

Desarrollo de radiotrazadores para el diagnóstico de enfermedades oncológicas y neurodegenerativas

– aportes de la investigación en radiofarmacia del CUDIM –

Lic. Bq. Elena Vasilskis, Dr. Javier Giglio, Dra. Florencia Zoppolo, Dra. Ingrid Kreimerman, Prof. Agdo. Dr. Eduardo Savio

Centro Uruguayo de Imagenología Molecular – CUDIM
Áreas de I&D Biomédico y Químico Farmacéutico – Radiofarmacia

Resumen. Las enfermedades oncológicas y neurodegenerativas tienen una importancia de primera línea en Uruguay.

Las áreas de investigación químico-farmacéutica y biomédica (Radiofarmacia) desarrolladas por el CUDIM han contribuido a potenciar las capacidades de investigación en tomografía por emisión de positrones a través del desarrollo de nuevas moléculas de interés en la clínica, avanzando en la comprensión de patologías como cáncer de próstata, glioma y enfermedad de Alzheimer.

En este trabajo se exponen diferentes líneas que han implicado tanto el desarrollo de nuevos radiotrazadores, como la puesta a punto de modelos animales para el estudio y comprensión de diferentes patologías.

Abstract. Oncological and neurodegenerative diseases are health priorities in Uruguay.

The biomedical, and pharmaceutical-chemistry, departments (Radiopharmacy) have contributed to develop positron emission computed tomography research, through the development of new molecules based on their clinical interest, to improve our understanding of different pathologies such as prostate cancer, glioma and Alzheimer's disease.

In this article we analyse different research lines that have enabled R&D of new radiotracers, the optimization of animal models, in order to study and improve our understanding of these pathologies.

Palabras clave: radiofármacos, radiotrazadores, tomografía de emisión de positrones (PET), enfermedad de Alzheimer, cáncer de próstata, glioma.

Key words: radiopharmaceuticals, radiotracers, positron emission tomography (PET), Alzheimer's disease, prostate cancer, glioma.

Introducción

Considerando la importancia de su prevalencia en Uruguay, la investigación desarrollada por el CUDIM se ha orientado a avanzar en la comprensión y la mejora del diagnóstico de patologías como el cáncer de próstata, gliomas y enfermedad de Alzheimer.

Se desarrollan a continuación diferentes líneas que han implicado tanto el desarrollo de nuevos radiotrazadores,

como la puesta a punto de modelos animales para el estudio y comprensión de estas patologías.

Aportes al diagnóstico del cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CP) es uno de los cánceres sólidos más comúnmente diagnosticados en el hombre. El mismo constituye la quinta causa principal de mortalidad por cáncer a nivel mundial, representando un problema de salud pública⁽⁷⁾.

Esta patología se caracteriza por tener una evolución y sintomatología muy heterogénea, pudiendo presentar una amplia gama de comportamientos biológicos.

Para poder establecer el tratamiento más adecuado en cada caso, es de suma importancia estadificar con precisión esta patología^(8,9). De aquí surge la necesidad de contar con métodos diagnósticos específicos para cada estadio.

La **tomografía por emisión de positrones (PET)** es una modalidad de imagenología molecular que permite



Vasilskis Kreimerman Savio Zoppolo Giglio

E-mail: eduardo.savio@ cudim.org

obtener información funcional y metabólica de los distintos órganos y tejidos del cuerpo, a partir de la obtención de imágenes tridimensionales⁽¹⁰⁾. Esta técnica ofrece una herramienta cuantitativa útil para la caracterización *in vivo* de la biología tumoral, y por ello juega un rol muy importante en el diagnóstico del cáncer de próstata. Para poder realizar un diagnóstico preciso, la imagenología molecular por PET/CT debe ajustarse específicamente a la biología tumoral y al estadio evolutivo del paciente⁽¹¹⁾.

La (¹¹C)colina, (¹¹C)COL) ha sido uno de los radiofármacos más utilizados estos últimos años como referencia para la detección y evaluación del cáncer de próstata en la clínica. Sin embargo, el diagnóstico de esta patología con dicho radiofármaco presenta varias desventajas, basadas fundamentalmente en su baja sensibilidad⁽¹²⁾. Por otro lado, el PET con (⁶⁸Ga)PSMA evalúa el incremento de la expresión del antígeno prostático específico de

membrana (*prostate-specific membrane antigen, PSMA*). El PSMA es una proteína transmembrana presente en todos los tejidos prostáticos, pero su incremento es más elevado en el cáncer de próstata. Casi todos los adenocarcinomas de próstata muestran expresión de PSMA en la mayoría de las lesiones, tanto primarias como metastásicas.

PET con (¹¹C)SAM

En la búsqueda de la optimización del diagnóstico de cáncer de próstata y la evaluación de su agresividad y progresión, se desarrolló el PET con (¹¹C)SAM, tomando como patrón de referencia la (¹¹C)COL.

La sarcosina es un aminoácido que ha sido identificado como un metabolito diferencial que se ve ampliamente incrementado durante la progresión del cáncer de próstata⁽¹³⁾. Se ha demostrado que **dicho incremento se relaciona con el aumento de la agresividad tumoral**

de automatización de síntesis. Esto es fundamental dado el corto período de semidesintegración de los radionucleidos emisores de positrones y la importancia de la protección radiológica del operador, acorde con las normas internacionales de seguridad en este campo⁽³⁾. El proceso productivo se lleva a cabo en un área blanca, donde la calidad del aire es controlada, de modo de cumplir con los requisitos GMP⁽⁴⁾.

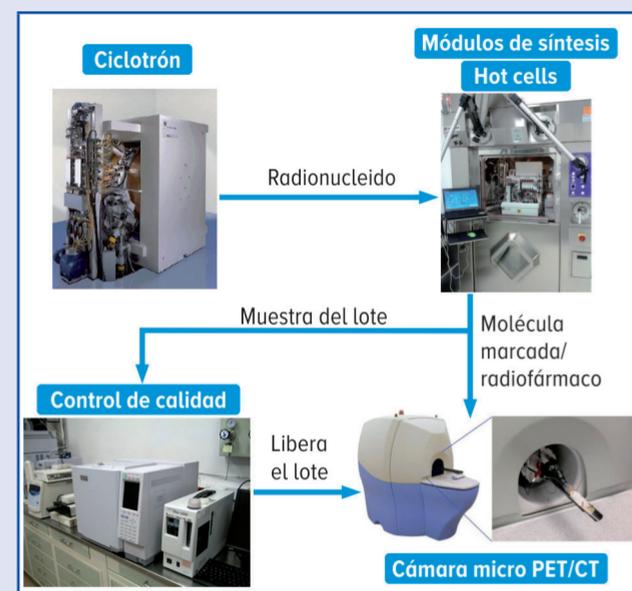


Figura 1 Esquema general de producción de una molécula marcada con un radionucleido PET, hasta la realización del estudio en el micro PET/CT.

