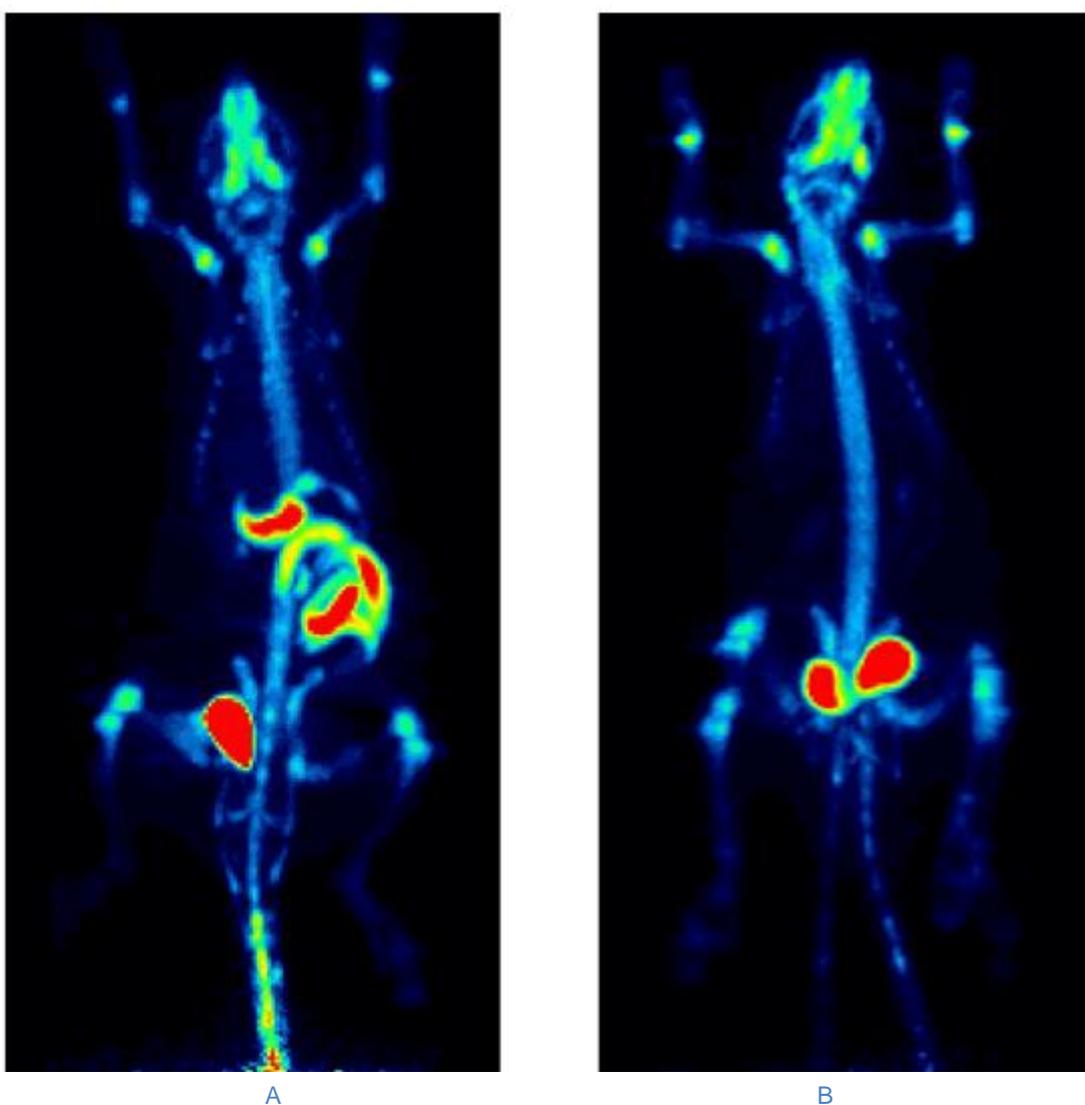
Después de 28 minutos p.i. la actividad medida en plasma fue nula, por lo que sólo se analizaron por TLC las primeras 4 muestras (por duplicado). El resultado del estudio se presenta en la Figura 39. La muestra etiquetada como “Referen” es el producto intacto del radiofármaco utilizado como referencia para comparar con las otras muestras. Después de la elución, no se observa separación de componentes en ninguna de las muestras, por lo que se confirma que el radiofármaco se conserva íntegro por lo menos hasta los 28 minutos p.i. De haber  $^{18}\text{F}$  libre este se quedaría en el origen.



