



Universidad Autónoma del Estado de México



FACULTAD DE QUÍMICA

Síntesis y caracterización de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-D-Ala-BoroPro
y ^{68}Ga -DOTA-D-Ala-BoroPro como sistemas de reconocimiento
específico en células con sobreexpresión de FAP

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

M. en C.Q. DIANA SARAHÍ TRUJILLO BENÍTEZ

Dirigido por:

Dra. Myrna Alejandra Luna Gutiérrez (ININ)

Dra. Guillermina Ferro Flores (ININ)

Dr. Enrique Morales Avila (UAEMéx)

Toluca Estado de México, noviembre de 2024



ININ



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos de la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares bajo la dirección académica de la Dra. en C. Myrna Alejandra Luna Gutiérrez y con el apoyo de Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COM ECyT) a través del programa de financiamiento para mujeres científicas EDOMEX, subsidio número FICDTEM 2021-008.

Índice.....Pág.

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS	7
1 RESUMEN	8
2 ABSTRACT.....	10
3 MARCO CONCEPTUAL	12
3.1 Introducción	13
3.2 Objetivos	15
3.3 Justificación	17
3.4 Hipótesis	19
4 MARCO TEÓRICO	20
4.1 Cáncer.....	21
4.2 Cardiopatías.....	23
4.3 Imagen molecular.....	25
4.4 Medicina nuclear	26
4.5 FAP.....	31
4.6 FAPIs	37
4.7 Consideraciones éticas	39
5 MARCO METODOLÓGICO	41
5.1 Evaluación de afinidad de la proteína FAP con los sistemas HYNIC-Ala-boroPro y DOTA- HYNIC-Ala-boroPro.	42
5.2 Síntesis Química y Marcado de iFAP y DOTA-iFAP	43
5.3 Caracterización Físicoquímica de los sistemas ^{99m} Tc-iFAP y ⁶⁸ Ga-iFAP	47
5.4 Eficiencia de radiomarcado de ^{99m} Tc-iFAP y ⁶⁸ Ga-DOTA-iFAP	47
5.5 Evaluación <i>in vitro</i> del sistema ^{99m} Tc-iFAP.....	48
5.6 Evaluación <i>in vitro</i> del sistema ⁶⁸ Ga-DOTA-iFAP.	49
5.7 Evaluación <i>in vivo</i> del sistema ^{99m} Tc-iFAP.....	51
5.8 Evaluación <i>in vivo</i> del sistema ⁶⁸ Ga-DOTA-iFAP.	53
5.9 Evaluación <i>ex vivo</i> del sistema ⁶⁸ Ga-DOTA-iFAP.....	53
5.10 Evaluación clínica del sistema ⁶⁸ Ga-iFAP.	54
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
6.1 Modelado molecular	57
6.2 Caracterización Físicoquímica del sistema ^{99m} Tc-iFAP.....	60
6.3 Evaluación <i>in vitro</i> de ^{99m} Tc-iFAP	63
6.4 Evaluación <i>in vivo</i> de ^{99m} Tc-iFAP.....	66
6.5 Generación de imagen	68
6.6 Evaluación físicoquímica de ⁶⁸ Ga-DOTA-iFAP.....	69
6.7 Evaluación <i>in vitro</i> del sistema ⁶⁸ Ga-DOTA-iFAP	74
6.8 Evaluación <i>in vivo</i> de ⁶⁸ Ga-DOTA-iFAP	77
6.9 Evaluación <i>ex vivo</i> de ⁶⁸ Ga-DOTA-iFAP	78
6.10 Evaluación clínica del sistema ⁶⁸ Ga-iFAP.	80
7 CONCLUSIONES.....	83
8 ANEXOS.....	84
9 REFERENCIAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes factores que generan mutaciones y alteran el ciclo celular, lo que ocasiona cambios en las células transformándolas en células tumorales con potencial de invadir tejido sano.	22
Figura 2. Técnicas de imagen nuclear: A) SPECT y B) PET	27
Figura 3. Representación del daño al ADN generado por las diferentes partículas de emisión de los radionúclidos. Las partículas α y los e^- tienen mayor interacción con la materia en comparación con las partículas β ; los rayos γ son de baja interacción y atraviesan la materia.....	28
Figura 4. Estructura y ejemplos de: A. Primera generación, B. Segunda generación y C. Tercera generación de los radiofármacos.	31
Figura 5. A) Representación de la actividad dipeptidil peptidasa, B) Estructura de FAP, C) Representación de la actividad endopeptidasa, D) Sitio activo de FAP y E) sitio activo de DPP4...	33
Figura 6. Representación del Microambiente tumoral (TME) y las células que lo constituyen.	35
Figura 7. Interacción del aminoácido Serina del sitio Activo de FAP con: A) Sustrato, B) inhibidores a base de ácido Bórico y C) Inhibidores a base nitrilo.....	37
Figura 8. Ejemplo de la estructura de los inhibidores de FAP. A) ARI-3099, con anillo de pirrolidina y ácido bórico y B) 6-metoxi-N-4-quinolinoil-Gly-(2S)- 2-ciano-4,4-difluoropyrrolidina, con anillo de pirrolidina y grupo Nitrilo.	38
Figura 9. Estructura química del radiofármaco FAPI-04.....	39
Figura 10. Ruta de síntesis de ^{99m}Tc -iFAP y de ^{68}Ga -DOTA-iFAP. a: (1) s-buLi, THF seco, -72°C , 3 h, (2) $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$, (3) NaOH y HCl; b: (1) (+)pinanediol, Et_2O , 2h, (2) extracción silica gel (Hexano: EtOAc 6:1), (3) EtOAc/HCl seco, (4) Separación de R y S (10 μm Lx I.D. 25 cm 4.6 mm; en: etil-ter-butyl éter: Hexano 1:9); c: (1) EtOAc/HCl seco d: (1) Boc-D-alanina. CH_2Cl_2 , HOBT, EDC, 2h, 0°C ; e: (1) EtOAc/HCl seco; f: (1) 6, H_2O , (2) $\text{PhB}(\text{OH})_2$, hexano, 24 h; g: (1) Succinimidyl-N-Boc-HYNIC, DIPEA, DMF, 0°C , 2h, 7; (2) THA Concentrado; h: (1) EDDA/Tricina, (2) $^{99m}\text{TcO}_4^-/\text{SnCl}_2$, 92°C , 20 min; g: (1) p-NCS-Bz-DOTA, 90°C , 60 min, (2) $^{68}\text{GaCl}_3$, CH_3COH pH: 5.0, 95°C , 30 min.	46
Figura 11. Modelado molecular: (a) interacción de iFAP en el sitio active de FAP (b) mapeo de interacciones entre iFAP y los residuos de aminoácidos de FAP.	59
Figura 12. Modelado molecular: (a) interacción de DOTA-iFAP en el sitio active de FAP (b) mapeo de interacciones entre DOTA-iFAP y los residuos de aminoácidos de FAP.	59
Figura 13. Espectro UV-vis de iFAP	60
Figura 14. Espectro FT-IR de iFAP.	61
Figura 15. Cromatograma HPLC de iFAP.....	62
Figura 16. Cromatograma radio-HPLC de ^{99m}Tc -iFAP	62
Figura 17. Espectro de masas de iFAP.....	63
Figura 18. Ensayo de Western blot para las células N30 FAP + (tumor primario estromal) y fibroblastos humanos FAP -. GAPDH fue utilizada como control de peso molecular.	64
Figura 19. Campos microscópicos de 40x. (a,d) Núcleos de las células N30 FAP +, (b) Lu_2O_3 -iFAP (e) Lu_2O_3 (Control) (c, e) imágenes fusionadas.	65
Figura 20. Captación e internalización de ^{99m}Tc -iFAP en células N30 FAP + y Fibroblastos humanos FAP- (n=6). Diferencia significativa $p < 0.05$ t-student.	66
Figura 21. Modelo biocinético de ^{99m}Tc -iFAP en los 4 órganos principales: Sangre, tumor, riñón e hígado.	68

Figura 22. Imágenes Micro-SPECT/CT de ^{99m}Tc -iFAP en un ratón desnudo con tumor Hep-G2 inducido a (a) 30 min (SUV máx. de 5.6) y (b) 24 h (SUV máx. de 2.4) después de la administración del radiofármaco. El muslo izquierdo, donde se indujo un proceso inflamatorio con bacterias muertas (control negativo), no se observó captación del radiotrazador.....	69
Figura 23. Espectro UV-Vis de iPAF y DOTA-iFAP.....	70
Figura 24. Espectro FT-IR de: (a) iFAP, (b) DOTA-iFAP.....	71
Figura 25. Cromatograma HPLC de iFAP y DOTA-iFAP.....	72
Figura 26. Cromatograma radio-HPLC de ^{68}Ga -DOTA-iFAP.....	72
Figura 27. Espectro de masas: (a) iFAP, (b) DOTA-iFAP.....	73
Figura 28. Ensayo de afinidad de ^{68}Ga -DOTA-iFAP (420nmol/GBq) con 12 concentraciones del péptido no marcado DOTA-iFAP en células HCT116 (1×10^5 células/placa). ^{68}Ga -DOTA-iFAP $\text{IC}_{50}=5.7 \times 10^{-10}$ M (0.57nM).....	74
Figura 29. Micrografías de inmunofluorescencia para las células HCT116 (arriba), demostrando la expresión positiva de FAP y células AR42J (abajo) con baja expresión de FAP.....	75
Figura 30. Ensayo de western blot que demuestra la expresión de FAP de las células HCT116 en comparación con las células AR42J. Se utilizó anticuerpo de B-Actina control de peso molecular.....	75
Figura 31. Relación de la captación e interacción de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en las células HCT116 respecto a las células AR42J como relación de la actividad de ^{68}Ga	76
Figura 32. Biodistribución de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en ratones con tumores de cáncer de colon HCT116 a 0,5, 1 (con receptores bloqueados y desbloqueados) y 3 h después de la administración.....	77
Figura 33. Micrografía de inmunohistoquímica del tumor HCT116 <i>ex vivo</i> que demuestra la expresión de FAP (color marrón).....	78
Figura 34. Imágenes de rayos X/radioisotópicas/ <i>ex vivo</i> de la captación de ^{68}Ga -iFAP en un modelo de ratón infartado (tratado con isoproterenol) (izquierda) y en un ratón no tratado (derecha) 0,5 h después de la administración del radiotrazador.....	79
Figura 35. a) un ratón tratado con isoproterenol con un alto nivel de expresión de FAP (color marrón) y b) un ratón no tratado (sin sobreexpresión de FAP).....	79
Figura 36. ^{68}Ga -iFAP/PET (anterior y lateral) de sujetos sanos a las 0,5 h y 1 h después de la administración intravenosa del radiotrazador (185 MBq).....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características radiológicas de ^{99m}Tc y ^{68}Ga	29
Tabla 2. Ejemplos de Agentes Quelantes Bifuncionales (BFCA).....	30
Tabla 3. Comparación de las afinidades, K_i y distancia de enlace de los ligandos evaluados por docking y la proteína FAP.....	58
Tabla4. Biodistribución de ^{99m}Tc -IFAP in ratones con tumores (Hep-G2) inducidos, indicado como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g).	67

ABREVIATURAS

^{68}Ga -iFAP: ^{68}Ga -DOTA-D-Ala-boroPro.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-D-Ala-boroPro

BFCA: Agente quelante bifuncional

CT: Tomografía computarizada

DDP: Dipeptidilpeptidasa

DOTA: 1,4,6,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico

DOTA-iFAP: DOTA-D-Ala-boroPro.

ECM: Matriz extracelular

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EDDA: ácido etilenodiamina-NN'-diacético

FAP: Proteína activadora de fibroblastos.

FAPI: Inhibidor de la proteína activadora de fibroblastos

GIP: Peptido insulínico dependiente de glucosa

GLP-1: Peptido 1 similar al glucagón

HATU: Hexafluorofosfato O-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio

HYNIC: ácido hidrazinonicotínico

iFAP: HYNIC-D-Ala-boroPro

IM: Infarto al miocardio

ININ: Instituto Nacional de investigaciones nucleares

Ki: Constante de inhibición

LET: Transferencia de energía lineal

mMRI: Imagen molecular por Resonancia Magnética

OMI: Imagen Molecular Óptica

P.R.: Pureza Radioquímica

PET: Tomografía por Emisión de Positrones.

PREP: Prolil endopeptidasa

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RX: Rayos X

SPECT: Tomografía computarizada por emisión de fotón único.

TME: Microambiente tumoral

UFF: Campo de fuerza universal

1 RESUMEN

La proteína de activadora de fibroblastos (FAP) se encuentra presente en el microambiente de la mayoría de los tumores epiteliales humanos. Los inhibidores de FAP, marcados con ^{68}Ga y basados en la estructura de cianopirrolidina (FAPI), se utilizan actualmente para la detección del microambiente tumoral a través de imágenes PET. Este estudio se propuso diseñar, sintetizar y evaluar preclínicamente un nuevo radiofármaco inhibidor de FAP con la estructura del ácido $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -((R)-1-((6hidrazinilnicotinoil)-D-alanil)pirrolidin-2-il)borónico ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP) para imágenes SPECT. La afinidad se calculó mediante acoplamiento molecular utilizando el software AutoDock.

La síntesis química consistió en una serie de reacciones de acoplamiento del ácido 6-hidrazinilnicotínico (HYNIC) y D-alanina a un derivado del ácido borónico. El iFAP se formuló como un liofilizado basado en EDDA/ SnCl_2 para su marcaje con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La P.R. se verificó con radio-HPLC de fase reversa. La captación celular *in vitro* se evaluó usando células del estroma endometrial N30 (positivas para FAP) y fibroblastos humanos (negativos para FAP). La biodistribución y captación tumoral se estudiaron en ratones nu/nu con tumores Hep-G2, obteniéndose imágenes mediante micro-SPECT/CT.

El ligando iFAP ($K_i = 0.536 \text{ nM}$, afinidad AutoDock), caracterizado por espectroscopías UV-Vis, FT-IR y UPLC, se sintetizó con una pureza química del 92 %. El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP se obtuvo con una pureza química superior al 98 %. Los estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron un reconocimiento específico de FAP, alta captación tumoral ($7.05 \pm 1.13 \text{ \% ID/g}$ a los 30 min) y rápida eliminación renal. Los resultados de esta investigación justifican estudios clínicos y dosimétricos adicionales para confirmar la sensibilidad y especificidad del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP.

Otro objetivo de esta investigación fue sintetizar ^{68}Ga -[2,2',2'',2'''-(2-(4-(2-(5-(((S)-1-((S)-2-boropirrolidin-1-il)-1-oxopropan-2-il)carbamoil)piridin-2-il)hidrazina-1-carbotioamido)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraol)ácido tetraacético] (^{68}Ga -DOTA-D-Alanina-Boro Pro)(^{68}Ga -DOTA-iFAP) como un nuevo radiotrazador para imágenes PET, y evaluar su eficacia en la detección de FAP en tejidos malignos y no malignos. La síntesis química y el marcaje con ^{68}Ga se llevaron a cabo mediante el acoplamiento de *p*-SCN-benceno DOTA con HYNIC-iFAP. La P.R. fue verificada con radio-HPLC. Se evaluó la especificidad de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en células HCT116, confirmándose la expresión de FAP por inmunofluorescencia y Western blot. Los estudios de biodistribución y

biocinética se realizaron en modelos murinos. También se evaluó la captación de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en tejido miocárdico de ratones con infarto inducido. Las primeras imágenes en humanos con ^{68}Ga -DOTA-iFAP se obtuvieron en sujetos sanos y pacientes con infarto de miocardio, glioblastoma, cáncer de próstata y cáncer de mama. DOTA-D-Alanina-BoroPro se preparó con una pureza química del 98 % y se caracterizó mediante espectroscopía de masas UPLC, FT-IR y UV-Vis. El ^{68}Ga -DOTA-iFAP se obtuvo con una P.R. superior al 95 %. Los estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron que ^{68}Ga -DOTA-iFAP tiene un reconocimiento específico de FAP, una rápida eliminación renal y una visualización adecuada del glioblastoma, tumor de mama, cáncer de próstata y sitios de infarto de miocardio. Los resultados de esta investigación respaldan la realización de más ensayos clínicos y estudios de dosimetría para confirmar la especificidad y sensibilidad de las imágenes PET con ^{68}Ga -DOTA-iFAP para la expresión de FAP.