Investigación y desarrollo químico-farmacéutico en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular

A 10 años de la piedra fundacional

El 24 de noviembre de 2008 se colocaba la piedra fundacional en el predio donde 15 meses después se inaugura el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular, con los siguientes objetivos⁽¹⁾:

- brindar asistencia a la población en forma de diagnóstico y monitoreo de terapias vinculadas con su especialidad.
- constituirse en un centro de formación de profesionales y científicos en el área, estimulando la formación de los estudios de postgrado.
- realizar tareas de investigación para desarrollar nuevos marcadores de diagnóstico.
- establecer lazos de colaboración, coordinación e intercambio académico con centros científicos similares en el mundo.

Para ello el CUDIM cuenta con infraestructura, equipamiento y personal científico-técnico que nos ha permitido el desarrollo de dichos objetivos.

Para la producción de nuevas entidades moleculares marcadas con radionucleidos PET (*tomografía de emisión de positrones*) se utilizan dos grandes componentes tecnológicos (*ver figura 1*):

- El **ciclotrón** (*PET Trace 16,5 MeV, GE*), donde se aceleran las partículas y se producen los radionucleidos (¹⁸F, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O)⁽²⁾ y un área donde se sintetiza el producto de interés. Si cumple los requisitos para administración en pacientes se lo denomina **radiofármaco**.
- Plataformas o módulos de síntesis** ubicadas dentro de celdas blindadas, permiten llevar a cabo procesos

y se debe a la sobreexpresión de la enzima **Glicina N-metiltransferasa (GNMT)**⁽¹⁴⁾.

En consecuencia, la identificación de ligandos de la GNMT para su posterior marcación con radionucleidos PET, constituiría una nueva herramienta para el diagnóstico de esta patología por imagenología molecular. La enzima GNMT cataliza la metilación de glicina para formar sarcosina empleando *S*-adenosil metionina (*SAM*) como sustrato donador del grupo metilo (*ver figura 2*).

Habiendo identificado esta molécula se plantearon los siguientes objetivos:

- optimización de la síntesis de (¹¹C)SAM a partir de *S*-adenosil homocisteína (*SAH*) mediante reacciones de marcación de *N*-metilación con ¹¹C,
- desarrollo del control de calidad del nuevo agente,
- evaluación fisicoquímica e *in vitro* de (¹¹C)SAM seguido de su caracterización biológica *ex vivo* e *in vivo*.

- Un **laboratorio de control de calidad fisicoquímico y microbiológico**, donde se verifica que el radiofármaco cumple con las especificaciones preestablecidas. En general, dichos controles se encuentran establecidos en las diferentes farmacopeas^(5,6) para los radiofármacos en uso clínico. En el caso de moléculas en desarrollo, las especificaciones se establecen en base a la información disponible de literatura.
- Cuando se libera el lote, está en condiciones de ser administrado a un animal de experimentación y realizar un **estudio de imágenes en la cámara micro PET/CT**.
- El **Bioterio** del centro suministra diferentes líneas de ratones SPF (*libre de patógenos específicos*) (*inmunodeprimidos, transgénicos, cepas control, etc.*). Dicha Unidad está transitando su proceso de acreditación bajo estándares internacionales.
- Laboratorios de ensayos preclínicos** (*laboratorio de cultivo celular, autorradiografía, cirugía experimental, etc.*), donde se llevan a cabo diferentes métodos de evaluación biológica, que permiten caracterizar un nuevo compuesto en estudio y evaluar su potencial para proseguir en nuevas etapas, o introducir los cambios que se consideren necesarios.

Las líneas de investigación del centro han estado centradas en enfermedades oncológicas y neurológicas.

Las áreas de investigación químico farmacéutico y biomédico (*Radiofarmacia*) han contribuido a potenciar las capacidades de investigación en tomografía por emisión de positrones a través del desarrollo de nuevas moléculas de interés en la clínica, en la formación de profesionales y jóvenes investigadores. La investigación se ha basado en el trabajo multidisciplinario e interinstitucional que permite avanzar en la comprensión de pa-

Nuestro equipo logró optimizar un método químico para la síntesis de (¹¹C)SAM en el módulo automatizado TRACERlab® FX-C_{Pro} (*GE*). El radiotrazador se obtuvo como mezcla diastereomérica, ajustándose a las especificaciones establecidas para el control de calidad⁽¹⁶⁾.

La caracterización fisicoquímica e *in vitro* de (¹¹C)SAM aportó elementos para predecir el comportamiento *in vivo* del compuesto y así poder continuar con la etapa de evaluación biológica del mismo.

La evaluación biológica de (¹¹C)SAM se llevó a cabo empleando dos modelos de ratón, uno sano y otro portador de tumor xenográfico de CP humano, mediante estudios *ex vivo* de biodistribución e *in vivo* por imagenología molecular PET/CT.

Los estudios realizados utilizando el modelo tumoral con (¹¹C)SAM permitieron determinar que la concentración de actividad obtenida a nivel del tumor fue sig-

to logías como cáncer de próstata, glioma y enfermedad de Alzheimer, como se expone en esta misma revista.

Es de vital importancia para los centros PET como el CUDIM, optimizar los procesos de síntesis de radiofármacos y adaptarlos a la tecnología disponible. Esto nos ha posibilitado estar a la vanguardia con los radiofármacos de referencia, empleados a nivel mundial.

En la página web del centro (www.cudim.org) se detallan presentaciones en eventos internacionales y publicaciones relacionadas con dichas líneas.

La formación de recursos humanos de postgrados y las líneas de investigación han sido posibles con la colaboración de centros nacionales y del exterior (*ver tabla 1*).