**Figura 39.** Análisis de estabilidad mediante TLC con muestras de  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  en plasma de rata control.

El resultado del TLC descarta que haya defluoración *in vivo* del radiofármaco, o al menos no en tal medida que la alta captación que se observa en hueso sea exclusivamente debida a este proceso.

Un radiofármaco típicamente usado para marcar hueso y detectar metástasis y otros desórdenes óseos es el  $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$  [40]. Con el propósito de comparar el  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  con un radiofármaco estándar para estudios óseos se realizaron estudios estáticos de 10 minutos con ambos fármacos a una rata control. Ambos radiofármacos tuvieron un tiempo de biodistribución de 60 min. Las imágenes obtenidas con cada radiofármaco (Figura 40) evidencian un patrón similar en lo respecta a la captación en hueso.



**Figura 40.** Estudios estáticos microPET de rata control con A)  $[^{18}\text{F}]\text{CNEURO-120}$  y B)  $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ .

## 5. Conclusiones

Los valores de los parámetros cuantitativos, en particular, del cociente de volumen de distribución (DVR) calculado mediante el LRTM demuestran que hay captación del [ $^{11}\text{C}$ ]PIB en la corteza cerebral de ratones transgénicos que, además, incrementa con la edad de los animales, lo que resulta consistente con la acumulación progresiva de placa amiloide en animales 3xTG. Aunque el aumento en el DVR es progresivo con la edad en todos los volúmenes de interés considerados para el análisis cinético, los valores en la corteza cerebral permiten discernir entre animales con modelo de EA de controles a partir de los 12 meses de edad. Las imágenes paramétricas obtenidas en escala de potencial de unión (BP) validan los resultados y confirman la captación específica del fármaco en el cerebro de ratones envejecidos.

Los estudios microPET con [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 no revelan captación específica en el cerebro de ratones transgénicos de hasta 15 meses de edad. En lugar de ello, hay acumulación considerable de actividad en el hueso de los animales a partir de los 16 minutos p.i. Dicha captación es indistinta de sujetos transgénicos o controles. El estudio de estabilidad *in vivo* realizado mediante cromatografía en capa fina descarta que la razón sea sólo atribuible a una defluoración *in vivo* del [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120. Los resultados del análisis cinético y las imágenes paramétricas confirman que no hay captación del [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 en el cerebro de ratones 3xTG, ni siquiera en los animales de mayor edad.

A pesar de las limitaciones que pueden existir relacionadas con el número  $n$  de los animales, los resultados son suficientes y concluyentes para los propósitos de este trabajo. El [ $^{18}\text{F}$ ]CNEURO-120 no es captado de forma específica en el cerebro de ratones 3xTG de hasta 15 meses de edad. La presencia de placas  $\beta\text{A}$  en la corteza cerebral de ratones transgénicos de mayor edad fue detectada mediante el análisis cinético de los estudios microPET con el [ $^{11}\text{C}$ ]PIB. Lo anterior no ocurrió con el

[<sup>18</sup>F]CNEURO-120. Los resultados obtenidos del análisis cuantitativo demuestran la efectividad de este método sobre procedimientos típicamente utilizados.

Las imágenes microPET de ratas con agregados sintéticos de  $\beta$ A en el hipotálamo y ventrículos convalidan los resultados obtenidos para los ratones transgénicos. Los valores de DVR calculados para los estudios con [<sup>11</sup>C]PIB son mayores en todas las VOIs de rata con  $\beta$ A que en las de rata control. Los DVRs más altos obtenidos para la rata con modelo de EA se dan en el tálamo e hipotálamo, congruente con la lesión estereotáctica realizada a los animales. En el caso de los estudios con [<sup>18</sup>F]CNEURO-120, los DVRs no presentan variaciones considerables entre los dos grupos de ratas. De hecho, los valores son ligeramente superiores en el animal control que en la rata con modelo de EA. Las imágenes paramétricas confirman que no hay captación específica del [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 en el cerebro de ratas con carga amiloide.

A más de 20 años de haber sido introducida la Tomografía por Emisión de Positrones en la Facultad de Medicina de la UNAM, es la primera vez que se sintetizan y se realizan estudios con radiofármacos específicos para el diagnóstico de la EA. Aunque la población de estudio en este proyecto fue reducida, los resultados obtenidos sugieren que el [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 no es radiofármaco específico para la determinación de placa  $\beta$ A y, en consecuencia, no es útil para diagnóstico de la EA en roedores con los modelos experimentales de la EA aquí considerados. Sin embargo, más estudios son necesarios para tener mayor evidencia sobre la posible utilidad de este radiofármaco.