En conclusión, se realizó la síntesis de los sistemas $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA-D-Ala-boroPro y ^{68}Ga -DOTA-D-Ala-boroPro los cuales mostraron reconocimiento específico a FAP. Estos sistemas pueden ser utilizados para el diagnóstico de diferentes tipos de cáncer con sobreexpresión de FAP, así como patologías relacionadas con la activación de sobreexpresión de FAP como es el caso del infarto agudo a miocardio.

2 ABSTRACT

Fibroblast activation protein (FAP) is present in the microenvironment of most human epithelial tumors. FAP inhibitors, labeled with ^{68}Ga and based on the cyanopyrrolidine (FAPI) structure, are currently used for detection of the tumor microenvironment via PET imaging. This study aimed to design, synthesize and preclinically evaluate a new FAP inhibitor radiopharmaceutical with the structure of $^{99\text{m}}\text{Tc}-((\text{R})-1-((6\text{-hydrazinyl}(\text{nicotinoyl})\text{-D-alanyl})\text{pyrrolidin-2-yl})\text{boronic acid}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc-iFAP}$) for SPECT images. Affinity was calculated by molecular docking using AutoDock software.

The chemical synthesis consisted of a series of interaction reactions of 6-hydrazinyl nicotinic acid (HYNIC) and D-alanine to a boronic acid derivative. The iFAP was formulated as a lyophilisate based on EDDA/ SnCl_2 for labeling with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Radiochemical purity (R.P.) was verified with reversed-phase radio-HPLC. *In vitro* cellular uptake was assessed using N30 endometrial stromal cells (FAP positive) and human fibroblasts (FAP negative). Biodistribution and tumor uptake were studied in nu/nu mice with Hep-G2 tumors, obtaining images using micro-SPECT/CT.

The iFAP ligand ($K_i = 0.536 \text{ nm}$, AutoDock affinity), characterized by UV-Vis, FT-IR, UPLC-mass spectroscopy, was synthesized with a chemical purity of 92 %. The $^{99\text{m}}\text{Tc-iFAP}$ was obtained with a R.P. greater than 98 %. *In vitro* e *in vivo* studies showed specific recognition of FAP, high tumor uptake ($7.05 \pm 1.13\% \text{ ID/g}$ at 30 min). and rapid renal elimination. The results of this investigation justify additional clinical and dosimetric studies to confirm the sensitivity and specificity of $^{99\text{m}}\text{Tc-iFAP}$.

Another objective of this research was to synthesize $^{68}\text{Ga}-[2,2',2'',2''']-(2-(4-(2-(5-(((\text{S})-1-((\text{S})-2\text{-boropyrrolidin-1-yl})-1\text{-oxopropan-2-yl})\text{carbamoyl})\text{pyridin-2-yl})\text{hydrazine-1-carbothioamido})\text{benzyl})-1,4,7,10\text{-tetraazacyclododecane-1,4,7,1-tetrayl})\text{tetraacetic acid}]$ ($^{68}\text{Ga-DOTA-D-Alanine-BoroPro}$) ($^{68}\text{Ga-DOTA-iFAP}$) as a new radiotracer for PET imaging, and evaluate its effectiveness in detecting FAP in malignant and non-malignant tissues. Chemical synthesis and ^{68}Ga labeling were carried out by coupling p-SCN-benzene DOTA with HYNIC-iFAP.

Radiochemical purity was verified with radio-HPLC. The specificity of $^{68}\text{Ga-DOTA-iFAP}$ was evaluated in HCT116 cells, confirming the expression of FAP by immunofluorescence and Western blot. Biodistribution and biokinetics studies were performed in murine models. The uptake of $^{68}\text{Ga-DOTA-iFAP}$ was also evaluated in myocardial tissue from mice with induced infarction. The first

human images with ^{68}Ga -DOTA-iFAP were obtained in healthy subjects and patients with myocardial infarction, glioblastoma, prostate cancer, and breast cancer. DOTA-D-Alanine-BoroPro was prepared at 98% chemical purity and characterized by UPLC, FT-IR, and UV-Vis mass spectroscopy. ^{68}Ga -DOTA-iFAP was obtained with a radiochemical purity greater than 95%. *In vitro* and *in vivo* studies showed that ^{68}Ga -DOTA-iFAP has specific FAP recognition, rapid renal clearance, and adequate visualization of glioblastoma, breast tumor, prostate cancer, and myocardial infarction sites. The results of this investigation support further clinical trials and dosimetry studies to confirm the specificity and sensitivity of ^{68}Ga -DOTA-iFAP PET imaging for FAP expression.

In conclusion, the synthesis of the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA-D-Ala-boroPro and ^{68}Ga -DOTA-D-Ala-boroPro systems was performed, which showed specific recognition to FAP. These systems can be used for the diagnosis of different types of cancer with FAP overexpression, as well as pathologies related to the activation of FAP overexpression, such as acute myocardial infarction.

3 MARCO CONCEPTUAL

3.1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, aunque los tratamientos como la quimioterapia y radioterapia presentan buenos resultados en el control de la enfermedad, tienen como inconvenientes el daño que provocan al tejido sano. El diagnóstico del cáncer en sus estadios más tempranos es de suma importancia porque con ello se incrementa de forma significativa el éxito de los tratamientos [1].

Los radiofármacos de reconocimiento específico son sistemas conformados por compuestos que interaccionan con blancos moleculares (proteínas alteradas o sobreexpresadas en las células tumorales). En la medicina nuclear son utilizados como agentes de diagnóstico cuando están constituidos por radionúclidos emisores de rayos gamma o partículas β^+ que pueden ser detectados mediante técnicas como SPECT y PET respectivamente, mientras que para un enfoque terapéutico están los emisores de partículas α , β^- o electrones de Auger que en las dosis correctas tiene la capacidad de dañar de forma irreparable el tejido al que van dirigidos. Estos radiofármacos han permitido la detección temprana de cáncer y de otras enfermedades incluso cuando no es posible con técnicas de imagen como tomografía y resonancia magnética nuclear, además su uso terapéutico disminuye los inconvenientes de la quimioterapia[2].

Las técnicas de SPECT y PET comparten el objetivo de proporcionar información funcional y estructural, ya que permiten la generación de imagen al detectar las zonas de emisión de los rayos gamma para SPECT y de los positrones para el caso de PET, suelen ir complementadas con imagen por CT, pero existen diferencias significativas entre ellas. El PET al utilizar radionúclidos que emiten positrones, resulta en una mayor resolución espacial y sensibilidad en comparación con SPECT. Además, PET tiene una mayor capacidad para cuantificar la actividad metabólica y la cinética de las moléculas estudiadas. Sin embargo, el SPECT es más ampliamente accesible y económico, lo que lo convierte en una opción atractiva en ciertos escenarios clínicos. La elección entre PET y SPECT depende de la aplicación específica, la disponibilidad de recursos y los objetivos de investigación. Es relevante indicar que, si bien PET/CT y SPECT/CT suelen ser comparadas como modalidades separadas, también es posible combinar las modalidades (SPECT/PET/CT) en un solo sistema de imágenes. Esta combinación de técnicas permite obtener una información complementaria y aumentar la precisión diagnóstica al fusionar las imágenes [3].

La proteína FAP, es una serina-proteasa que ha cobrado gran interés en la última década porque se ha encontrado su sobreexpresión en los fibroblastos estromales reactivos en más del 90 % de

carcinomas epiteliales y está asociada con un mal pronóstico en tumores de carcinoma de colon, páncreas, ovario y hepatocelular. También se expresa en procesos de cicatrización de heridas, en sitios de inflamación, incluida la artritis y en placas ateroscleróticas [4]. Estas circunstancias han impulsado el desarrollo de moléculas específicas de inhibición de FAP (FAPI). Sin embargo, se ha observado que la simple inhibición de FAP no es suficiente para lograr un cambio significativo en la disminución de la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, los diferentes FAPIs se utilizan en su mayoría con un enfoque diagnóstico, y también terapéutico cuando el FAPI actúa como portador de una molécula con actividad farmacológica, lo cual permite aumentar la efectividad del tratamiento [5].

En el caso del cáncer, en la medicina nuclear se han desarrollado radiofármacos selectivos de FAP tanto para diagnóstico con el uso de SPECT[6], [7] y PET [8] como para terapia utilizando ^{177}Lu y ^{225}Ac [5]. Se prevé que la utilización de imágenes basadas en radiofármacos selectivos a FAP reemplace potencialmente otros radiofármacos comúnmente utilizados en entornos clínicos. Esto se debe a la comodidad que ofrece al agilizar la integración del diagnóstico y el tratamiento porque permite contar un sistema teranóstico [9].

En días recientes se ha enfocado el uso de radiofármacos a base de FAPIs para determinar el riesgo de fibrosis excesiva después de un Infarto al miocardio (MI), debido a que los fibroblastos reactivos, son los que modulan la fibrosis cardíaca y por consecuencia el remodelamiento del tejido post infarto. Estos sistemas brindan información sobre el progreso de la fibrosis y permiten tener un estimado de supervivencia de los pacientes después de sufrir un IM [10].

El presente trabajo propone la síntesis de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-D-Ala-boroPro ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP) y de ^{68}Ga -D-Ala-boroPro (^{68}Ga -DOTA-iFAP) como sistemas de reconocimiento específico para la detección mediante SPECT y PET de los diferentes tipos de sitios positivos a la sobreexpresión de FAP.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar los sistemas ^{99m}Tc -EDDA-D-Ala-boroPro y ^{68}Ga -DOTA-D-Ala-boroPro como radiofármacos específicos para el reconocimiento de FAP, con el objetivo de evaluar su potencial uso en el diagnóstico de cáncer y otras enfermedades con sobreexpresión de FAP.

3.2.2 Objetivos Específicos.

3.2.2.1 Realizar evaluación de afinidad mediante docking molecular de los sistemas HYNIC-Ala-boroPro y DOTA- HYNIC-Ala-boroPro en comparación con ARI-3099 y FAPI-04, respectivamente.

3.2.2.2 Realizar la síntesis y caracterización fisicoquímica del sistema HYNIC-Ala-boroPro. Configuración R.

3.2.2.3 Realizar la síntesis y caracterización fisicoquímica del sistema DOTA-HYNIC-Ala-boroPro.

3.2.2.4 Radiomarcarse a HYNIC-Ala-boroPro con ^{99m}Tc .

3.2.2.5 Radiomarcarse a DOTA- HYNIC-Ala-boroPro con ^{68}Ga .

3.2.2.6 Realizar la evaluación de la eficiencia del radiomarcado de los sistemas ^{99m}Tc -iFAP y de ^{68}Ga -iFAP.

3.2.2.7 Realizar la evaluación *in vitro* del sistema ^{99m}Tc -iFAP con las siguientes pruebas:

- Evaluación de la expresión de FAP en células N30 mediante western blot
- Captación e internalización en células N30 (FAP +), utilizando como control negativo células de fibroblastos (FAP -).

3.2.2.8 Evaluación *in vivo* con la determinación de la biodistribución y generación de imagen del sistema ^{99m}Tc -iFAP en ratones con tumores inducidos utilizando células Hep-G2 (positivas a FAP).

3.2.2.9 Evaluar *in vitro* del sistema ^{68}Ga -DOTA-iFAP con las siguientes pruebas:

- Evaluación de la expresión de FAP en células HCT116 mediante western blot
- Evaluación de la expresión de FAP en células HCT116 (FAP+) y AR42J (FAP -) por inmunofluorescencia.

- Evaluación de la afinidad en células HCT116 (FAP+).
- Captación e internalización en células HCT116 (FAP +), utilizando como control negativo células de AR42J (FAP -).
- Evaluación de la afinidad en células HCT116

3.2.2.10 Evaluar *in vivo* con la determinación de la biodistribución y generación de imagen del sistema ^{68}Ga -DOTA-iFAP en ratones con tumores inducidos de células HCT116 (positivas a FAP).

3.2.2.11 Evaluación *ex vivo* de la captación del sistema ^{68}Ga -DOTA-iFAP en corazón infartado en modelo murino mediante la generación de imagen.

3.2.2.12 Evaluar *ex vivo* de la captación del ^{68}Ga -DOTA-iFAP mediante inmunohistoquímica

3.2.2.13 Evaluar clínica de la captación del sistema ^{68}Ga -DOTA-iFAP en un paciente con infarto al miocardio y 2 pacientes diagnosticados con cáncer (glioblastoma y cáncer de mama).

3.3 JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre radiofármacos basados en el reconocimiento de blancos moleculares para el tratamiento de diversos tipos de cáncer es de interés mundial en el ámbito de la salud humana. En particular, en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER-CONACyT) que se encuentra adscrito a la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) se han producido y patentado sistemas como ^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-iPSMA y ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA-BN, como blancos de reconocimiento molecular específico para la detección de cáncer de próstata y radioterapia dirigida en tumores sólidos.

Se ha observado la sobreexpresión de FAP en el 95 % de los fibroblastos reactivos en cáncer y es asociada con la formación de angiogénesis y metástasis, sin embargo, se sabe que la inhibición de FAP no genera cambios significativos en el progreso de la enfermedad. También se ha encontrado su sobreexpresión en miofibroblastos involucrados en los infartos a miocardio, en esta situación su sobreexpresión se correlaciona con mal pronóstico en la recuperación de la funcionalidad del corazón. En este contexto el desarrollo de moléculas con propiedad inhibidora de FAP para su potencial uso como fármacos de reconocimiento específico es un área de amplia investigación. Sin embargo, no hay mucho desarrollo de inhibidores de FAP marcados con radionúclidos para su uso como radiofármacos.

El uso de radiofármacos con reconocimiento selectivo a FAP posibilitaría la obtención de imágenes de zonas con sobreexpresión de FAP que podrían no ser detectadas mediante imágenes convencionales, ya sea en el cáncer o en el pronóstico de la recuperación de un infarto de miocardio. Esto permitiría diagnosticar el cáncer en etapas donde los tratamientos curativos sean posibles, así como el diagnóstico del estado de infarto de miocardio, lo que ayudaría a definir el tratamiento más efectivo.

La elección entre PET y SPECT como técnica de diagnóstico en la medicina nuclear obedece a múltiples factores, sin embargo, en el desarrollo de radiofármacos siempre se busca que la molécula de reconocimiento específico pueda conjugarse con los diferentes radionúclidos que permitan la obtención de imagen por ambas técnicas, así como para su uso terapéutico.

En esta investigación, se pretende establecer rutas de síntesis prácticas y escaladas de los péptidos HYNIC-Ala-boroPro y DOTA-HYNIC-Ala-boroPro marcados con ^{99m}Tc y ^{68}Ga respectivamente,

para su posible uso como radiofármacos de reconocimiento específico en el diagnóstico de los diferentes tipos de cáncer que sobreexpresante FAP y del estado de IM con activación de miofibroblastos (FAP+).

3.4 HIPÓTESIS

Los radiotrazadores ^{99m}Tc -HYNIC-D-Ala-boroPro y ^{68}Ga -DOTA-HYNIC-Ala-boroPro se unirán a la Proteína Activadora de Fibroblastos con alta afinidad, lo que permitirá la obtención de imágenes moleculares SPECT y PET de la sobre expresión.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que afecta la salud de todas las sociedades humanas ocupando el segundo lugar en mortalidad a nivel mundial sólo por debajo de las cardiopatías isquémicas. Los datos estadísticos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que en 2020 hubo un total de 19.3 millones de nuevos casos y 9.95 millones de muertes por cáncer [1]. En hombres los tipos de cáncer más comunes son: próstata, pulmón, bronquios, colon, recto y vejiga; mientras que en las mujeres son: seno, pulmones, colon, recto, útero y tiroides; en niños son las leucemias, cáncer en cerebro y ganglios linfáticos [11].