Colaboración nacional	
• Universidad de la República (<i>Udelar</i>):	- Cátedra de Radioquímica (<i>Facultad de Química</i>) - Centro de Investigaciones Nucleares (<i>Facultad de Ciencias</i>)
• Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable	
• Instituto Pasteur Montevideo	
Colaboración internacional	
• CNeuro (<i>Cuba</i>)	
• PositronPharma (<i>Chile</i>)	
• Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse INSERM (<i>Francia</i>)	

Tabla 1 Colaboraciones académicas del CUDIM en las líneas de investigación expuestas en este trabajo.

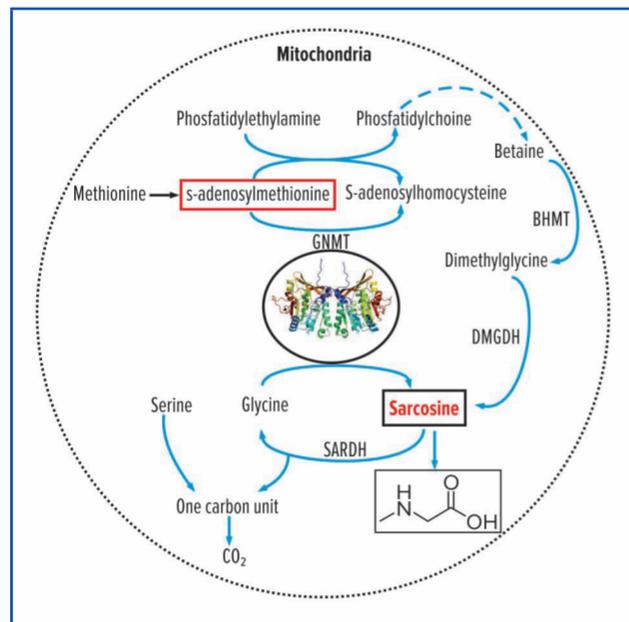


Figura 2 Esquema de ruta bioquímica que involucra la síntesis enzimática de sarcosina⁽¹⁵⁾.

nificativamente mayor que la del músculo usado como tejido de referencia, a todos los tiempos analizados.

Los estudios comparativos PET/CT con (¹¹C)COL, mostraron una captación tumoral *in vivo* de (¹¹C)SAM significativamente mayor que la obtenida para el radiofármaco de referencia. Estos resultados sugieren que **el nuevo agente podría ser potencialmente útil como agente diagnóstico para el cáncer de próstata**.

Se realizaron estudios dosimétricos del nuevo compuesto que permitieron estimar la dosis absorbida y la dosis efectiva en humanos, tanto para los diferentes órganos como para cuerpo entero. En base a los resultados obtenidos, se pudo concluir que el riesgo asociado a la irradiación en un estudio con (¹¹C)SAM habilita su uso en pacientes al ser del orden de otros radiofármacos en uso clínico.

Los resultados anteriormente descriptos permitieron continuar con la redacción de un protocolo clínico piloto a fin de evaluar la potencial utilidad de (¹¹C)SAM en el diagnóstico de CP en humanos. Dicho protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Institucional del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

Actualmente, el ensayo clínico planteado se encuentra en ejecución y la culminación del mismo aportará elementos para dilucidar la potencial aplicación en la clínica del agente en estudio.

Método de marcación de ¹⁸F-PSMA

El PET con ⁶⁸Ga-PSMA permite obtener imágenes de forma de valorar con un método mínimamente invasivo la expresión de PSMA⁽¹⁷⁾.

Este radiofármaco se ha vuelto muy importante en la evaluación de pacientes con cáncer de próstata, y el incremento de su utilización en CUDIM se ha hecho muy importante desde su comienzo en 2015 con 29 pacientes/año a los 317 pacientes/año en 2017⁽¹⁸⁾.

El ⁶⁸Ga, es un radionucleido obtenido de generador ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga, lo cual presenta como una de las ventajas más importantes que se puede obtener sin la necesidad de un ciclotrón. Sin embargo, presenta como principal desventaja que la actividad máxima disponible está limitada por el generador, pudiendo realizar pocos estudios a pacientes por síntesis (5 al inicio del generador, llegando a 1 o 2 al final de la vida útil del mismo).

Por estos motivos y por ser un radionúclido de menor energía β⁺, el poder contar con el PSMA marcado con ¹⁸F se presenta como una ventaja interesante. Esto permite obtener imágenes con mejor resolución (a causa de la menor energía β⁺) y poder realizar más cantidad de estudios a pacientes por cada marcación (ya que la actividad producida en el ciclotrón puede ser variada), permitiendo incrementar la atención asistencial con este radiofármaco sin la necesidad de incrementar el número de producciones.

Existen en la literatura varias formas de poder acoplar el ¹⁸F al péptido PSMA. Una de ellas es la vía nucleofílica, en la cual los precursores disponibles están bajo patente. Otra vía novedosa de realizar la marcación es emplear el mismo precursor que para ⁶⁸Ga (el cual ya estaba disponible en CUDIM) y realizar el acoplamiento empleando un complejo con Al y F, para formar Al¹⁸F-PSMA. La síntesis de este radiofármaco ya había sido reportada con anterioridad, pero en forma manual, solo para uso preclínico a pequeña escala⁽¹⁹⁾.

Para poder contar con este radiofármaco en la rutina clínica, es necesario poder realizar la síntesis en una plataforma automática (módulo de síntesis) ubicada en una celda caliente en un área blanca. Para ello se trabajó en el desarrollo de la síntesis en la plataforma disponible en CUDIM, módulo de síntesis Tracerlab FX_{FN} (GE). Para ello se optimizaron las condiciones de síntesis y purificación a fin de poder obtener el radiofármaco en condiciones aptas para ser empleadas en la clínica de rutina⁽²⁰⁾.

Previamente al empleo en la rutina clínica, se realizaron las evaluaciones en modelos preclínico de animales empleando células LNCaP, inoculadas en ratones Nude N:NIH (S)-Foxn 1nu (ver figura 3). Por este motivo es fundamental poder contar en el país con las facilidades que permitan realizar las evaluaciones preclínicas con animales de experimentación.