Los resultados obtenidos con los modelos animales utilizados permitieron detener el eventual tránsito del [<sup>18</sup>F]CNEURO-120 a evaluaciones en humanos, al menos hasta que más estudios sean realizados.

Este trabajo demuestra el potencial de los métodos basados en el análisis cuantitativo de los datos y su superioridad sobre los métodos convencionales utilizados para el análisis de las imágenes PET. Además, puede considerarse una prueba piloto que servirá como referencia a futuros estudios. Esta es la primera investigación que se

realiza con radiofármacos producidos en la UNAM destinados a la detección de placas  $\beta$ A y basado en el análisis cuantitativo de imágenes dinámicas PET. Investigaciones posteriores deberían considerar una  $n$  más grande y animales transgénicos de mayor edad. Se ha reportado que la captación de los radiofármacos diseñados para el marcaje de placa  $\beta$ A es dependiente del modelo de ratón transgénico, por lo que también sería útil evaluar la cinética de los radiofármacos en diferentes modelos y comparar con los resultados obtenidos en este trabajo.

## Referencias

- [1] L. M. F. Gutiérrez Robledo, «Demencias en México: La necesidad de un Plan de Acción,» de *Demencias, una visión panorámica*, San Luis Potosí, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2014, pp. 9-20.
- [2] Y. Gong, L. Chang, K. L. Viola, P. N. Lacor, M. P. Lambert, C. E. Finch, G. A. Krafft y W. L. Klein, «Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 10417–10422, 2003.
- [3] A. Prem Kumar, N. Singh, D. Nair y A. Justin, «Neuronal PET tracers for Alzheimer's disease,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n° 587, pp. 58-62, 2021.
- [4] M. A. DeTure y D. W. Dickson, «The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease,» *Mol Neurodegeneration*, vol. 14, n° 32, 2019.
- [5] A. Monsonego y H. L. Weiner, «Immunotherapeutic Approaches to Alzheimer's Disease,» *Science*, vol. 302, n° 5646, pp. 834-838, 2003.
- [6] S. T. Dekosky y K. Marek, «Looking Backward to Move Forward: Early Detection of Neurodegenerative Disorders,» *Science*, vol. 302, n° 5646, pp. 830-834, 2003.
- [7] V. L. Villemagne, S. Burnham, P. Bourgeat, B. Brown, K. A. Ellis, O. Salvado, C. Szoek, S. L. Macaulay, R. Martins, P. Maruff, D. Ames, C. C. Rowe y C. L. Masters, «Amyloid  $\beta$  deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study,» *Lancet Neurology*, pp. 357-67, 2013.
- [8] C. M. Dong, A. S. Guo, A. To, K. W. Chan, A. S. Chow, L. Bian, A. T. Leong y E. X. Wu, «Early Detection of Amyloid  $\beta$  Pathology in Alzheimer's Disease by MRI\*,» *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol*, pp. 1100-1103, 2020.
- [9] A. Coliva, C. Monterisi, A. Apollaro, D. Gatti, M. Penso, L. Gianolli, D. Perani, M. C. Gilardi y A. Carpinelli, «Synthesis optimization of 2-(4-N-[11C]methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([11C]PIB),  $\beta$ -amyloid PET imaging tracer for Alzheimer's disease diagnosis,» *Appl Radiat Isot*, pp. 66-71, 2015.
- [10] S. Rivera-Marrero, L. Fernández-Maza, S. León-Chaviano, M. Sablón-Carrazana, A. Bencomo-Martínez, A. Perera-Pintado, A. Prats-Capote, F. Zoppolo, I. Kreimerman, T. Pardo, L. Reyes y e. al., «[ 18 F]Amylovis as a Potential PET Probe for  $\beta$ -Amyloid Plaque: Synthesis, In Silico, In vitro and In vivo Evaluations,» *Current radiopharmaceuticals*, pp. 58-71, 2019.
- [11] M. Filippi y F. Agosta, *Imaging Dementia. Essentials for Clinical Practice*, Suiza: Springer, 2021.
- [12] L. Schilling, E. Zimmer, M. Shin, A. Leuzy, T. A. Pascoal, B. A. L. W. Vendramini, A. Palmieri, S. Gauthier y R.-N. P., «Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET,» *Dement Neuropsychol*, pp. 79-90, 2016.
- [13] A. Chandra, P.-E. Valkimadi, G. Pagano, O. Cousins, G. Dervenoulas y M. Politis, «Applications of amyloid, tau, and neuroinflammation PET imaging to Alzheimer's disease and mild cognitive impairment,» *Human Brain Mapping*, vol. 40, p. 5424–5442., 2019.
- [14] E. D. Roberson, de *Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia: Methods and Protocols*, Springer Science+Business Media, 2011, pp. 1-9.