El cáncer es un proceso multifactorial desarrollado en varios eventos fisiológicos, que inicia con alteraciones en los mecanismos de regulación en la replicación genética y mutaciones en el ADN, lo cual a su vez genera alteraciones en el crecimiento, división y desarrollo de las células generando resistencia a la apoptosis, activación de angiogénesis y metástasis. A medida que se forma una masa de las células alternadas (tumor), el tejido sano circundante no puede competir con esas células por un suministro adecuado de nutrientes del sistema sanguíneo ocasionando la muerte y necrosis de las células normales, seguida de la disfunción de los órganos primarios y finalmente la muerte (figura 1) [12], [13].

Se han identificado más de 500 genes alterados que están fuertemente implicados en el desarrollo del cáncer y suelen dividirse en 2 grandes grupos: los genes supresores de tumores y los oncogenes, donde los primeros tienen funciones de inhibición del desarrollo de células tumorales y los segundos tienen el potencial de causar cáncer [14]

En circunstancias normales, la expresión de estos genes regula el crecimiento, la división y el desarrollo celular. Sin embargo, cuando se generan mutaciones, que en la mayoría de los casos son debidas a una combinación de alteraciones genéticas (deleciones, translocaciones, amplificaciones genéticas, reordenamiento de genes), a la activación o al silenciamiento de genes mediados por factores epigenéticos, el resultado es una expresión desregulada. Esto, a su vez, provoca la sobreexpresión, la pérdida de expresión o la expresión defectuosa de proteínas.

Muchas de estas proteínas funcionan como receptores celulares, ligandos de reconocimiento específico, enzimas, reguladoras del ciclo celular o de la apoptosis, activadoras de rutas metabólicas o inhibidores del sistema inmune. Como consecuencia, la identificación de la sobreexpresión de estas proteínas en diferentes tipos de cáncer representa un mal pronóstico para la enfermedad. Además,

estas mutaciones pueden desencadenar otras mutaciones que agravan la progresión de la enfermedad, desarrollando resistencia a los tratamientos (figura 1) [15], [16].

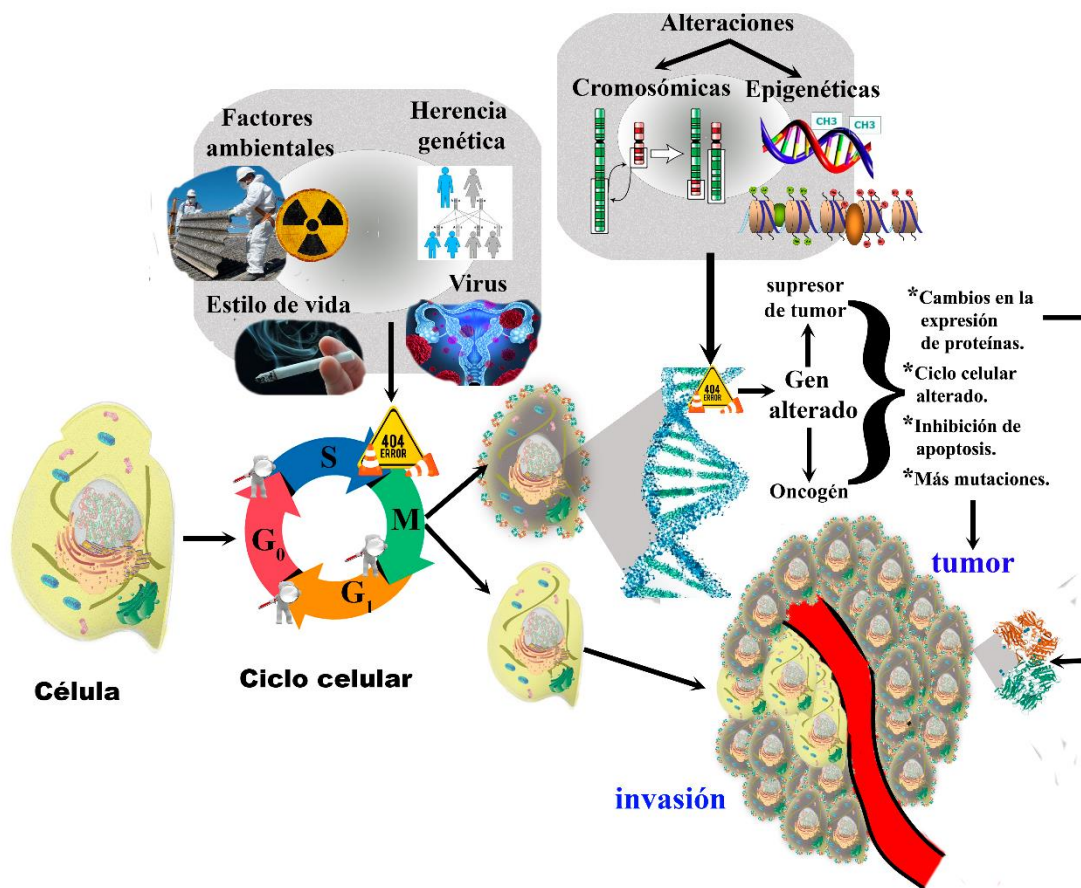


Figura 1. Factores que generan mutaciones y alteran el ciclo celular, lo que ocasiona cambios en las células transformándolas en células tumorales con potencial de invadir tejido sano. *Imagen de autoría propia.*

Los cambios que se generan en las células tumorales debido a las alteraciones genéticas y la expresión de proteínas, diferentes a las expresadas en las células normales, proporcionan la ventaja de diferenciar entre tejido normal y tejido tumoral. Esto permite el desarrollo de investigaciones sobre tratamientos y técnicas de diagnóstico que buscan interactuar con estas proteínas sobre expresadas (blancos moleculares). De esta manera, se busca realizar una terapia dirigida que disminuya el daño en las células sanas y un diagnóstico en estadios tempranos, donde aún haya oportunidad de cura o de un control que aumente el tiempo de progreso de la enfermedad [17], [18].

Las estrategias terapéuticas para la mayoría de los cánceres implican una combinación de resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia. A pesar de su éxito, estas terapias conllevan una morbilidad y mortalidad significativas debido a efectos colaterales, como el daño a las células normales o el

desarrollo de resistencia farmacológica. Esta resistencia se debe a las redundancias en las vías de señalización, a los polimorfismos genéticos y a la heterogeneidad tumoral en distintas etapas del avance de la enfermedad, así como entre individuos. Esta situación incentiva el desarrollo continuo de investigaciones para generar alternativas que disminuyan las desventajas mencionadas [19], [20], [21], [22].

En el ámbito de las estrategias para el diagnóstico de cáncer, se suelen incluir estudios de marcadores tumorales mediante pruebas de laboratorio, estudios genéticos y técnicas de imagenología basadas en los síntomas, culminando con la confirmación mediante la evaluación citológica de una biopsia [23]. Actualmente, se está desarrollando el campo del diagnóstico de cáncer mediante inteligencia artificial, el cual, sin duda, ocupará un lugar muy importante en la medicina oncológica, aunque todavía se encuentra en sus etapas iniciales [24].

4.2 Cardiopatías

Las enfermedades cardiovasculares representan la causa principal de fallecimiento a nivel global, cobrando la vida de aproximadamente 17.9 millones de personas cada año. Estas condiciones abarcan una serie de trastornos relacionados con el corazón y el sistema circulatorio, como enfermedades coronarias, afecciones cerebrovasculares, enfermedades reumáticas del corazón y otros problemas similares. Más del 80 % de las muertes relacionadas con ECV se originan a raíz de infartos cardíacos y accidentes cerebrovasculares, y cerca de un tercio de estas ocurren prematuramente en individuos menores de 70 años [25].

Los principales riesgos conductuales vinculados a enfermedades cardíacas comprenden una alimentación poco saludable, la falta de actividad física, el tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol. Estos comportamientos pueden reflejarse en condiciones como hipertensión arterial, elevación de glucosa y lípidos en sangre, además de sobrepeso u obesidad. Estos "factores intermedios de riesgo" son indicadores que pueden medirse en centros médicos primarios y señalan un mayor riesgo de sufrir ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca y otras complicaciones[26].

La identificación temprana de aquellos con mayor riesgo cardiovascular y asegurar que reciban el tratamiento adecuado puede prevenir fallecimientos. Garantizar el acceso universal a medicamentos para enfermedades no transmisibles y a tecnología sanitaria básica en todos los centros de atención

primaria es fundamental para asegurar que aquellos que lo necesiten reciban atención médica y orientación [27].

La cardiopatía isquémica, también conocida como enfermedad de las arterias coronarias, es la forma más común de enfermedad cardiovascular. Se vincula con problemas como el infarto de miocardio y la miocardiopatía isquémica, generando discapacidades crónicas y disminuyendo la calidad de vida en quienes la padecen. La aterosclerosis, un proceso inflamatorio arterial relacionado con la acumulación de lípidos y alteraciones metabólicas debido a diversos factores de riesgo, es el principal desencadenante de esta enfermedad. Más del 70 % de las personas en riesgo presentan múltiples factores de riesgo para esta condición, mientras que solo entre el 2 % y el 7 % de la población general carece de estos factores de riesgo [26].

Dentro de la cardiopatía isquémica se encuentran el IM, el síndrome coronario agudo, la angina de pecho. Un evento de IM sucede cuando una placa en una arteria coronaria se fragmenta, originando un coágulo sanguíneo que puede obstruir parcial o totalmente el paso de la sangre hacia el músculo cardíaco. La interrupción del suministro sanguíneo conduce a la muerte celular en el tejido cardíaco, y es crucial restaurar el flujo sanguíneo rápidamente para prevenir una mayor pérdida celular. Las perspectivas después de un episodio de IM están influenciadas por varios aspectos, como la ubicación geográfica, la condición general del paciente, la extensión del daño cardíaco y el tratamiento recibido [28].

La evaluación temprana del riesgo es fundamental para identificar a aquellos pacientes con mayor probabilidad de padecer otro episodio isquémico o enfrentar un desenlace fatal de origen cardíaco, ya sea arrítmico o no. Las imágenes médicas son útiles para evaluar la evolución en el hospital y pueden orientar las decisiones terapéuticas posteriores al infarto. Cuando existe un elevado riesgo de recurrencia de infarto de miocardio (IM), el enfoque terapéutico suele ser más enérgico e incluir procedimientos invasivos como la angiografía coronaria y, posiblemente, la revascularización coronaria [29].

La resonancia magnética es la técnica de diagnóstico más utilizada para evaluar las distintas etapas del infarto de miocardio. Sus ventajas incluyen su carácter no invasivo, la ausencia de exposición a radiación y su capacidad para proporcionar una resolución de contraste que permite la caracterización de tejido. Sin embargo, no puede utilizarse en pacientes con dispositivos metálicos ni en pacientes con insuficiencia renal [28].

Otras estrategias de diagnóstico incluyen el uso de radiofármacos, que se enfocan en evaluar la perfusión cardíaca. A lo largo del tiempo, se han aprobado nuevos radiofármacos como el ^{99m}Tc -Sestamibi, el ^{99m}Tc -Tetrofosmin y el ^{99m}Tc -Teboroxima, los cuales han presentado mejoras en la adquisición de imágenes SPECT [30]. Además, en el campo de la tomografía por emisión de positrones (PET), se han desarrollado varios radiofármacos con enfoque en identificar biomarcadores de inflamación cardiovascular [31].

La identificación del tejido afectado durante el infarto de miocardio y la restauración del flujo sanguíneo en la zona dañada, aunque mejora la supervivencia inicial, no indica los resultados a largo plazo. La remodelación de la matriz y la fibrosis activa son componentes de la reparación del tejido afectado y culminan en una cicatriz. Se sabe que la remodelación está regulada en parte por los miofibroblastos, y se tiene información que una mayor actividad de miofibroblastos se asocia a un peor pronóstico del IM [32].

Las estrategias diagnósticas convencionales no evalúan la activación de los miofibroblastos, debido a que las biopsias son difíciles de conseguir y estar sujetas a errores debido a lo heterogéneo del tejido. FAP se expresa altamente en la superficie de los miofibroblastos activados en la primera semana después del IM, en donde participa en la remodelación de la matriz extracelular, durante la formación de una cicatriz estable. Esta participación hace de FAP un biomarcador del pronóstico de supervivencia a largo plazo [33].

4.3 Imagen molecular

En la actualidad la mayoría de los estudios de diagnóstico por imagen utilizan técnicas convencionales como la CT, la RMN, RX y ultrasonido que permiten la detección de anomalías anatómicas. Sin embargo, cada vez es más común el uso de técnicas de imagen molecular que consisten en utilizar moléculas que tienen la capacidad de interactuar de forma específica con componentes de las células, estas moléculas a su vez son conjugadas con compuestos con propiedades ópticas para la obtención de imagen, las técnicas más utilizadas (por mostrar la mayor sensibilidad) son la tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT) o tomografía por emisión de positrones (PET)[34]. Otras técnicas son la imagen molecular óptica (OMI) que utiliza cromóforos con propiedades de luminiscencia para la generación de imagen y la imagen molecular por resonancia magnética (mMRI) que utilizan compuestos con propiedades de polarizabilidad como las nanopartículas de Hierro, las cuales son detectadas cuando se les aplican campos magnéticos [35], [36], [37].

La imagen molecular inicialmente fue desarrollada para el seguimiento de procesos biológicos, sin embargo, es en el diagnóstico del cáncer donde se le está dando mayor aplicación, aquí se utiliza para la caracterización *in vivo* de los ambientes tumorales, con la ventaja que la caracterización se puede realizar de forma no invasiva, sin alteración del ambiente químico de las moléculas y los procesos moleculares[38], lo que permite conocer la biología del cáncer y su detección en estadios tempranos donde las posibilidades de éxito de los tratamientos son mayores [35].

Las moléculas de reconocimiento específico suelen estar basadas en anticuerpos, compuestos pequeños, péptidos o nanomateriales que interactúan de forma específica con las moléculas que se encuentran sobre expresadas en las células tumorales o células blanco, estas moléculas suelen ser proteínas con función de regulación de vías críticas en la proliferación, enzimas tirosina quinasas, ligandos, receptores angiogénicos y algunos factores de crecimientos [39], [40].

4.4 Medicina nuclear

La medicina nuclear consiste en el uso de trazadores radioactivos en el estudio de la función global y regional, el flujo sanguíneo, el metabolismo y la morfología de un órgano con el fin de diagnosticar y tratar enfermedades [41].

En el ámbito del diagnóstico, se emplean técnicas como SPECT y PET. Aunque se aplican para diagnosticar y tratar diversas enfermedades como el hipertiroidismo, los linfomas, alteraciones cerebrales, pulmonares, hepáticas y cardíacas, su principal aplicación se centra en el diagnóstico del cáncer. Con la técnica SPECT, las emisiones de radiación γ (con energía entre 30 y 300 keV) del radiofármaco administrado son detectadas por una cámara gamma, lo que permite visualizar el origen de los rayos. Por otro lado, Con la técnica PET se emplea un isótopo emisor de positrones (β^+); tras una corta distancia, la partícula β^+ emitida se aniquila con un electrón, generando un par de rayos de 511 keV que viajan en direcciones opuestas y son detectados por un anillo de detectores. Los eventos registrados, producidos cuando dos detectores de coincidencia se activan sincrónicamente, se convierten en una imagen (figura 2) [42].