Actualmente se encuentra en evaluación clínica el empleo de este radiofármaco como sustituto de su análogo marcado con ⁶⁸Ga.

De ser positiva la evaluación, se podrá contar con un radiofármaco seguro, que permita incrementar el número de estudios y así poder atender la necesidad creciente de diagnóstico en la principal neoplasia en el hombre.

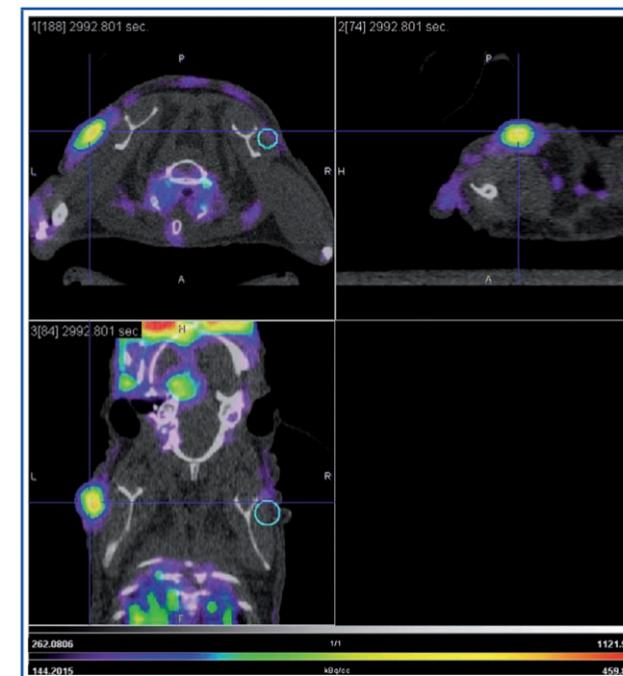


Figura 3 Tumor xenográfico con células LNCaP cell, en ratones Nude N: NIH (S) - Foxn 1nu mice. Imagen adquirida post administración de Al(¹⁸F)-PSMA, empleando una cámara para pequeños animales tri-modality PET/SPECT/CT scanner (TriumphTM, TriFoil, Inc., US).

Estudios en gliomas

Los modelos animales se han utilizado en el desarrollo de nuevas entidades químicas para estudiar diferentes blancos terapéuticos, respuesta farmacológica, evaluación de dosis y toxicidad, etc.^(21,22).

El PET en modelos murinos es una herramienta para la evaluación de nuevos trazadores para el diagnóstico de los tumores del SNC, así como para los ensayos preclínicos *in vivo* de fármacos con potencial valor terapéutico⁽²³⁾.

Los modelos animales son una simplificación de la patología en humanos y aunque imperfectos, constituyen la mejor herramienta de investigación *in vivo*^(24,25).

En CUDIM se trabaja en la implantación intracraneal de líneas celulares humanas de glioma en ratones inmunodeficientes (atímicos). Se procura reproducir estas lesiones tumorales en animales de experimentación y evaluarlas por medio de imágenes PET con radiofármacos de referencia en la clínica: ¹⁸F-FDG y ¹¹C-Metionina. Contar con este modelo animal validado, con resultados predecibles, mediante el uso de estos dos agentes de diagnóstico, permitirá la utilización posterior del modelo en el desarrollo de nuevos trazadores para diagnóstico y evaluación de compuestos potencialmente terapéuticos para glioma.

Para la generación de este modelo, se inoculan células LN229 (ATCC®CRL2611™) de glioblastoma multiforme humanas mediante estereotaxia en el núcleo estriado

derecho de ratones Nude-Nude adultos. Se realiza seguimiento por imágenes micro PET/CT (Triumph™ PET/CT/SCANNER TriFoil Imaging) a partir de los 15 días (ver figura 4). De este modo es posible adquirir la imagen funcional (PET) y la imagen anatómica (CT), que se coregistran para seguir la evolución temporal de la lesión.

El radiotrazador ¹⁸F-2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (¹⁸F-FDG), es un marcador de hipermetabolismo⁽²⁶⁾. Las lesiones malignas e inflamatorias presentan un aumento del metabolismo de la glucosa, lo que determina un aumento de la señal del trazador en las imágenes⁽²⁷⁾.

¹¹C-Metionina, es un aminoácido esencial radiomarcado que pone en evidencia el aumento de la proliferación celular. Está bien caracterizado en los tumores del SNC y se ha propuesto para diferenciar gliomas de alto grado en relación a los de bajo grado^(28,29).

Ambos marcadores son producidos en la unidad de radiofarmacia de CUDIM. Las imágenes obtenidas se procesan con el software de imagen P-MOD (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Switzerland). Este tratamiento de los datos permite la cuantificación de la captación de los radiofármacos mencionados para la obtención de una línea temporal de evolución de la lesión así como la relación (captación en tumor)/(captación en tejido sano).

Las imágenes del cerebro de los ratones inoculados (ver figura 5) denotan captación de ¹⁸F-FDG en todo el tejido y por lo tanto la captación específica de la lesión tumoral no es precisa. Sin embargo, en las imágenes obtenidas con ¹¹C-Metionina, se pueden apreciar claramente las zonas de hipercaptación que coinciden con la masa tumoral, y zonas de hipocaptación. Además, esta línea celular fue anteriormente estudiada *in vitro* respecto a su captación de ¹¹C-Metionina, dando muy buen nivel de internalización celular⁽³⁰⁾.