- [15] T. Asada, «Epidemiology of Dementia in Japan,» de *Neuroimaging Diagnosis for Alzheimer's Disease and Other Dementias*, Japón, Springer Japan, 2017, pp. 1-10.
- [16] W. Bao, F. Xie, C. Zuo, Y. Guan y Y. H. Huang, «PET Neuroimaging of Alzheimer's Disease: Radiotracers and Their Utility in Clinical Research,» *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 13, nº 624330, 2021.
- [17] S. Medicine, «Stanford Medicina. Health Care,» [En línea]. Available: <https://stanfordhealthcare.org/>. [Último acceso: 13 02 2023].
- [18] J. T. Bushberg, J. A. Seibert, L. E. M. y J. M. Boone, *The Essential Physics of Medical Imaging*, Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2012.
- [19] W. Klunk, H. Engler, A. Nordberg y e. al, «Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B,» *Ann Neurol*, vol. 55, p. 306–319, 2004.
- [20] L. S. Porcello, E. R. Zimmer, M. Shin, A. Leuzy, T. A. Pascoal, A. L. Benedet, W. B. Vendramini, A. Palmi, S. Gauthier y P. Rosa-Neto, «Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET,» *Dement Neuropsychol*, pp. 79-90, 2016.
- [21] A. Snellman, F. R. López-Picón, J. Rokka, M. Salmona, G. Forloni, M. Scheinin, O. Solin, J. O. Rinne y M. Haaparanta-Solin, «Longitudinal Amyloid Imaging in Mouse Brain with 11C-PIB: Comparison of APP23, Tg2576, and APPswe-PS1dE9 Mouse Models of Alzheimer Disease,» *The Journal of the Nuclear Medicine*, p. 1434–1441, 2013.
- [22] J. Wang, H. T. Tanila, J. Puoliväli, K. Inga y T. Van Groen, «Gender differences in the amount and deposition of amyloidbeta in APPswe and PS1 double transgenic mice,» *Neurobiology of disease*, vol. 14, nº 3, p. 318–327, 2003.
- [23] J. Maeda, B. Ji, T. Irie, T. Tomiyama, M. Maruyama, T. Okauchi, M. Staufenbiel, N. Iwata, M. Ono, T. C. Saido, K. Suzuki, H. M. Mori, M. Higuchi y T. Sahara, «Longitudinal, Quantitative Assessment of Amyloid, Neuroinflammation, and Anti-Amyloid Treatment in a Living Mouse Model of Alzheimer's Disease Enabled by Positron Emission Tomography,» *The Journal of Neuroscience*, p. 10957–10968, 2007.
- [24] D. Sehlin, X. T. Fang, S. R. Meier, M. Jansson y S. Syvänen, «Pharmacokinetics, biodistribution and brain retention of a bispecific antibody-based PET radioligand for imaging of amyloid- $\beta$ ,» *Scientific Reports*, 2017.
- [25] P. E. Kinahan y J. W. Fletcher, «Positron emission tomography-computed tomography standardized uptake values in clinical practice and assessing response to therapy,» *Seminars in ultrasound, CT, and MR*, vol. 31, nº 6, p. 496–505, 2010.
- [26] M. M. Khalil, *Basic Science of PET Imaging*, Suiza: Springer Publishing, 2017.
- [27] V. Oikonen, «Turku PET Centre,» 26 09 2007. [En línea]. Available: <http://www.turkupetcentre.net/>. [Último acceso: 18 09 2022].
- [28] J. Logan, J. Fowler, N. Volkow y e. al., «Graphical Analysis of Reversible Radioligand Binding from Time—Activity Measurements Applied to [N-11C-Methyl]-(-)-Cocaine PET Studies in Human Subjects,» *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 10, nº 5, pp. 740-747, 1990.
- [29] C. Patlak, R. Blasberg y J. Fenstermacher, «Graphical Evaluation of Blood-to-Brain Transfer Constants from Multiple-Time Uptake Data,» *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 3, nº 1, pp. 1-7, 1983.
- [30] V. Oikonen, «Turku PET Center,» 02 04 2008. [En línea]. Available: <http://www.turkupetcentre.net/>. [Último acceso: 20 09 2022].