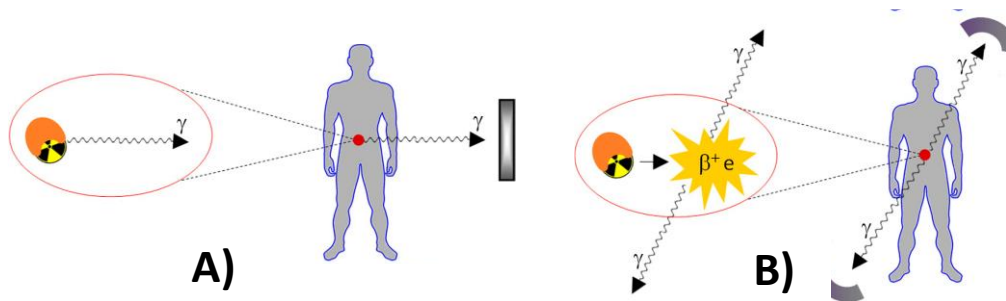


Figura 2. Técnicas de imagen nuclear: A) SPECT y B) PET. Tomada de [42]

La radioterapia es la forma de tratamiento contra el cáncer que se utiliza en la medicina nuclear y ha sido la pareja de la quimioterapia desde hace más de 30 años. La radioterapia utiliza radionúclidos en la zona del tumor para generar daño celular por radiación y con ello detener el avance de la enfermedad. El daño que generan los radionúclidos es debido a su emisión de partículas de decaimiento radiactivo, las partículas se clasifican en: α , β , electrones de Auger (e^-) y radiación gama (γ), la capacidad de estas partículas (al presentar carga) de generar ionización directa y por parte de la radiación gama ionización indirecta es lo que ocasiona daño en los componentes celulares principalmente ADN y proteínas (figura 3) [43].

La forma en la que se cuantifica el daño biológico es mediante la transferencia de energía lineal (LET), que se refiere a la cantidad de ionización generada por las partículas de decaimiento en una zona, las unidades de medición son $\text{KeV}/\mu\text{m}$ [44]. Las partículas α presentan LET entre 25 a 230 $\text{keV}/\mu\text{m}$, las partículas β típicamente de 0.2 $\text{keV}/\mu\text{m}$, en los electrones de Auger, el LET depende del número atómico, las capas de electrones y la configuración electrónica involucrada, y suele estar en el rango de unos pocos eV a 100 keV [44], [45], finalmente la radiación gama que por su característica de fotones de alta energía hace que no tenga un rango definido de interacción con el tejido ni de la energía que depositan, más bien pierde cierta cantidad de energía por unidad de distancia a través de la materia lo que ocasiona un LET muy bajo por su alta penetrabilidad, esto hace que su uso sea para fines diagnósticos más que terapéuticos [46], [47].

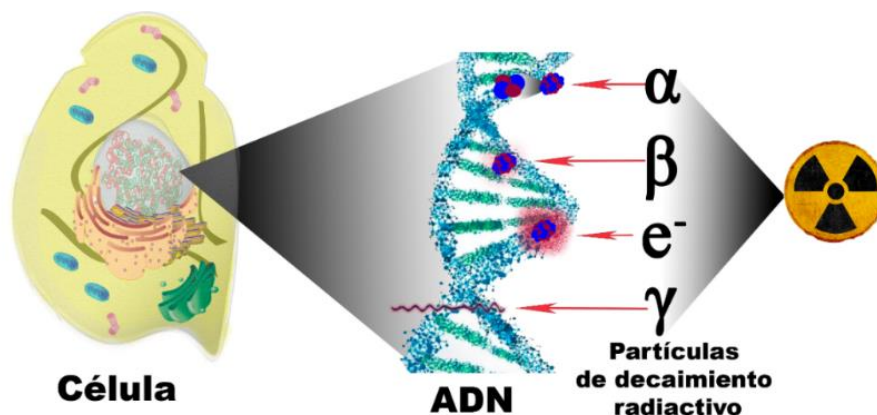


Figura 3. Representación del daño al ADN generado por las diferentes partículas de emisión de los radionúclidos. Las partículas α y los e^- tienen mayor interacción con la materia en comparación con las partículas β ; los rayos γ son de baja interacción y atraviesan la materia. *Imagen de autoría propia.*

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos define que un radiofármaco es toda sustancia conteniendo un radionucleido dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación se administra en seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos. Los radiofármacos se dividen en dos clases: Aquellos cuya biodistribución es determinada por sus propiedades físicas y químicas (baja especificidad) como el $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ y aquellos cuya distribución la determina el receptor al que se unen (radiofármacos de reconocimiento específico), estos últimos son los de mayor uso en el tratamiento y diagnóstico del cáncer [42], [48]. La selección de los radionúclidos que se utilizan en los radiofármacos depende de parámetros como el tiempo de vida media, tiempo de desintegración; tipo de desintegración; energía de las partículas emitidas; propiedades farmacocinéticas y de la complejidad de producción [49]. Los radionúclidos que emiten partículas β^+ y rayos γ (^{111}In , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) se emplean para el diagnóstico mientras que los que emiten electrones Auger (^{125}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{67}Ga y ^{201}Tl), partículas α (^{225}Ac y ^{211}At) y β^- (^{90}Y , ^{177}Lu y ^{188}Re) se utilizan para terapia. También existen radionúclidos que pueden ser utilizados como sistemas teranósticos por presentar emisiones tanto para diagnóstico como para terapia, por ejemplo, ^{64}Cu (usado para diagnóstico) y el ^{67}Cu (utilizado para terapia) también se tienen el ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{131}I [42].

El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es el radionúclido utilizado en más del 80 % de los protocolos de radiodiagnóstico debido a que su energía gama de 140 KeV (89 %) es ideal en la obtención de imágenes mediante SPECT, además de que su vida media de 6 h es suficiente para la preparación del radiofármaco, su

distribución, realización de controles de calidad, administración al paciente, acumulación en el sitio diana y la adquisición de imágenes, todo esto sin permitir que el paciente mantenga dosis de radiación por un periodo largo de tiempo. También tiene la ventaja que su costo de producción es bajo debido a su fácil obtención a través de un generador comercial $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ [50], en la tabla 1 se muestran las características radiológicas del $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

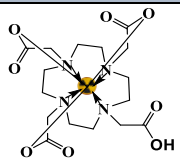
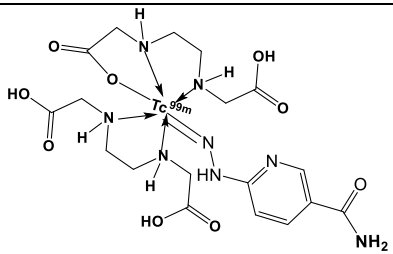
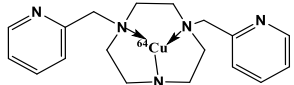
El radionúclido ^{68}Ga es el radionúclido utilizado en la mayoría de los protocolos de radiodiagnóstico mediante PET en los últimos años, incluso por encima del uso de ^{18}F , debido a su fácil obtención a partir de generadores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ o mediante ciclotrón partiendo de ^{68}Zn . Además de la afinidad de quelación con el BCCA DOTA. Radiofármacos marcados con ^{68}Ga están siendo utilizados para la evaluación de perfusión y función del miocardio, el flujo sanguíneo, la función renal y la función hepática, también se han probado radiofármacos de reconocimiento específico que interactúan con receptores de somatostatina, bombesina y melanocortina. En la tabla 1 se muestran las características radiológicas del ^{68}Ga [51].

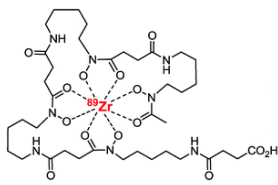
Tabla 1. Características radiológicas de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{68}Ga		
Característica	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	^{68}Ga
Producción	Generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	Generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$
Decaimiento	^{99}Tc	^{68}Zn
Tiempo de vida media	6 horas	68 minutos
Max. Energía de Emisión	γ (140 keV)	β^+ (1899 keV)
% de rendimiento de emisión.	91.5 %	89.1 %
Distribución normal	Estómago, tiroides, glándulas salivales y testículos	Corazón, Hígado, pulmón y riñón (y).
Excreción	Renal y gastrointestinal.	Renal (y)

Tanto PET como SPECT son técnicas de imagen que proporcionan información estructural y funcional; PET sobresale en resolución espacial y sensibilidad en comparación con SPECT. También cuantifica mejor la actividad metabólica y la cinética de las moléculas. Sin embargo, SPECT es más accesible y rentable, lo que resulta ventajosa en determinadas situaciones clínicas. La elección entre PET y SPECT depende de las características específicas de la aplicación, la disponibilidad de recursos y los objetivos de la investigación. En particular, si bien la PET/CT y la SPECT/CT normalmente se comparan de forma independiente, se pueden combinar (SPECT/PET/CT) para obtener un sistema de

imágenes unificado, que ofrece datos complementarios y una mayor precisión diagnóstica al fusionar imágenes [52].

El desarrollo de radiofármacos hasta dividido en 3 generaciones, las diferencias en cada generación se basan en cambios en la especificidad y complejidad de los compuestos. En la primera generación se encuentran los radiofármacos que constan de una molécula que participa en algún proceso metabólico o biológico y donde uno de sus átomos es sustituido por un isótopo radiactivo del mismo átomo, la desventaja de estos radiofármacos es que presentan baja especificidad. En la segunda generación entran en acción los BFCA, los cuales son compuestos que permiten coordinar los átomos de los radionúclidos y a su vez se pueden unir a moléculas de reconocimiento específico. En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de BFCA y el radionúclido con el que se suelen coordinar. Finalmente tenemos los radiofármacos de tercera generación los cuales pueden estar conformados por 3 o 4 componentes, los 3 componentes principales son el BFCA, el radionúclido y la molécula de interacción específica, pero en algunos casos puede tener un cuarto componente que consiste en una molécula que ayuda a aumentar la interacción con el blanco molecular, modificar las propiedades farmacocinéticas o como enlazante del BFCA y la molécula de reconocimiento específico, un ejemplo de esto es el compuesto HYNIC que funciona como enlazante del DOTA con las moléculas de reconocimiento específico. En la figura 4 se muestra ejemplos de las 3 generaciones [42], [53].

Tabla 2. Ejemplos de Agentes Quelantes Bifuncionales (BFCA)	
Nombre	Estructura
DOTA (1,4,6,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico)	 Radionucleidos quelados: ^{177}Lu, ^{68}Ga, ^{90}Y, ^{64}Cu (II)
EDDA-HYNIC (ácido 1,2-ethilenediamino-diacetico-6-hidrazinilcotinamida)	
DMPTACN (bis(2-piridilmetil)-1,4,7-triazaciclonoano)	

DFO (N'-[5-(acetil-hidroxi-amino)pentil]-N-[5-[3-(5-aminopentil-hidroxi-carbamil)propanilamino]pentil]-N-hidroxi-butano diamida)	
---	---

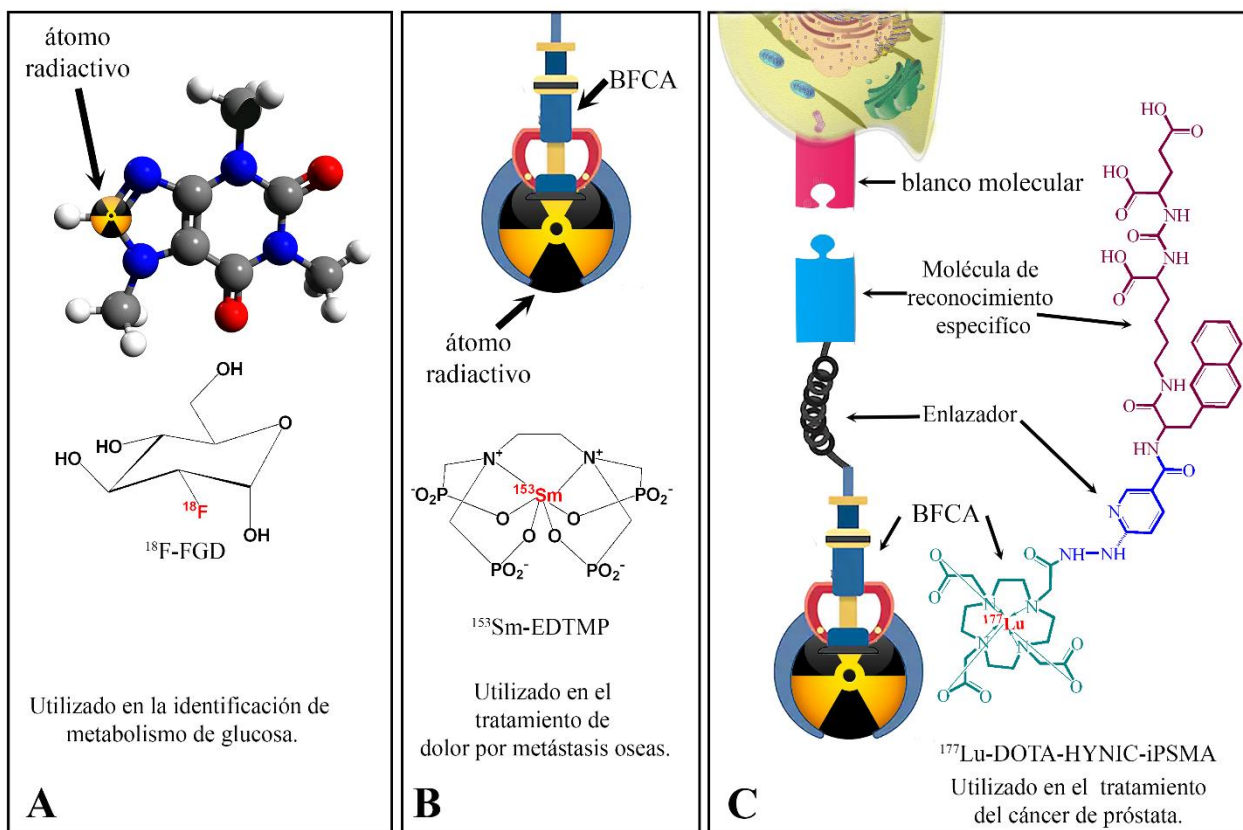


Figura 4. Estructura y ejemplos de: A. Primera generación, B. Segunda generación y C. Tercera generación de los radiofármacos. *Imagen de autoría propia.*

4.5 FAP

Existe una familia de proteínas serina proteasas (S9B) con actividad dipeptidil peptidasa (DPP) conformada por las DPP4, DPP8, DPP9 y por la proteína de activación de fibroblastos (FAP) que son capaces de hidrolizar residuos de prolina, debido a la naturaleza cíclica de este aminoácido. Para su actividad proteasa, la familia S9B requiere dimerización y, mediante la actividad dipeptidil peptidasa

elimina los dipéptidos P2-Pro1 (P2 representa cualquier aminoácido) del extremo N-terminal del sustrato (figura 5A) [54].

La proteína FAP es codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 2, adyacente a su homólogo más cercano DPP-IV/CD26 que codifica para DPP4. La cercanía de estos 2 genes hace que ambas proteínas presenten una similitud del 52 %. Está organizada en 26 exones que codifican para 760 aminoácidos con una parte N citoplasmática (6 aminoácidos), una región transmembrana (aminoácidos 7-26) y un dominio extracelular (734 aminoácidos). El dominio extracelular consta de una hélice beta de ocho láminas, que actúa como puerta de selectividad del sustrato, y un dominio alfa/beta hidrolasa donde se encuentran los residuos catalíticos de los aminoácidos Ser, His y Asp (figura 5B) [55], [56].

Además de su actividad dipeptidil peptidasa, FAP presenta actividad endopeptidasa, la cual es la principal diferencia con el resto de la familia DPP. La actividad endopeptidasa de FAP tiene una fuerte preferencia por la escisión de sustratos después de motivos de glicina-prolina (Gly-Pro), aunque también se ha observado en motivos Ala-Pro, Arg-Pro, Lys-Pro y Ser-Pro (figura 5C) [57].