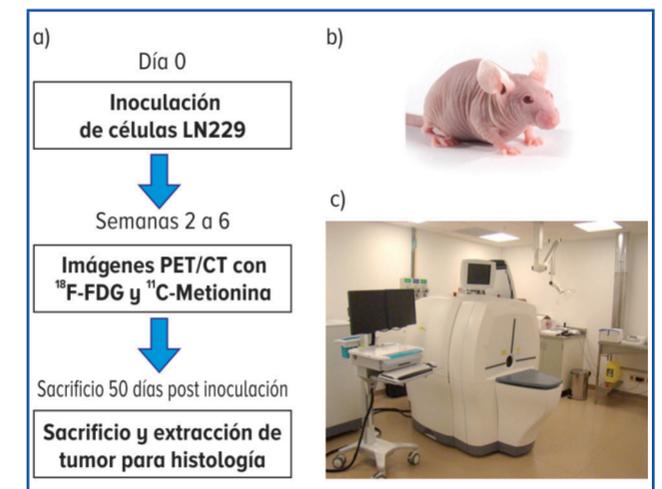


Figura 4 a) Flujo de trabajo para la optimización del tumor intracraneal en ratón Nude. b) Ratón Nude (inmunodeprimido) c) Cámara micro PET/CT

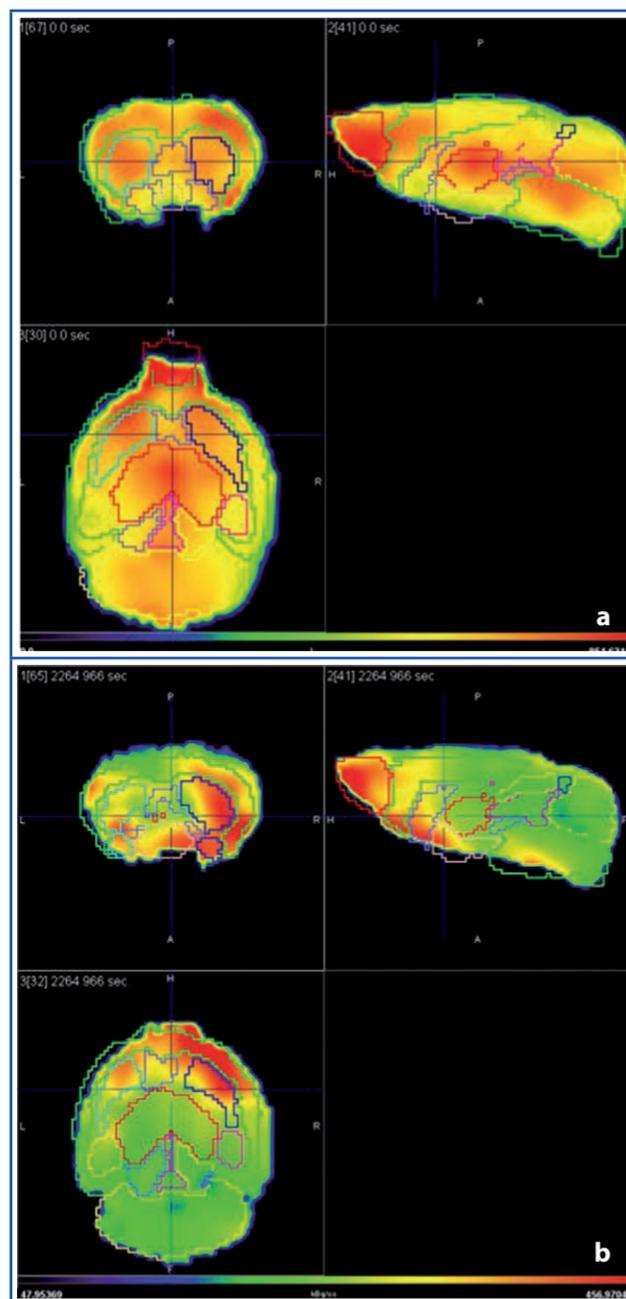


Figura 5 Imagen PET con ¹⁸F-FDG (a) y con ¹¹C-Metionina (b) de tumor intracraneal inoculado en el estriado derecho de un ratón Nude a los 30 días post-inoculación.

Estos resultados son semejantes a lo que se observan en las imágenes con estos radiofármacos en humanos y por tanto validan el modelo animal como herramienta preclínica para la patología en cuestión.

Cuando los animales son sacrificados, se obtiene la muestra del tejido tumoral para su evaluación histomorfológica, por medio de tinción con hematoxilina/eosina.

En nuestro modelo trabajamos con una línea celular humana de glioma, LN229, que no es comúnmente mencionada en la literatura científica, lo que disminuye

la posibilidad de mutaciones acumuladas. Las lesiones producidas no son encapsuladas y presentan vascularización, de acuerdo a lo que se observa en los cortes histológicos. Estas características son semejantes a las que presentan los gliomas en humanos.

Existen otros modelos animales de experimentación para glioma que presentan algunas características que no se corresponden con la patología en humanos. Por ejemplo, el grado de deriva genética de las líneas celulares más empleadas (*U87*, *U251*), el crecimiento tumoral encapsulado, la presencia o ausencia de neovascularización, se han señalado como desventajas.

El valor predictivo de la técnica requiere un número estadísticamente significativo de estudios analizados. La puesta a punto de un modelo intracraneal de glioma de origen recurso en ratón, brindará a nuestro centro un nuevo recurso para desarrollar la imagenología en neuro oncología.

Nuevos radiofármacos PET para diagnóstico de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA), es de las demencias más comunes, siendo del 40 a 50% de los casos y la cuarta causa de muerte en los países desarrollados⁽³¹⁾.

Esto se ve cada vez más incrementado debido al aumento de la esperanza de vida, y con ello del envejecimiento de la población. Uruguay no escapa a esta realidad ya que presenta una estructura de población que refleja el envejecimiento persistente, con el aumento en el peso relativo de la población de la tercera y cuarta edad, esperándose para mediados de este siglo, que la población mayor de 60 años supere el 21% del total⁽³²⁾.

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central, que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones mentales. Neuropatológicamente, se destaca por la presencia de numerosas placas de amiloide y ovillos neurofibrilares. En estos últimos años se ha comprobado que la EA presenta un importante componente neuroinflamatorio, en el que se ven comprometidas también las células gliales, en particular los astrocitos. Estos responden al daño celular mediante un proceso de reactividad en torno a las placas de amiloide⁽³³⁻³⁵⁾.

La imagenología molecular por PET es una técnica no invasiva que provee la capacidad de obtener información cuantitativa *in vivo* de diversos procesos biológicos y/o patológicos, así como el diagnóstico de numerosas patologías, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas^(36,37). Debido a ello, es una modalidad prometedora para la detección temprana y estadificación de la EA en pacientes con esta patología. En este sentido, en CUDIM se ha trabajado en el desarrollo de nuevos radiofármacos PET principalmente enfocados en la detección temprana de la neuroinflamación (*astrocitos*) y en la cascada de formación de los ovillos neurofibrilares.