- [31] Y. Kimura, M. Naganawa, M. Shidahara, Y. Ikoma y H. Watab, «PET kinetic analysis - Pitfalls and a solution for the Logan plot,» *Annals of Nuclear Medicine*, vol. 21, nº 1, pp. 1-8, 2007.
- [32] V. Oikonen, «Turku PET Centre,» 02 05 2014. [En línea]. Available: <http://www.turkupetcentre.net/>. [Último acceso: 12 10 2022].
- [33] R. B. Innis, V. J. Cunningham, J. Delforge, M. Fijita y e. al., «Consensus Nomenclature for in vivo Imaging of Reversibly Binding Radioligands,» *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, nº 27(9), pp. 1533-1539, 2007.
- [34] N. N. D. Center, «Q-Value Calculator,» Brookhaven National Laboratory, [En línea]. Available: <https://www.nndc.bnl.gov/qcalc/>. [Último acceso: 20 10 2022].
- [35] S. Oddo, A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari y F. M. LaFerla, «Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction,» *Neuron*, vol. 39, nº 3, pp. 409-421, 2003.
- [36] Y. Ma, P. Hof, S. Grant, S. Blackband, R. Bennett, L. Slatost, M. McGuigan y H. Benveniste, « A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy,» *Neuroscience*, vol. 135, nº 4, pp. 1203-15, 2005.
- [37] M. Mirrione, W. Schiffer, J. Fowler, D. Alexoff, S. Dewey y S. Tsirka, «A novel approach for imaging brain-behavior relationships in mice reveals unexpected metabolic patterns during seizures in the absence of tissue plasminogen activator,» *Neuroimage*, vol. 38, nº 1, pp. 34-42, 2007.
- [38] A. Avendaño-Estrada, L. Verdugo-Díaz y M. A. Ávila-Rodríguez, «Comparative analysis of striatal [18F]FDOPA uptake in a partial lesion model of Parkinson's disease in rats: Ratio method versus graphical model,» *Synapse*, p. 76:e22231, 2022.
- [39] PMOD Technologies LLC, «PMOD,» [En línea]. Available: <https://www.pmod.com/files/download/v31/doc/pkin/2322.htm#o3773>. [Último acceso: 08 2023].
- [40] K. Matsubara, M. Ibaraki, H. Shimada, Y. Ikoma, T. Suhara, T. Kinoshita y H. Itco, «Impact of spillover from white matter by partial volume effect on quantification of amyloid deposition with [11C]PiB PET,» *NeuroImage*, vol. 143, pp. 316-324, 2016.
- [41] A. Jullienne, M. V. Trinh y A. Obenaus, «Neuroimaging of Mouse Models of Alzheimer's Disease,» *Biomedicine*, vol. 10, nº 2, p. 305, 2022.
- [42] S. Chiquita, M. Ribeiro, J. Castelhanos, F. Oliveira, J. Sereno, M. Batista, A. Abrunhosa, A. C. Rodrigues-Neves, R. Carecho, F. Baptista, C. Gomes, P. I. Moreira, A. F. Ambrósio y Castelo-Branco, «A longitudinal multimodal in vivo molecular imaging study of the 3xTg-AD mouse model shows progressive early hippocampal and taurine loss,» *Human molecular genetics*, vol. 28, nº 13, p. 2174–2188, 2019.
- [43] R. Facchinetti, M. R. Bronzuoli y C. Scuderi, «An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid  $\beta$ -Peptide (1-42),» *Methods in molecular biology*, vol. 1727, p. 343–352, 2018.
- [44] H. Jadvar, B. Desai y P. S. Conti, «Sodium 18F-fluoride PET/CT of bone, joint, and other disorders,» *Seminars in nuclear medicine*, vol. 45, nº 1, p. 58–65, 2015.

[45] L. L. Russell y J. D. Rohrer, «Defining the presymptomatic phase of frontotemporal dementia,» *Current Opinion in Neurology*, vol. 36, nº 4, pp. 276-282, 2023.