La PREP una prolil endopeptidasa que pertenece a la subfamilia (serina proteasa) S9A presenta una actividad endopeptidasa muy similar a la de FAP. Los cambios en las expresiones de PREP están asociados con el envejecimiento, diversas patologías neurológicas, inflamación y algunos tipos de cáncer. PREP escinde el enlace peptídico post-prolina de sus sustratos. Comparado con FAP, PREP es mucho menos específico hacia los otros residuos de aminoácidos en la vecindad del enlace peptídico escindido. Por lo tanto, debe considerarse como un objetivo potencial no intencionado de compuestos que interactúan con el sitio activo de FAP. Esta es una razón principal que subyace a la escasa especificidad de FAP/PREP de muchos sustratos e inhibidores artificiales que se han desarrollado para interactuar con FAP [54], [58], [59].

En el sitio activo de FAP se ha visto que los inhibidores cargados positivamente (en N de P2) interrelacionan con los carboxilatos de los residuos Glu-203, Glu-204 y Tyr-656 que son equivalentes a Glu-205, Glu-206 y Tyr-662 de DPP4 lo que sugiere que el sustrato se une de forma similar en ambas enzimas. El grupo amida de Asn-704 en FAP (Asn-125 en DPP4) forma un puente de hidrógeno con el O de P2 del sustrato, y después de una ligera rotación el O del carbonilo de la cadena lateral de Asn-704 puede formar un puente de hidrógeno con la cadena lateral fenólica de Tyr-656 (Tyr-662 en DPP4), lo que coloca a Tyr de manera óptima para la unión con el sustrato, además Arg-

123 (Arg-125 en DPP4) forma puente de hidrógeno con Glu-204 de manera adecuada para la unión del sustrato (figura 5D) [60].

La diferencia más importante entre DPP4 y FAP, es el aminoácido Ala-657 que se encuentra en FAP en el lugar de Asp-663 en DPP4 y aunque Ala-657 también admite la unión del estado de transición de los sustratos, este residuo no se une al sustrato, sino que controla la geometría del sitio. La distancia de 4 Å entre Ala-657 y Glu-204 permite al residuo de Glu-204 la libertad conformacional ideal que no es posible con el residuo de Asp-663 en DPP4. Se cree que este cambio es lo que permite la actividad endopeptidasa de FAP, ya que se ha visto que cuando se cambia Ala por aminoácidos más grandes o pequeños disminuye notablemente esta característica. Por el contrario, la distancia de 2.5 Å que separa a Asp-663 y Glu-206 en DPP-4 permite que estos residuos formen puentes de hidrógeno, lo que restringe conformacional mente a Glu-206 de manera que la actividad endopeptidasa no puede ocurrir (figura 5E) [60].

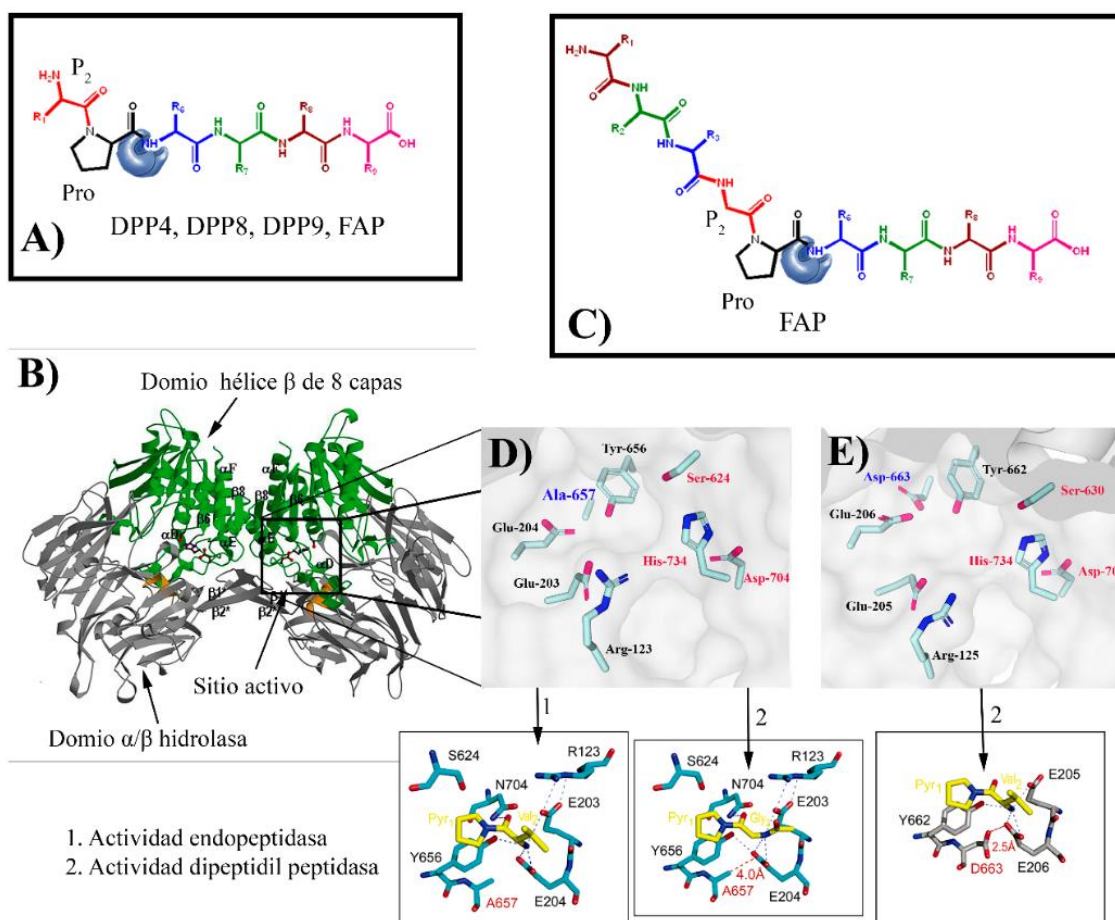


Figura 5. A) Representación de la actividad dipeptidil peptidasa, B) Estructura de FAP, C) Representación de la actividad endopeptidasa, D) Sitio activo de FAP y E) sitio activo de DPP4. *Imagen de autoría propia.*

El papel de FAP en diversos procesos biológicos ha sido mayormente investigado en ratones y ranas. En ranas se ha observado que FAP se expresa junto con la colagenasa-3 y la peptidasa E para remodelar la matriz extracelular durante la transformación de larva a adulto y en la remodelación de los tejidos. En ratones deficientes en FAP (FAP^{-/-}), no se han observado alteraciones fenotípicas, lo que sugiere que FAP participa en la remodelación del tejido, pero no en el desarrollo embrionario. En mamíferos se supone que FAP está ausente en tejidos adultos y que se expresa únicamente en células estromales y células madre mesenquimales durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas, su rol cuando se encuentra sobre expresada en adultos aún es objeto de estudio [61], [62].

4.5.1 FAP en el microambiente tumoral

Los tumores malignos pueden verse como un órgano anómalo compuesto por una mezcla heterogénea de varios tipos de elementos transformados y no transformados de origen mesenquimatoso o hematopoyético, que generan un reordenamiento en el entorno alrededor del tumor y tiene la capacidad de influir sistemáticamente en el organismo, este entorno es denominado microambiente tumoral (TME) [63].

El TME está integrado por las células tumorales, per se; células del estroma tumoral (estructura que da soporte y forma delimitada al tumor) constituidas mayormente por fibroblastos estromales, pero también por células endoteliales y células del sistema inmune. Otros componentes del TME son los no celulares que conforman una matriz extracelular (ECM) integrada principalmente por colágeno, fibronectina y laminina (figura 6). Las células tumorales controlan la función y desarrollo de los componentes en el TME a través de complejas redes de señalización, que se genera por una comunicación dinámica y bidireccional que incluye contactos célula-célula, contacto célula-ECM y comunicación endocrina, autocrina y paracrina. Todos ellos a través mediadores como las citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, mediadores inflamatorios y enzimas remodeladoras de la matriz extracelular [57], [64].

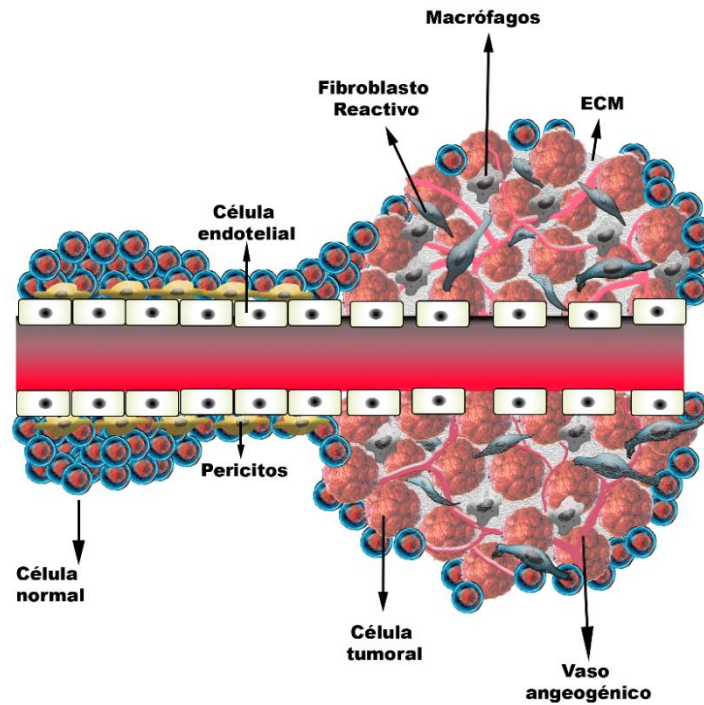


Figura 6. Representación del Microambiente tumoral (TME) y las células que lo constituyen. *Imagen de autoría propia*

En situaciones normales una comunicación bilateral continua entre el epitelio y el estroma dicta la diferenciación tisular y mantienen la integridad de los tejidos. En caso de situaciones patológicas, como heridas o cáncer, el estroma asume un papel de reparación (estroma reactivo) y a través de señalizaciones paracrinas altera la proliferación y diferenciación epitelial. La naturaleza “Reactiva” del estroma asociado al cáncer difiere en estructura y morfología en comparación con el estroma asociado a tejidos benignos, y proporciona un ambiente propicio para la progresión del cáncer en contraste con el papel supresor de su contraparte benigna [57].

La proteína FAP ha cobrado interés porque se ha encontrado su sobreexpresión en los fibroblastos estromales reactivos en más del 90 % de carcinomas epiteliales y está asociada con un mal pronóstico en tumores de carcinoma de colon, páncreas, ovario y hepatocelular [65]. También se expresa en procesos de cicatrización de heridas, en sitios de inflamación, incluida la artritis y en placas ateroscleróticas, pero a diferencia de las DPPs, su expresión en tejidos sano es escasa. Estas circunstancias han generado el desarrollo de moléculas de interacción e inhibición específica de FAP como potenciales fármacos en el tratamiento contra el cáncer [54], [56], [57], [66].

No existe evidencia suficiente para determinar el papel que FAP juega en el ambiente tumoral, la idea que más resalta es que su actividad peptidasa conduce a la digestión de colágeno de la ECM y la remodelación del TME, lo cual permite la invasión y migración de las células tumorales. También se

ha relacionado a FAP con la promoción de la angiogénesis en el microambiente tumoral debido a que el neuropéptido Y es un sustrato natural de FAP y se ha demostrado que el producto de escisión es pro-angiogénico, en otros estudios se ha encontrado una correlación de FAP y la densidad de vasos sanguíneos en tumores [65]. Se ha reportado que la inhibición FAP incrementa la respuesta inmune antitumoral y genera una rápida necrosis hipóxica en las células tumorales y las células del TME en modelos de ratón [54], [67].

4.5.2 FAP en miofibroblastos

FAP también se expresa en enfermedades distintas al cáncer. Su expresión se ha detectado en reacciones fibróticas, artritis, placas ateroscleróticas y fibrosis, así como en enfermedades autoinmunes [62].

En el caso de la fibrosis, se ha observado una elevación de FAP en condiciones fibróticas del hígado, pulmón y colon. Además, se ha encontrado expresión de FAP en condrocitos de pacientes con osteoartritis, lo que contribuye al desgaste del cartílago. También se ha detectado expresión de FAP en pacientes con artritis reumatoide, aunque su función en este contexto aún no se comprende completamente [61].

En el infarto de miocardio (IM), la fibrosis cardíaca es un indicador del progreso de la enfermedad y de la falla fatal de la funcionalidad del corazón. Cuando ocurre un IM, una inflamación autoinmune organizada genera la activación de los miofibroblastos. Estos miofibroblastos activados migran hacia el tejido dañado y participan en la formación de la cicatriz fibrótica, la cual es suficiente para delimitar el daño y permitir una reparación adecuada. Sin embargo, cuando hay una respuesta pro-fibrótica excesiva, se produce una remodelación del tejido remoto de la zona de infartada, lo que conlleva a una disfunción contráctil progresiva [68].

Los miofibroblastos activados son importantes mediadores en la inflamación del infarto de miocardio. Sin embargo, los diagnósticos convencionales no identifican la actividad de los miofibroblastos. Estos miofibroblastos activados presentan una sobreexpresión de FAP, la cual participa en la estimulación de la fibrosis y la remodelación de la matriz extracelular mediante la digestión del colágeno tipo I. FAP se expresa en la primera semana posterior al infarto de miocardio, durante la formación de una cicatriz estable, lo que convierte a FAP en un biomarcador de fibrosis progresiva [69].

4.6 FAPIs

Se han realizado la síntesis de inhibidores análogos a los sustratos tanto para la actividad de peptidasa como para la actividad endopeptidasa de FAP, estos inhibidores tienen un anillo de prolina y aminoácidos que juegan el rol de P2, además de un compuesto de ácido borónico o de nitrilo, que forman un aducto de boronato covalente y un aducto de imidato covalente con la serina del sitio activo, respectivamente. En el caso de los compuestos de ácido borónico, este aducto imita el intermediario tetraédrico de la hidrólisis del sustrato, mientras que en el caso de los compuestos de nitrilo imita el intermediario acil-enzima de la hidrólisis del sustrato (figura 7) [60]. Es importante buscar selectividad entre FAP y DPP4 porque a diferencia de FAP que sólo se encuentra sobre expresada en situación patológicas, DPP4 se encarga de regular las hormonas incretinas, el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP)[70].

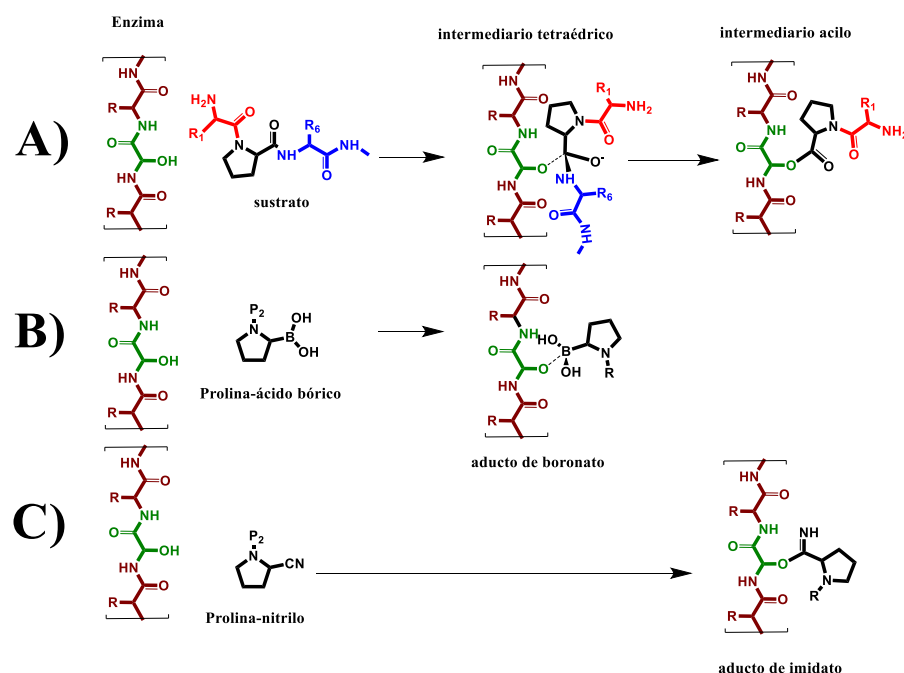


Figura 7. Interacción del aminoácido Serina del sitio Activo de FAP con: A) Sustrato, B) inhibidores a base de ácido Bórico y C) Inhibidores a base nitrilo. *Imagen de autoría propia.*

Debido a la similitud de FAP con DPP4 y PREP, el diseño de inhibidores que sean selectivos únicamente para FAP es todo un desafío. Poplawski y col. han diseñado la N-piridina-4 carbonil-D-ala-boro-Pro (ARI-3099) a base de ácido borónico (figura 8a). En el estudio muestran una selectividad 350 veces mayor para FAP sobre PREP y sobre DPP4, DPP8 y DPP9. Esta selectividad fue atribuida a que Ala-Pro solo puede ser escindido con una actividad endopeptidasa. Por lo tanto, las DPPs no

pueden interaccionar con la molécula. Por otro lado, al utilizar un átomo de nitrógeno protonado en el anillo de la piridina se forma un puente de hidrógeno con el oxígeno de Glu-204 presente en FAP, pero ausente en PREP lo que proporciona la selectividad de FAP sobre PREP, también encontraron que la adición de sustituyentes de F o Cl en el anillo mejoraba la afinidad y potencia hacia FAP. Se llegó a la conclusión que la actividad de FAP tiene estrictos requisitos en los aminoácidos que acepta, sólo glicina y alanina, además que con alanina la inhibición se presenta en concentraciones nano molares, y al cambiar D-alanina por otros aminoácidos la inhibición se aumenta en PREP y disminuye en FAP[66], [71].