Desarrollo de radiotrazadores para diagnóstico de gliopatías en Alzheimer

El desarrollo y caracterización de nuevos radiofármacos PET específicos para la identificación de células gliales con potencial patogénico (*astrocitos*), tomó como patrón de referencia al (¹¹C)deutero-L-deprenil (¹¹C)DED), radiotrazador de uso clínico para la detección de astrocitosis.

Se propuso realizar un estudio y selección de moléculas como potenciales marcadores específicos de astrocitos, comenzando por el análisis de las estructuras químicas para evaluar las posibles estrategias de marcación con radionucleidos PET. Se planteó la posterior caracterización fisicoquímica y evaluación biológica *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de los compuestos marcados.

Inicialmente se construyó el marco de referencia, optimizando un método de producción y control de calidad de (¹¹C)DED, así como realizando su caracterización biológica mediante biodistribuciones y estudios imagenológicos.

Dado que el colorante Sulforrodamina 101 (SR101) ha sido reportado como marcador específico de astrogliá, se comenzó trabajando con este compuesto.

Con la finalidad de marcar la SR101 con ¹⁸F, la misma se derivatizó mediante un linker de sulfonamida, sintetizando la SR101 N-(3-Bromopropil)-sulfonamida, así como su análogo fluorado SR101 N-(3-Fluoropropil)-sulfonamida. De este modo se logró contar con todos los estándares y precursores para la radiosíntesis y el control de calidad, que no estaban disponibles comercialmente. Seguidamente, se optimizó la marcación con ¹⁸F, así como la purificación y formulación del derivado de

SR101, obteniéndose la SR101 N-(3-(¹⁸F)-Fluoropropil)-sulfonamida (¹⁸F)2B-SRF101), en concordancia con las especificaciones establecidas en el control de calidad.

Se realizaron estudios fisicoquímicos e *in vitro*, verificando que la (¹⁸F)2B-SRF101 presentaba características apropiadas para convertirse en un radiofármaco de diagnóstico PET. Además, se confirmó que el nuevo compuesto, a pesar de las modificaciones estructurales realizadas, aún mantenía la capacidad de marcar los astrocitos. Mediante la adquisición de imágenes de fluorescencia *ex vivo* de cerebro, se verificó la capacidad de 2B-SRF101 de atravesar la barrera hematoencefálica.

En la evaluación biológica del radiofármaco se llevaron a cabo estudios *ex vivo* de biodistribución e imagenológicos *in vivo* en ratones sanos y en un modelo de ratón transgénico con EA.

Los estudios de biodistribución con (¹⁸F)2B-SRF101 permitieron evaluar el perfil farmacocinético y verificar que el mismo presenta características apropiadas para un agente de diagnóstico PET.

En los estudios imagenológicos se observó una mayor captación de (¹⁸F)2B-SRF101 en los ratones transgénicos en varias de las regiones del cerebro estudiadas con respecto al grupo control sano. En particular se observó esta diferencia en la corteza e hipocampo, zonas de particular interés, donde principalmente se desarrolla la astrocitosis en el modelo de ratón con EA utilizado (*ver figura 6*).

Considerando los datos obtenidos en la evaluación biológica de la (¹⁸F)2B-SRF101 se pudo concluir que el compuesto en estudio podría ser un potencial radiotrazador PET para la detección de astrocitosis.

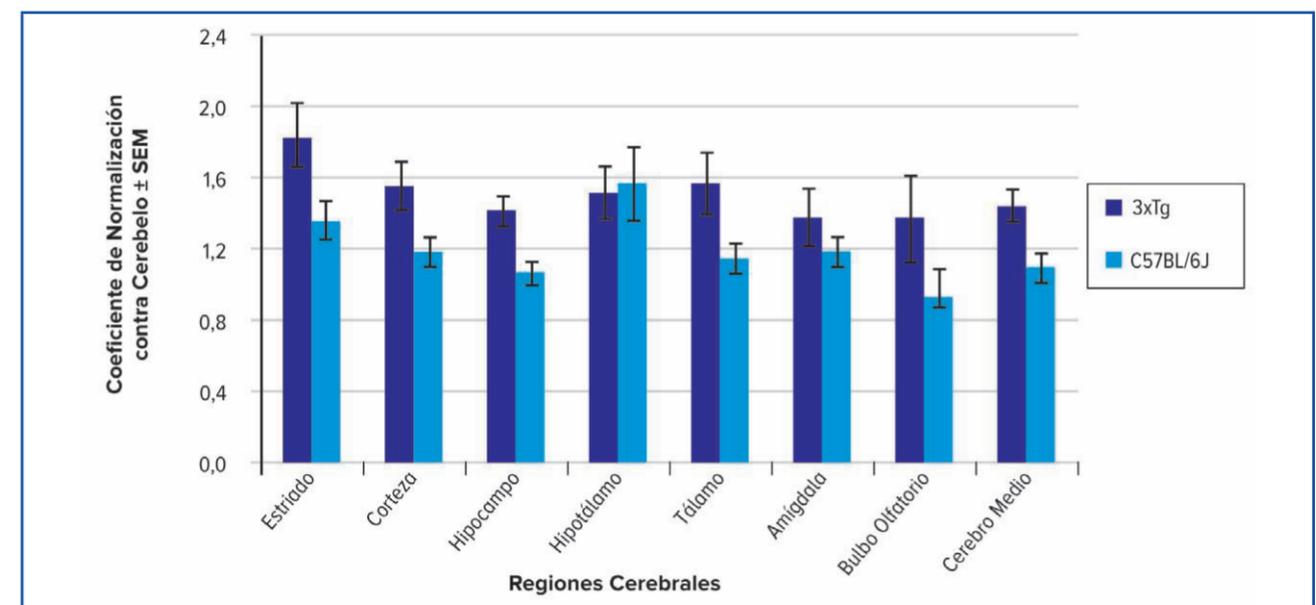


Figura 6 Coeficiente de Normalización contra Cerebelo en regiones cerebrales, del estudio con [¹⁸F]2B-SRF101, en ratones 3xTg y grupo control (n=7).

En base a la comparación de los estudios PET con (^{18}F)2B-SRF101 y con (^{11}C)DED, se concluyó que ambos radiotrazadores brindan información diferente y complementaria a la vez. Esto presentaría ventajas en un enfoque multitrazador, dado que se estaría contando con herramientas útiles para determinar los cambios neuropatológicos en la progresión de la EA.