Koen Jansen y colaboradores han evaluado 67 compuestos como potenciales inhibidores selectivos de FAP a base de la estructura R-P2-prolina-nitrilo. En el estudio analizaron el efecto de la selectividad de FAP sobre PREP, DPP4, DPP8 y DPP9 al modificar tanto P2 como R y encontraron que solo Gly, Ala y Ser en P2 generan selectividad hacia FAP, en el caso de R identificaron que el anillo quinolina es el que daba mayor selectividad a FAP y cuando era sustituido en la posición 5 y 7, aumentaba dicha selectividad, sin embargo, dependía del sustituyente en esas posiciones. La investigación llegó a la conclusión que la interacción del sistema quinolino con el centro activo de FAP pueden verse gravemente perturbado por pequeños cambios estructurales. También encontraron que las sustituciones halo en el anillo de prolina aumentaba la selectividad hacia a FAP.

Finalmente, el compuesto con sustitución en la posición 6 de la quinolina con un grupo metoxi y una halo bi-sustitución del anillo prolina (figura 8b) fue el compuesto que presentó una selectividad 976 veces mayor para FAP que PREP y una selectividad significativa comparada con las DPPs [72].

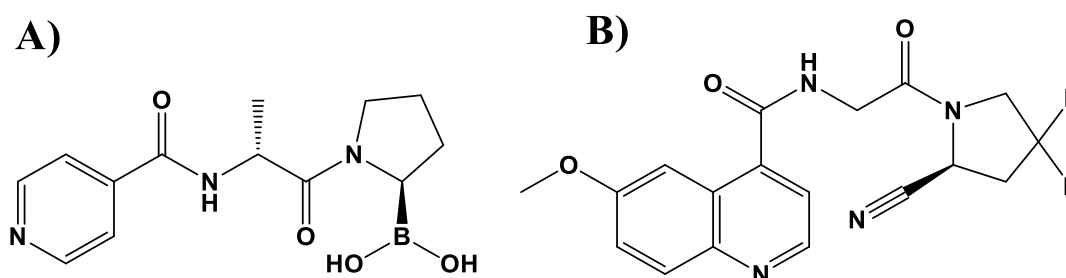


Figura 8. Ejemplo de la estructura de los inhibidores de FAP. A) ARI-3099, con anillo de pirrolidina y ácido bórico y B) 6-metoxi-N-4-quinolinoil-Gly-(2S)- 2-ciano-4,4-difluoropyrrolidina, con anillo de pirrolidina y grupo Nitrilo.

Los inhibidores de FAP pueden ser marcados con radionúclidos para desarrollar radiofármacos, pero a pesar del gran número de inhibidores de FAP, solo unos pocos han sido radiomarcados. El primer FAPI radiomarcado fue el ^{125}I -MIP-1232, utilizado para la obtención de imágenes de placa

aterosclerótica, este FAPI en estudios *in vitro* mostró selectividad positiva hacia las células FAP+ pero cuando se evaluó *in vivo* se encontró que no se unía de forma selectiva en el tejido aterosclerótico del modelo de ratón donde fue probado. Por otro lado, se ha realizado la conjugación de DOTA con el armazón de 4 quinolinoil-Gly-cianopirrolidina, y se ha radiomarcado con ^{177}Lu , ^{90}Y o ^{68}Ga para su uso como posible radio-FAPI, en el caso de ^{68}Ga se obtuvieron bajos rendimientos de marcado, mientras que con ^{177}Lu los rendimientos fueron adecuados [66]. Linder y colaboradores evaluaron la efectividad de FAPI-04 (figura 9) como candidato a compuesto para su posible aplicación como trazador teranóstico. El FAPI-04 mostró una rápida internalización en tumores positivos para FAP. Además, la captación tumoral efectiva después de 24 h aumentó al 100 %, lo que coloca a FAPI-04 con gran potencial con respecto a una aplicación teranóstico lo cual permitiría su posible marcado con ^{68}Ga y ^{177}Lu [73].

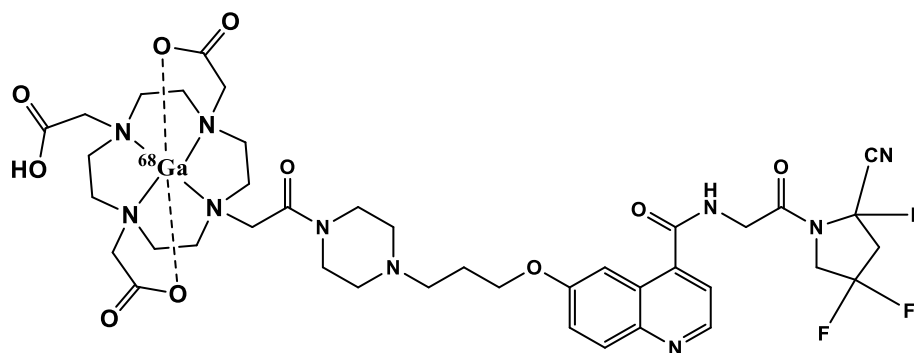


Figura 9. Estructura química del radiofármaco FAPI-04.

4.7 Consideraciones éticas

Al realizar una investigación en humanos, es fundamental considerar los aspectos éticos para proteger la dignidad, los derechos y el bienestar de los participantes. La investigación debe regirse por principios de respeto hacia las personas, justicia y beneficencia, asegurando que los riesgos potenciales no superen los beneficios esperados.

Es esencial obtener el consentimiento informado de todos los participantes, lo cual implica brindar información clara y completa sobre los objetivos, métodos, posibles riesgos y beneficios de la investigación. Además, debe existir una revisión y aprobación previa de un comité de ética independiente que evalúe la justificación y metodología del estudio para garantizar que cumple con los estándares éticos internacionales. En todas las etapas, es crucial mantener la confidencialidad y

privacidad de los datos personales, respetando el derecho de los participantes a retirarse de la investigación en cualquier momento sin repercusiones. A continuación, se presentan los aspectos éticos establecidos por la OMS que deben considerarse al realizar investigaciones en humanos [74].

- La investigación debe ser científicamente válida, con métodos apropiados y un equipo de investigación calificado.
- Los riesgos deben minimizarse y ser razonables en relación con los beneficios potenciales.
- La selección de participantes debe ser equitativa, sin cargar indebidamente a ciertos grupos.
- Cualquier compensación a los participantes debe ser apropiada sin inducir una participación indebida.
- Se deben tomar precauciones para salvaguardar la privacidad y confidencialidad de los datos de los participantes.
- El consentimiento informado debe respetar la autonomía de los participantes y asegurar una comprensión adecuada.
- Los impactos de la investigación en las comunidades deben ser examinados y abordados.
- Estas consideraciones éticas clave guían a los comités de ética en la revisión y aprobación de protocolos de investigación con participantes humanos.

Aunque existen varios códigos que apelan a los aspectos éticos a tomar en cuenta cuando se tiene que realizar investigación en humanos la utilizada en México es la declaración de Helsinki porque se encuentra publicada por la secretaria de salud del gobierno mexicano a través de la comisión nacional de bioética.

La Declaración de Helsinki es un documento fundamental en la ética de la investigación médica, emitido por la Asociación Médica Mundial en 1964 y revisado varias veces hasta la fecha. Su propósito es establecer principios éticos para la investigación que involucra a seres humanos, priorizando la protección de los derechos, la seguridad y el bienestar de los participantes sobre los intereses de la ciencia o la sociedad. Entre sus puntos clave, la declaración enfatiza la necesidad del consentimiento informado, en el que los participantes deben recibir información clara y comprensible sobre los objetivos, métodos, riesgos y beneficios de la investigación. Además, plantea que la investigación debe ser revisada y aprobada por un comité de ética independiente antes de su inicio, asegurando así que cumple con criterios de justificación científica y seguridad. También destaca la obligación de minimizar riesgos y de garantizar que los posibles beneficios superen los riesgos implicados [75].

5 MARCO METODOLÓGICO

5.1 Evaluación de afinidad de la proteína FAP con los sistemas HYNIC-Ala-boroPro y DOTA- HYNIC-Ala-boroPro.

En el análisis de acoplamiento molecular se evaluaron las estructuras de iFAP y DOTA-iFAP, las estructuras de referencia fueron ARI-3099 y FAPI-04, respectivamente.

Para la preparación de los ligandos se generaron las estructuras de iFAP y DOTA-iFAP, FAPI-04 y ARI-3099 en formato .cdx con el uso del programa ChemDraw. Luego las estructuras tridimensionales se exportaron en formato .pdb con el software Chem3D. Las geometrías moleculares se optimizaron utilizando el campo de fuerza universal (UFF) con el uso del software AVOGRADO 1.2.0. Se realizó una segunda optimización de la geometría utilizando el software semiempírico de química cuántica MOPAC2016 con un nivel teórico de PM7, la configuración espacial resultante se exportó en formato .pdb.

Para la preparación de la proteína la estructura tridimensional de la subunidad alfa de la proteína FAP se descargó del Protein Data Bank (PDB) con el código 1Z68. Se preparó la molécula de la proteína para el uso de modelado molecular con el uso BIOVIA Discovery Studio 2021, en donde se eliminaron las moléculas de agua y los residuos manifestados en la Difracción de rayos X, dejando solo la cadena principal de aminoácidos. La cadena A también se eliminó del dímero representado en el modelo, quedando solo la cadena B. Dado que el modelo tridimensional de la macromolécula implica una resolución de 2.60 Å. Una vez completadas estas modificaciones, la estructura resultante se guardó en formato .pdb.

Para el análisis de acoplamiento molecular se utilizó el software AutoDock Tools 1.5.6 donde se realizó la configuración del receptor como una molécula grande (FAP) y se definieron los ligandos que correspondían a iFAP y DOTA-iFAP, FAPI-04 y ARI-3099. Todos los archivos fueron transformados a la extensión .pdbqt. Posteriormente, se definió una zona de búsqueda en la región S1 donde se ubica el aminoácido Ser-624 de FAP, utilizando las coordenadas XYZ 18.948, 10.676, 28.989 como punto central y un cuadro de búsqueda con un tamaño de 90 unidades en los tres ejes. El archivo "AD4_parameters.dat" tuvo que modificarse para incluir los parámetros específicos del átomo de boro, que se obtuvieron de <http://mgldev.scripps.edu/pipermail/autodock/2009-March/005439.html>.

El software AutoDock 4.2.6 evaluó la unión molecular entre el archivo preparado de la proteína FAP (receptor) con cada una de las 4 estructuras. Mediante AutoGrid 4.2.6 se generaron las cuadrículas de mapeo .map. Luego, el complejo de mejor afinidad se exportó en formato .pdb y el archivo de registro de los resultados de la unión molecular se visualizó en AutoDock Tools. Se utilizó BIOVA Discovery Studio Visualizer 2021 para inspeccionar, analizar las distancias y las interacciones. Las constantes de inhibición se calcularon con la siguiente formula 1 [76]

$$K_i = e^{\frac{afinidad}{RT}} \dots\dots\dots(1)$$

K_i: Constante de inhibición

R= Constante universal de los gases con un valor de 0.00198179 kcal/molK

T: Temperatura en escala de kelvin

5.2 Síntesis Química y Marcado de iFAP y DOTA-iFAP

5.2.1 Síntesis y marcado de ^{99m}Tc-iFAP

La síntesis química de HYNIC-D-Ala-BoroPro (iFAP) se realizó mediante la reacción de activación de carbono alfa de la n-boc pirrolidina (1, figura 10) usando como activador el sec-BuLi y el trimetilborato en condiciones anhidras. Se colocaron 10 mmol de n-Boc-pirrolidina en un matraz con 50 mL de THF seco, posteriormente, se adicionaron por goteo 12 mmol de sec-BuLi, la reacción se dejó en homogenización durante 3 horas a una temperatura de -40 °C. Finalizado el tiempo se adicionaron por goteo el equivalente a 3 mmol de trimetilborato, la reacción se sacó del baño frio y se dejó en homogenización hasta alcanzar la temperatura ambiente. Pasado el tiempo, la reacción fue detenida adicionando 30 mL de agua. Subsiguientemente se adicionaron 3 volúmenes de 30 mL de NaOH 2 M, seguido se adicionó HCl 2M hasta tener un pH=3. El compuesto formado fue extraído con acetato de etilo. La solución de acetato de etilo se colocó en el rotavapor hasta obtener un polvo cristalino color beige (2, figura 10).

Se disolvieron 800 mg del polvo obtenido (2, figura 10) en 13 mL de éter con 580 mg de (+) pinanediol, la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado el tiempo se obtuvo una mezcla de diastereoisómeros, la cual se purificó mediante columna de sílica gel. La extracción se inició con una fase 1:9 Hexano/Acetato de etilo (500 mL), y después con una fase 85:15 Hexano/Acetato de etilo, de la purificación se obtuvo un aceite incoloro.

La configuración R se obtuvo mediante HPLC utilizando una columna de silica con un tamaño de partícula de 10 μm , L x DL 25 cm x 4.6 mm, con una fase móvil de etil terbutil eter: hexano (1:9) a una longitud de onda de 220 nm, donde R fue el segundo producto de elución (3, figura 9). El grupo Boc se eliminó mediante hidrólisis ácida, burbujeando el producto purificado con HCl seco durante 40 min a una temperatura de 0 °C (4, figura 9).

Se colocaron 10 mmol del compuesto purificado con 20 mmol de n-metilmorfolina, posteriormente, se adicionaron a una mezcla de 10 mmol de Boc-D-alanina en 100 mL de diclorometano a una temperatura de 0 °C. La reacción se dejó en homogenización durante 8 horas. Pasado el tiempo la solución se lavó con una solución de 1M de carbonato de sodio y 1M de fosfato de potasio, la fase orgánica se purificó mediante columna de gel de sílice, utilizando acetato de etilo (5, figura 9). El grupo Boc se eliminó mediante hidrólisis ácida, burbujeando el producto purificado con HCl seco durante 40 min a una temperatura de 0 °C (6, figura 9).

Para la eliminación del (+) pinanediol, el compuesto 6 (10 mmol) se colocó en 100 mL de una solución de ácido clorhídrico 2M y se puso a reaccionar con una solución de ácido fenilborónico (15 mmol) en 100 mL de hexano. La reacción generó una suspensión de 2 fases, la cual, se mantuvo en homogenización rigurosa durante 24 h, con un cambio de hexano cada 4 horas. A continuación, la solución acuosa se purificó mediante HPLC para la obtención del compuesto 7 (figura 9).

Para adicionar el grupo HYNIC, se preparó una solución de succinimidyl-N-Boc-HYNIC (10 mmol) (8, figura 9) con N,N-diisopropiletilamina (100 mmol) y HATU (30 mmol) en 2 mL de dimetilformamida, la solución se mantuvo en homogenización durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente, se adicionaron 10 mmol del compuesto 7, la reacción se dejó en homogenización por 2 horas. Pasado el tiempo se llevó a cabo la desprotección del grupo Boc adicionando ácido trifluoroacético 2 M. El producto final se purificó mediante HPLC fase reversa utilizando la columna Discovery C-18, 5 μm de tamaño de partícula; L x I.D, 25 cm x 10 mm, la fase móvil utilizada fue agua:acetonitrilo 40:60 v/v. Finalmente, se realizó la liofilización del producto, obteniendo un polvo blanco cristalino (9, figura 9), correspondiente a HYNIC-D-Ala-boroPro (iFAP), en un rendimiento del 62 %.

Para el marcado de HYNIC-D-Ala-boroPro con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, se preparó el liofilizado con todos los componentes de la formulación como se describe a continuación: Primero se colocaron 50 μg del compuesto 9 (figura 10) en 0.1 mL de agua inyectable previamente nitrogenada (Solución de HYNIC-iFAP). De forma separada se colocaron 10 mg de EDDA en 0.5 mL de agua previamente nitrogenada,

la solución se calentó hasta ebullición y se dejó en agitación hasta disolución completa, una vez disuelto el EDDA, la solución se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. En otro vial se colocaron 20 mg de tricina y 50 mg de manitol en 0.4 mL de agua previamente nitrogenada y se mantuvieron en agitación hasta la disolución completa. Una vez disuelto se adicionó lentamente por goteo la solución de EDDA a la solución de tricina-manitol. De forma independiente se pesaron 20 μg de SnCl_2 anhidro en un vial limpio y seco con 5 μL de HCl concentrado hasta la disolución de los cristales, posteriormente se le adicionaron 2 mL de agua inyectable previamente nitrogenada se dejó en homogenización por 15 min. Finalmente, la solución de HYNIC-iFAP se adicionó lentamente a la solución de EDDA-Tricina-Manitol, posteriormente se adicionó la solución de SnCl_2 . La solución final se ajustó a un pH a 4.0 y se filtró utilizando una membrana de filtración de 0.22 μm estéril y libre de endotoxinas. La solución filtrada se colocó en un frasco de vidrio estéril de 14 mL y fue liofilizado.

De forma paralela se preparó una solución de buffer de fosfatos, para la cual, se colocaron 0.23 g de fosfato de sodio dibásico anhidro y 62 mg de fosfato de sodio monobásico monohidratado en 3 mL de agua previamente nitrogenada, se mantuvieron en calentamiento y agitación hasta a la disolución completa de las sales, a continuación, se aforó a un volumen de 10 mL y se esterilizó por filtración de membrana, utilizando una membrana de 0.22 μm . El pH de la solución fue de 7.0.

Para el marcado, el liofilizado fue reconstituido con un mL del buffer de fosfatos 0.2M pH: 7.0 y 1 mL de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4\text{Na}$ (740-1110 MBq). La reacción se dejó en incubación en un baño seco durante 15 min a 95 $^{\circ}\text{C}$.

5.2.2 Síntesis y marcado de ^{68}Ga -DOTA-iFAP

Para la síntesis de DOTA-FAP se colocaron 4.4 μmol de DOTA-benzeno-*p*-SCN y 6.2 μmol de iFAP en 0.2 M de NaHCO_3 a un pH de 9.5, la mezcla fue incubada a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. El DOTA-iFAP fue purificado mediante HPLC utilizando una columna C18 con un tamaño de partícula de 5 μm y una longitud de 25 cm. Los gradientes del método de purificación fueron 0.1 % de TFA en agua, fase A, 0.1 % de TFA en acetonitrilo (B) con un flujo de 4 mL/min pasando desde un 100 % a 10 % de A y de un 0 % a un 90 % de B en un tiempo de 30 min. La fracción purificada fue liofilizada.

El marcado se realizó utilizando un módulo de síntesis diseñado por label biomolecules con ^{68}Ga (IQS® Ga-68 Fluidic labeling module), en donde se colocaron 25 μg de DOTA-iFAP, los cuales se disolvieron en un mL 0.25 M de acetato de sodio (pH 4.5), la solución se mantuvo en calentamiento por 5 min a una temperatura entre 105 y 110 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente 5 mL de $^{68}\text{GaCl}_3$ disuelto en HCl

0.05 M, recién eluido a partir de un generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ fue adicionado al sistema y calentado durante 12 min a una temperatura entre 105 a 110 °C. Finalmente fue purificado utilizando una columna C18 sep-Pak light cartridges (fase de extracción solida), la solución purificada fue esterilizada utilizando una membrana de 0.22 μm . La solución fue analizada para pureza radioquímica, esterilidad y endotoxinas bacterianas con base en los MGA 0241, MGA 0381 y el MGA 0316 de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 13.0 edición.

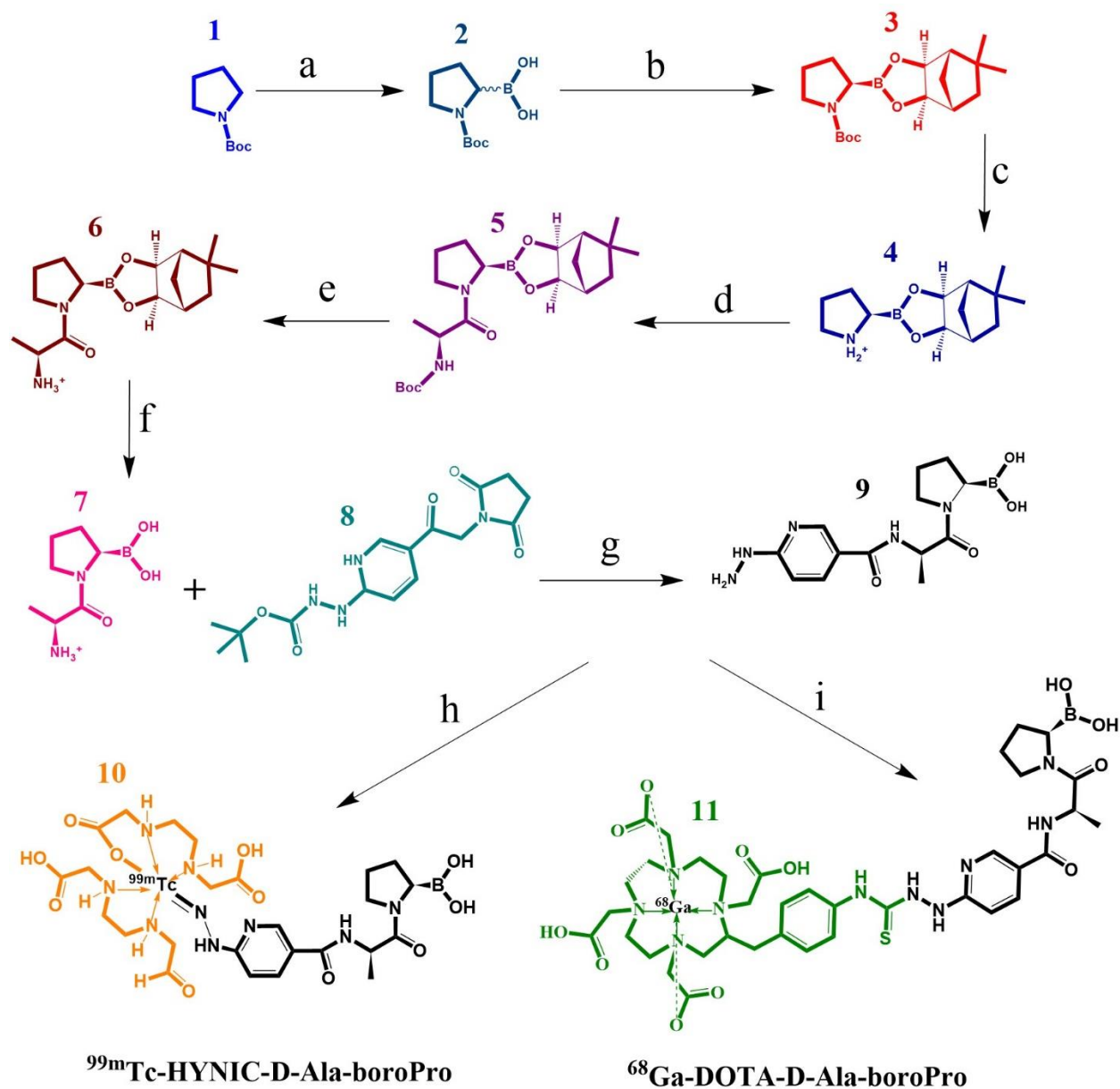


Figura 10. Ruta de síntesis de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP y de ^{68}Ga -DOTA-iFAP. a: (1) s-buLi , THF seco, -72°C , 3 h, (2) $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$, (3) NaOH y HCl ; b: (1) (+)pinanediol, Et_2O , 2 h, (2) extracción silica gel (Hexano: EtOAc 6:1), (3) EtOAc/HCl seco, (4) Separación de R y S (10 μm Lx I.D. 25 cm 4.6 mm; en: etil-ter-butil éter: Hexano 1:9); c: (1) EtOAc/HCl seco d: (1) Boc-D-alanina. CH_2Cl_2 , HOBT , EDC , 2 h, 0°C ; e: (1) EtOAc/HCl seco; f: (1) **6**, H_2O , (2) $\text{PhB}(\text{OH})_2$, hexano, 24

h; g: (1) Succinimidyl-N-Boc-HYNIC, DIPEA, DMF, 0 °C, 2h, 7; (2) THA Concentrado; h: (1) EDDA/Tricina, (2) $^{99m}\text{TcO}_4^-/\text{SnCl}_2$, 95 °C, 20 min; g: (1) p-NCS-Bz-DOTA, 90°C, 60 min, (2) $^{68}\text{GaCl}_3$, CH_3COH pH: 5.0, 95 °C, 30 min.

5.3 Caracterización Fisicoquímica de los sistemas ^{99m}Tc -iFAP y ^{68}Ga -iFAP

5.3.1 Caracterización química

Para la caracterización química se realizaron las siguientes evaluaciones

5.3.1.1 Espectroscopia UV-Vis: El análisis se llevó a cabo en un rango de 200 a 800 nm, con resolución de un nm, utilizando las soluciones acuosas de iFAP y DOTA-iFAP a una concentración de 0.2 mg/mL. Se utilizó el equipo PerkinElmer lambda Bio spectrophotometer. La muestra fue colocada en una celda de cuarzo de un 1 cm de longitud.

5.3.1.2 Espectroscopia infrarrojo: Se tomó 1 mg de iFAP y DOTA-iFAP y se colocaron en el equipo PerkinElmer, system 2000 spectrophotometer de Pike Technologies. Se realizó el barrido en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} , se realizaron 40 barridos con una resolución de 1 cm^2 y con atenuación total de reflexión.

5.3.1.3 Espectroscopia de Masas: Se utilizó el equipo de UPLC por electrospray de masas (SQD-MS), utilizando una columna de C18 con un tamaño de partícula de 3.5 μm , 15 cm de largo. Se inyectaron 10 microlitros de las soluciones de iFAP y DOTA-iFAP (1 mg/ mL). Se utilizaron la fase A (0.1 % de ácido trifluoroacético en agua) y la fase móvil B (0.1 de ácido trifluoroacético en acetonitrilo), la velocidad de elución fue de 1 mL/min. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente lineal de A al 100 % durante 3 min, cambiando a A al 50 % en un tiempo de 10 min y manteniendo esa velocidad otros 10 min, cambiando A-30 % en un tiempo de 3 min y regresando a A al 100 % en un tiempo de 4 min.

5.4 Eficiencia de radiomarcado de ^{99m}Tc -iFAP y ^{68}Ga -DOTA-iFAP

5.4.1 Determinación de pureza radioquímica de ^{99m}Tc -iFAP

La pureza radioquímica se determinó mediante radio HPLC utilizando una columna Discovery C18, con un tamaño de partícula de 5 μm , y un tamaño de L x I.D. 25 cm x 4.6 mm, con un gradiente lineal de dos fases: Fase A: 0.1 % de TFA/Agua y Fase B: 0.1 % TFA/acetonitrilo, la velocidad de elución

fue de 1 ml/min. El gradiente de flujo fue el siguiente: A-100 % durante 3 min, cambiando a A-50 % en un tiempo de 10 y manteniendo 10 min esas condiciones, pasado el tiempo se cambió A-30 % durante 3 min y regresando a A-100 % durante 4 min.

5.4.2 Determinación de pureza radioquímica de ^{68}Ga -DOTA-iFAP

La pureza radioquímica fue evaluada mediante radio HPLC fase reversa, se utilizó una columna C18, con un tamaño de partícula de 5 μm y una longitud de 30 cm. La velocidad de elución fue de 1 ml/min. Las fases utilizadas fueron la fase A que consistía en una solución de ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo y fase B que consistía en una solución de ácido trifluoroacético al 0.1 % en agua. El gradiente utilizado fue 100 % de A durante 3 minutos, cambio a 50 % de A en un tiempo de 10 minutos y mantenerlo durante 10 min, se cambió 30 % de A en un tiempo de 3 minutos y finalmente se regresó a 100 % de A durante 4 minutos.

5.5 Evaluación *in vitro* del sistema $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP

5.5.1 Cultivo celular

Para la evaluación *in vitro* del sistema $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP se utilizaron la línea celular N30 (FAP +), células de tumor primario de estroma endometrial. Se utilizaron como control negativo células de fibroblastos normales obtenidas de prepucio pediátrico, las cuales fueron tratadas con dispasa durante 8 horas para separar la dermis de la epidermis, después la dermis fue tratada durante 4 horas con collagenasa I para obtener los fibroblastos. Ambas líneas celulares fueron proporcionadas por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Las células fueron cultivadas con medio DMEM-F12 (ATCC® 30-2006 TM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de una mezcla de antibióticos (ampicilina/estreptomicina) y un agente antimicótico de anfotericina, se mantuvieron en incubación a una temperatura de 37 °C, una humedad de 83 % y 5 % de CO_2 .

5.5.2 Análisis de Western blot

Tanto las células N30 y los fibroblastos normales se transfirieron a un tubo de microcentrífuga y se lisaron utilizando el reactivo de lisis de células de mamíferos ProteoJETTM. Después se realizó una centrifugación a 20,000 g durante 15 min y se efectuó la cuantificación de proteínas del sobrenadante utilizando el método de Bradford, en seguida se procedió a la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando 30 g de proteína de cada muestra. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Merck Millipore) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando PBS con albúmina sérica bovina al 5 %. Los anticuerpos utilizados para el Western blot fueron: anticuerpo

monoclonal FAP (Invitrogen F11-24; 1:1000) y como control positivo al anticuerpo de GAPDH (GeneTex, 1:5000). Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4°C y a continuación se lavaron. Como paso siguiente se adicionaron los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (específico para la especie y el isótopo del anticuerpo primario) se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron dos veces. Las membranas se incubaron con el sustrato Super Signal West Femto y las señales se detectaron utilizando el sistema de imágenes *In vivo Xtreme*. Cada gel también se procesó con un estándar de peso molecular predeterminado (BLUES-tain™ Protein Ladder 11-245 kDa Cat: P007-500).

Como evidencia cualitativa del reconocimiento de iFAP por FAP expresada en células N30, se utilizaron nanopartículas de Lu₂O₃ funcionalizadas con DOTA-iFAP [77]. Las células N30 se incubaron con Lu₂O₃-iFAP NPs y Lu₂O₃ NPs (2 h a 37 °C), se fijaron en acetona y se lavaron con PBS, seguido de la adición de Hoechst (tinción de ADN, 250 µL, 1 µg/ml, y se enjuagó con PBS) para observarse en un campo microscópico epifluorescente de 40x.