Finalmente se realizaron estudios de toxicidad y dosimetría, verificándose que el nuevo compuesto sería un radiotrazador seguro para administrar en pacientes. De este modo, se abre paso a una posible fase clínica piloto exploratoria en voluntarios sanos y en pacientes con EA, con la finalidad de dilucidar su potencial aplicación.

Desarrollo de radiotrazadores para evaluar actividad de GSK3

Los ovillos neurofibrilares están constituidos por filamentos de proteína tau hiperfosforilada. Esta proteína se encuentra normalmente en el organismo, tanto en las neuronas, como en otras células, ya que su función fisiológica consiste en la estabilización de los microtúbulos.

Una disfunción en el metabolismo de la proteína tau a causa de su hiperfosforilación trae aparejada una mayor agregación y por lo tanto su desregulación. Esta hiperfosforilación está asociada a un aumento de la actividad de diferentes quinasas, como la GSK3. Existen principalmente 2 isoenzimas de GSK3, pero la GSK-3 β es

la que se expresa en el cerebro adulto, encontrándose de manera muy abundante en las neuronas^(38,39).

Su desregulación está asociada a numerosos daños patológicos producidos en la enfermedad de Alzheimer, como la inflamación y la pérdida de memoria. También produce hiperfosforilación de tau, aumento de la producción del péptido β -amiloide y la reducción de la síntesis de acetilcolina. Se ha localizado la presencia de GSK3 β junto a neuronas dañadas y ovillos neurofibrilares en cerebros que han sufrido la enfermedad⁽⁴⁰⁾.

Por estos motivos, la enzima GSK3, es actualmente uno de los focos de estudio a nivel mundial en Alzheimer, para poder definir completamente su rol en el desarrollo de la enfermedad, poder plantear formas de diagnóstico más tempranas y como posible blanco de terapias.

En el CUDIM, la línea de trabajo de desarrollo de nuevos radiotrazadores con afinidad por GSK3, surgió como un trabajo de colaboración entre el CUDIM y los grupos el área de Radioquímica de la Facultad de Química liderado por la Dra. Ana Rey y el Laboratorio de Química Orgánica del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias de la UdelaR liderado por el Dr. Hugo Cerecetto.

Esta línea de trabajo presenta como objetivo el de poder desarrollar nuevos trazadores con afinidad por GSK3 a fin de profundizar los conocimientos de como interviene esta enzima en la cascada de procesos metabólicos que se producen en la enfermedad y en el futuro poder

llegar a tener una herramienta más en la evaluación de los pacientes que presenten deterioro cognitivo.

Como objetivos secundarios se pretende también potenciar las capacidades de investigación en Uruguay en el área de radiofármacos para neurodegeneración así como formar nuevos investigadores en esta temática mediante estudiantes de posgrado.

Durante las investigaciones que se vienen desarrollando se ha trabajado en la síntesis de radiofármacos derivados de maleimidias que presentan unión reversible por GSK3 marcadas con ^{11}C . Para ello se seleccionaron las estructuras mostradas en la figura 7, los mismos fueron sintetizados por D. Pérez, et al y su actividad frente a GSK-3 está reportada⁽⁴¹⁾. Para ello se desarrollaron los métodos de marcación y control de calidad con el fin de poder contar con el radiofármaco en la formulación adecuada para su utilización en sistemas biológicos.

Actualmente se encuentra en curso la evaluación del radiofármaco en animales transgénicos con la triple mutación vs normales de la misma edad. Se va a evaluar el avance de la enfermedad mediante el trazador desarrollado a lo largo de la vida del animal hasta el desarrollo de la patología completa a los 15 meses. A fin de evaluar los cambios a nivel cerebral de la enzima GSK3 y su relación con la enfermedad de Alzheimer y de esta manera poder plantear a futuro el uso de este radiofármaco en humanos contando con un diagnóstico más temprano de la enfermedad.

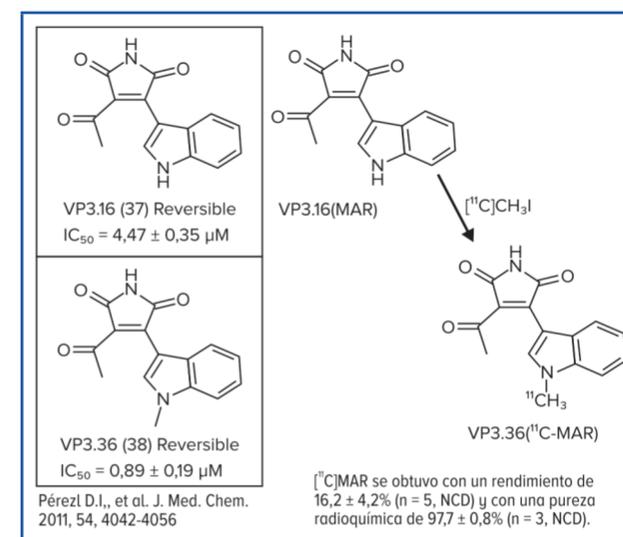


Figura 7 Estructuras y síntesis del compuesto marcado con ^{11}C -MAR

De esta manera se aspira poder colaborar en la investigación de la enfermedad con el fin de que en algún momento en el futuro se pueda detectar más temprano, para así actuar y evitar que la enfermedad avance.

Recibido: 06/08/2018
Aprobado: 23/10/2018

Bibliografía

- Ley 18172. Sala de Sesiones de la Cámara de Representantes, en Montevideo, a 22 de agosto de 2007. Publicada D.O. 7 set/007 - N° 27317
- Miguel Cantero. Tomografía por emisión de positrones: aspectos técnicos. Radiobiología, 3, (2003), 47-58.
- Protección radiológica y seguridad de las fuentes de radiación: Normas básicas internacionales de seguridad. Normas de seguridad del OIEA para la protección de las personas y el medio ambiente. Requisitos de Seguridad Generales, Parte 3. - Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA). Viena, 2016.
- Buenas prácticas de manufactura establecidas por la OMS para productos farmacéuticos estériles. Serie de Informes Técnicos de la OMS. 2011; No. 961, Anexo 6.
- U.S. Pharmacopeia-National Formulary (USP 40 NF 35), Rockville, Md: United States Pharmacopoeial Convention, Inc. <1823> Positron Emission Tomography Drugs - Information. 2017, Volume 1; pp. 2190-2201.
- European Pharmacopeia 8.0. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. Council of Europe. Radiopharmaceutical preparations and starting materials for radiopharmaceutical preparations. 2014, Volume 1; pp.1043-1114.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC cancer base no.11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.
- Barrios E, Garau M. Epidemiología del cáncer en Uruguay y el mundo. An Facultad Med (Univ Repúb Urug) 2017; 4(1):9-47.
- Jadvar H. Prostate cancer: PET with 18F-FDG, 18F- or 11C-acetate, and 18F- or 11C-choline. J. Nucl. Med. Soc Nuclear Med. 2011; 52:81-89.
- Li Z, Conti P.S. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. Adv. Drug Deliv. Rev. 2010; 62:1031-1051.
- Ceci F, Fiorentino M, Castellucci P, et al. Molecular Imaging and Precision Medicine in Prostate Cancer. PET Clin. 2017; 12:83-92.
- Castellucci P, Ceci F, Graziani T, et al. PET/CT in prostate cancer. Med. Nucl. 2015; 39:54-58.
- Sreekumar A, Poisson L, Rajendiran T, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. Nature 2009; 457:910-914.
- Song Y.H, Shiota M, Kuroiwa K, et al. The important role of glycine N-methyl-transferase in the carcinogenesis and progression of prostate cancer. Modern Pathology 2011; 24:1272-1280.
- Cernei N, Heger Z, Gumulec J, et al. Sarcosine as a Potential Prostate Cancer Biomarker - A Review. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14:13893-13908.
- Zoppolo F, Porcal W, Oliver P, et al. Automated One-pot Radiosynthesis of [^{11}C]S-adenosyl Methionine. Current Radiopharmaceuticals 2017; 10:203-211.
- García J.R., de Arcocha Torres G., Delgado-Bolton R., et al. 68Ga-PSMA PET/CT in prostate cancer. Rev Esp Med Nucl Imagen Mol. 37, 2, (2018), 130-138.
- <http://cudim.org/examenes/>. Consulta página web realizada 07/2018
- Boschi S, Lee J, Beykan S, Slavik R, et al. Synthesis and preclinical evaluation of an Al18F radiofluorinated GLU-UREA-LYS(AHX)-HBED-CC PSMA ligand. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43(12):2122-30.
- Giglio J, Zeni M, Savio E., et al. Synthesis of an Al18F radiofluorinated GLUUREA-LYS(AHX)-HBED-CC PSMA ligand in an automated synthesis platform. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry (2018) 3:4
- Denayer T, Stöhr T., Van Roy M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. New Horizons in Translational Medicine 2014. 2, 5-11.

Bibliografía

- McGonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. Biochem Pharmacol. 2014. 87, pp. 162-171.
- Mather, S. Maina, T. de Jong, M. Animal Models for Developing Radiopharmaceuticals for Therapy. Therapeutic Nuclear Medicin. (2012)
- Sausville, E. A., Burger, A. M. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. 2006. Cancer Research. 66 (2006), pp. 3351-3354.
- De Jong, M., Maina, T. Of Mice and Humans: Are They the Same? Implications in Cancer Translational Research 2010. J. Nuc Med. 51, 501-504
- Herholz, K. Brain Tumors: An Update on Clinical PET Research in Gliomas 2017. Sem. Nucl. Med. 47, pp. 5-17.
- Alonso O. Impacto clínico de la tomografía de emisión por positrones (PET) en pacientes oncológicos y su potencial aplicación en el contexto sanitario y académico nacional. Revista Médica del Uruguay. 2006; 22: 169-78.
- Palanichamy, K., A. Chakravarti, A. Diagnostic and Prognostic Significance of Methionine Uptake and Methionine Positron Emission Tomography Imaging in Gliomas 2017. Frontiers in Oncology. 7
- Ribom, D., Engler, H., Blomquist, E., et al. Potential significance of (^{11}C)-methionine PET as a marker for the radiosensitivity of low-grade gliomas 2002. EJNMMI. 29, 632-40
- Vasilskis, E., Kreimerman, I., Olivera, S., et al. (2017). Comparative in Vitro Study of ^{11}C -Methionine and ^{11}C -Deuteroprenyl Uptake in Three Human Glioma Cell Lines. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals 32.
- Álvarez Sánchez M., Pedrosa I., de la Fe A., et al. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. Rev. Mex. Neuroci. 2008; 9(3):196-201.
- <https://www.cepal.org/es/enfoques/proceso-envejecimiento-demografico-uruguay-sus-desafios>. El proceso de envejecimiento demográfico en el Uruguay y sus desafíos. Consulta realizada 07/2018.
- Svedberg M, Hellstrom-Lindahl E, Rahman O, et al. Amyloid imaging PET ligands as biomarkers for Alzheimer's Disease, preclinical evaluation. PET- Current Clinical and Research Aspects. 2012; 10: 254-274.
- Nordberg A. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. The Lancet Neurology. 2004; 3 (9): 519-527.
- Olsen M, Aguilar X, Sehlin D, et al. Astroglial responses to Amyloid-Beta progression in a mouse model of Alzheimer's disease. Molecular Imaging and Biology. 2017. doi: 10.1007/s11307-017-1153-z.
- Mikla, V.I, Mikla, V.V. Positron Emission Tomography In: Medical Imaging Technology. Elsevier Insights. 2014; 53-64.
- Li Z, Conti P.S. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. Advanced Drug Delivery Reviews. 2010; 62: 1031-1051.
- Salomone S., Caraci F., Leggio G.M., et al. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. Br. J. Clin. Pharmacol. 2011; 73(4): 504-517.
- Kumar A, Singh A, Ekavali I. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacological Reports, 2015, 67: 195-203
- Medina M., Wandosell F. Deconstructing GSK-3: The fine regulation of its activity. Int. J. Alzheimer's Disease. 2011; 2011:1-12.
- Perez I., Palomo V., Pérez C., et al. Switching Reversibility to Irreversibility in Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors: Clues for Specific Design of New Compounds. J. Med. Chem., 2011, 54:4042-4056.