5.5.3 Captación e internalización

La captación e internalización de ^{99m}Tc-iFAP por células N30 (FAP +) y fibroblastos (FAP-) se determinaron utilizando 4x10⁵ células/500 µL de PBS en tubos de ensayo (n = 6). Ambas líneas celulares se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 10 µL de ^{99m}Tc-iFAP (37 kBq, 0,4 nmol de iFAP). Después de la incubación, se realizaron tres lavados con 500 µL de PBS mediante centrifugación (700 g/5 min). Utilizando un detector de tipo pocillo de centelleo de cristales (NaI (Tl)) se evaluó la radiactividad en el sedimento celular. Se usó un volumen estándar con actividad inicial para representar el 100 % y se evaluó la actividad de absorción celular con respecto a este valor. Para la evaluación de la internalización, los sedimentos celulares se trataron a 37 °C durante 5 min con 500 µL de una solución ácida de glicina (glicina 0,1 M, pH ajustado a 2,8 con HCl) y se centrifugaron (700 g/5 min). El sedimento celular se incubó con NaOH 1 M durante 5 minutos y se centrifugó (700 g/5 min). La radiactividad del sobrenadante se calculó como el porcentaje de internalización con respecto a la actividad inicial del volumen estándar como se mencionó anteriormente.

5.6 Evaluación *in vitro* del sistema ⁶⁸Ga-DOTA-iFAP.

5.6.1 Cultivo Celular

Para la evaluación *in vitro* se utilizaron las células HCT116 (ATCC® CCL-247™) pertenecientes a carcinoma colorrectal, positivas a la expresión de FAP y la línea celular AR42J correspondientes

células de cáncer de páncreas (ATCC® CRL-CRL-1492TM; aisladas de una rata), negativas a la expresión de FAP. Ambas líneas celulares fueron cultivadas utilizando el medio RPMI-1640 (ATCC® 30-2001TM) complementado a 1 % de una solución de antibiótico (ampicilina/estreptomicina) y 10% de suero fetal bovino, las condiciones ambientales fueron una temperatura de 37 °C y 5 % de CO₂.

5.6.2 Ensayo de afinidad

Se realizó por triplicado el análisis de unión competitiva para evaluar la afinidad de unión de ⁶⁸Ga-DOTA-iFAP con las células HCT116, para tal efecto se llevó a cabo un ensayo de saturación, donde se incubaron 1x10⁵ células por pocillo en cajas de 96 pozos a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Pasado el tiempo se adicionaron 7.4 kBq de ⁶⁸Ga-DOTA-iFAP, inmediatamente después se adicionaron concentraciones desde 10⁻¹⁴ a 10⁻³ M del péptido DOTA-iFAP sin marcar, las células se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37 °C. Pasado el tiempo, el líquido se decantó y las células fueron lavadas. La cantidad de unión celular fue medida tomando como 100 % la actividad inicial de ⁶⁸Ga-DOTA-iFAP y calculando el porcentaje de actividad en cada pozo. La actividad se midió utilizando un detector de centelleo (NaI (Tl)).

5.6.3 Ensayo de Western Blot

Para el ensayo de western blot, ambas líneas celulares se lisaron añadiendo tampón de lisis. Después las muestras se centrifugaron a 20,000 × g durante 15 minutos, para el SDS-PAGE se tomaron 30 µg de proteína por muestra. Cada gel también se procesó con un estándar de peso molecular predeterminado (BLUES-tainTM Protein Ladder 11-245 kDa Cat: P007-500). Luego, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y se bloquearon con PBS que contenía albúmina sérica bovina al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados para el análisis de Western blot fueron el clon AC-15 anti-β-actina peroxidasa (dilución 1:20 000) y el anticuerpo policlonal anti-FAP (dilución 1:500 de conejo). Las membranas se dejaron en incubación con los anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C, pasado el tiempo las membranas fueron lavadas con una solución de PBS y tween 20 al 0.5 %. Las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con HRP específico de la especie durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un lavado extenso con PBS, seguido por una incubación con Super Signal WestFem al momento de la revelación y utilizando como sistema de detección de imágenes *in vivo* Xtreme. En este sistema, la imagen del marcador de peso molecular se obtuvo por reflectancia, ya que la escalera de proteínas utilizada en este estudio no es luminiscente. Las bandas de detección de las proteínas de interés (FAP y Actina)

se obtuvieron mediante imágenes de luminiscencia. Ambos tipos de imágenes se adquirieron simultáneamente.

5.6.4 Ensayo de inmunofluorescencia

Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para confirmar la expresión de FAP en células BJ y AR42J. Las células se fijaron con paraformaldehído (4 %) durante 20 min, seguido de Triton X-100 (0,5 %) para la permeabilización y BSA al 1 % para el bloqueo. Luego, las células se incubaron durante 12 h con un anticuerpo policlonal anti-FAP 1:50 y finalmente se expusieron durante 1 hora a IgG anticonejo conjugado con Alexa Fluor 488. Se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol); para observar la intensidad de la fluorescencia intracelular de la tinción nuclear utilizando un microscopio de fluorescencia.

5.6.5 Captación e internalización

Para la determinación de la captación e internalización, se colocaron por triplicado un total de 1×10^6 células de ambas líneas celulares en 500 μ L de PBS, seguido por 10 μ L de 18 kBq de ^{68}Ga -iFAP a lo largo de 1 hora a 37°C. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 700 durante 5 minutos, también por triplicado. Entre cada centrifugación, el precipitado fue lavado con solución de PBS. Para evaluar la captación e internalización, después de los lavados se midió la actividad del precipitado utilizando un detector de centelleo de cristales (NaI (Tl)) tipo pocillo, correspondiente a la captación total (captación e internalización).

Para evaluar la internalización, al precipitado se le añadieron 500 μ L de glicina 0.1 M y se llevó a un pH de 2.8 utilizando HCl concentrado, con el fin de inducir la eliminación de receptores en la membrana celular. Las células se incubaron durante 5 minutos a 37°C y luego se centrifugaron a 700 g en el transcurso de 5 minutos. Se recuperó el sedimento, el cual fue tratado con NaOH 1M (lisis de la membrana celular) durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 700 g por el tiempo de 5 minutos y se midió la actividad en el sobrenadante, correspondiente a la actividad internalizada. La actividad captada se calculó restando la actividad total de la actividad internalizada.

5.7 Evaluación *in vivo* del sistema $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP

5.7.1 Cultivo celular

Para los estudios de biodistribución y generación de imagen se utilizó la línea celular Hep-G2 (ATCC® HB-8065 TM) correspondientes a carcinoma hepatocelular, las cuales fueron cultivadas

utilizando el medio DEMEM suplementado con 10 % de suero bovino, 100 unidades de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células se incubaron a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO₂.

5.7.2 Biodistribución y generación de imagen

Los estudios de distribución se llevaron a cabo en 15 ratones Balb-c (n=3) conforme a lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se definió una n=3 para cada una de las condiciones de los estudios *in vivo*, con el objetivo de obtener significancia estadística utilizando el mínimo número de animales. A los ratones se le indujeron tumores subcutáneos en la pata derecha utilizando una suspensión de buffer de fosfatos con 1 x10⁶ células Hep-G2. Como control negativo se utilizó una cepa *Klebsiella pneumoniae* inactivada mediante calor (1000 °C, durante 2 h), la cual fue suspendida en buffer de fosfatos en una concentración de 1x10⁶ bacterias, la suspensión fue administrada en la pata izquierda de cada ratón para inducir un proceso inflamatorio. Una vez que el tumor se observaba visible, a cada ratón se le administraron a través de la vena de la cola 50 µL de ^{99m}Tc-iFAP, la cual contenía una actividad de 18 MBq. Tres ratones fueron seleccionados para la generación de imagen mediante micro-SPECT/CT, el resto de los ratones fueron sacrificados para el estudio de biodistribución, los tiempos de evaluación fueron 15 min, 30 min, 2 horas y 24 horas. Después de sacrificar a los ratones, se extrajo la sangre y los órganos principales, los cuales fueron pesados y se midió su actividad utilizando un detector de Na(Tl); los datos fueron utilizados para calcular el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) utilizando un volumen estándar inicial (100 % de la actividad inyectada inicial). Se obtuvieron modelos biocinéticos de los cuatro tejidos/órganos diana principales (sangre, tumor, hígado y riñones) ajustando curvas tiempo-actividad de ^{99m}Tc-iFAP a funciones con dos o tres términos exponenciales formula (2):

$$A_1(t) = Ae^{-at} + Be^{-bt} + Ce^{-ct} \dots\dots\dots(2)$$

Las imágenes de micro-SPECT/CT se obtuvieron en el equipo ONCOVISION a tiempos de 30 min y 24 horas después de la administración del ^{99m}Tc-iFAP, los ratones fueron anestesiados utilizando una solución de 2% de isoflurano. A partir de las imágenes fue posible determinar el SUV_{Max}, aplicando la siguiente formula (3):

$$SUV_{Max} = \frac{\text{Actividad corregida por decaimiento (MBq) en el tumor} / \text{masa del tumor(g)}}{\text{Actividad total (MBq) / peso del ratón}}$$

5.8 Evaluación *in vivo* del sistema ^{68}Ga -DOTA-iFAP.

5.8.1 Biodistribución

Los animales utilizados en los estudios de biodistribución se incubaron bajo el protocolo No. 10-2018-2022), bajo los requerimientos de la NOM-062-ZOO-1999 y bajo los requerimientos del comité interno constitucional de cuidado y uso de animales en el laboratorio (CICUAL-ININ). Se utilizaron 12 ratones Nu/Nu de 6 a 8 semanas de edad, los cuales se inyectaron de forma subcutánea con células HCT116 (1×10^6) en 0.1 mL de PBS. Al día 10 después de la administración de las células, cuando los tumores ya eran observables, a 9 ratones se les administró 18.5 MBq de ^{68}Ga -DOTA-iFAP a través de la vena de la cola, posteriormente fueron sacrificados a los tiempos de 30 min, 1 hora y 3 horas. De los ratones sacrificados se colectaron muestra de sangre, riñón, pulmón, corazón, hígado, bazo, páncreas, intestino delgado, musculo, hueso y tumor, a los cuales se les midió la actividad utilizando un detector de Na(Tl). Los resultados se expresaron como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

5.8.2 Captación no específica

Para el análisis de captación no específica, 3 ratones se les administró 18.5 MBq de ^{68}Ga -DOTA-iFAP y fueron co-inyectados con 50 μL de iFAP, para realizar el bloqueo de los receptores. Los ratones fueron sacrificados una hora después de la administración de los sistemas ^{68}Ga -DOTA-iFAP e iFAP. Los tumores fueron extraídos y analizados mediante inmunohistoquímica para la evaluación de expresión de FAP.

5.9 Evaluación *ex vivo* del sistema ^{68}Ga -DOTA-iFAP.

5.9.1 Imagen de corazón infartado de ratón

Se realizó el análisis de corazón infartado para evaluar la sobreexpresión de FAP en miofibroblastos como resultado de la cicatrización postinfarto. En el estudio se utilizaron ratones Balb-c con pesos entre 35 y 45 g, que fueron cuidados y tratados de acuerdo con base en el protocolo No. 10-2018-2022, conforme a la NOM-062-ZOO-1999 y los criterios del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (CICUAL-ININ).

El infarto agudo a miocardio (expresión aguda de FAP) fue inducido mediante una solución de clorhidrato de isoproterenol, en una concentración de 20 mg/mL, disuelto en solución salina. La solución fue administrada vía peritoneal a una dosis de 100 mg/Kg de peso corporal. Se manejó un control negativo constituido por 3 ratones a los que solo se les inyectó solución salina al 0.9 %. Tres

horas después de la inyección, se administraron a través de la vena de la cola 50 μ L de ^{68}Ga -iFAP (37 kBq). Los ratones fueron sacrificados 30 minutos después de la administración del radiofármaco. Se realizó, una incisión en el tórax del ratón y se removió el corazón y otros órganos como el riñón, hígado, pulmón y bazo. Los órganos los cuales fueron colocados en una caja Petri con PBS. Finalmente se obtuvieron las imágenes radioisotópicas y de rayos x del corazón y de los órganos extraídos mediante el sistema de generación de imágenes preclínicas Xtreme.

5.9.2 Inmunohistoquímica

Los tumores obtenidos del análisis de biodistribución, los corazones tratados con isoproterenol y los corazones utilizados como control negativo se utilizaron para la evaluación de expresión de FAP mediante inmunohistoquímica, para ello los órganos se colocaron en paraformaldeído al 4 % a temperatura ambiente por 24 horas, pasado el tiempo se embebieron en parafina y segmentado en láminas de 4 a 5 μ m utilizando un microtomo. La inmunohistoquímica se realizó mediante desparafinización, hidratación y recuperación de antígenos. Los portaobjetos se sumergieron en una solución de citrato-EDTA precalentada (pH 7,0, EDTA 2 mM, ácido cítrico 10 mM, Tween 2 al 0.05 %) a 100 °C durante 30 minutos. A esto le siguió una incubación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2 % durante 5 minutos y se trató durante 10 minutos con BSA al 5 % (bloqueo de peroxidasa endógena). Las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo anti FAP (Invitrogen F11-24; diluido 1:100). Los portaobjetos se lavaron y se incubaron con el anticuerpo IgG anti-conejo secundario conjugado con HRP a una dilución 1:100 durante 1 h y se enjuagaron dos veces. Se aplicó una solución Dako durante 60 s para visualizar las inmunorreacciones después de enjuagar con solución salina tamponada con Tris-Tween y agua destilada durante 5 minutos. El lavado con PBS-Tween eliminó el exceso de cromógeno. Finalmente, se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y se cubrieron con un cubreobjetos. Las imágenes se capturaron en un microscopio Axiostar utilizando una cámara INFINITY X-32 MP en formato TIF.

5.10 Evaluación clínica del sistema ^{68}Ga -iFAP.

En este estudio (Instituto Nacional del Cáncer y Comités de Ética de Cardiología: Protocolo No. 2022-MN03) participaron tres voluntarios sanos y tres pacientes. A dos pacientes se les diagnosticó cáncer (glioblastoma de alto grado y cáncer de mama) y uno tuvo un infarto de miocardio reciente. El concepto de microdosis de radiofármacos y los estudios de prueba de concepto fueron la base para la aprobación del ensayo. Además, se consideraron los estándares éticos de los Hospitales

Oncológicos y de Cardiología basados en la Declaración de Helsinki sobre experimentación humana y el certificado GMP otorgado al ININ por la Secretaría de Salud de México. Los voluntarios y pacientes dieron su consentimiento informado después de recibir información detallada sobre el propósito del estudio (Anexo III). El estudio podría ayudar a evaluar un nuevo radiofármaco o decidir el tratamiento y seguir la evolución de su enfermedad. Los pacientes se sometieron a imágenes PET/CT 30 minutos después de la administración intravenosa de ^{68}Ga -iFAP (185 MBq) (escáner PET/CT Biograph 64 True Point; Siemens). Se incluyeron tres voluntarios sanos (rango de edad: 28 a 33 años; edad media $\pm$ DE, $30 \pm 2,5$ años; un hombre y dos mujeres). Los sujetos fueron excluidos del estudio si tenían alguna enfermedad clínica o cirugía. Se realizó un examen médico y se tomó una historia clínica.

Los pacientes del estudio incluyeron: (1) Mujer de sesenta y ocho años (peso 56 kg, altura 156 cm) con diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma ductal infiltrante sin patrón específico, pobremente diferenciado con un diagnóstico histológico de Scar Bloom Richardson (SBR) valor de escala de 9 y grado 3 (SRB 9-G3) y con presencia de invasión vascular linfática. No se detectó invasión perineural; fenotipo triple negativo con Ki67 del 50 %. (2) Un hombre de ochenta años (53 kg, 180 cm de altura) con diagnóstico de glioblastoma de alto grado (glioblastoma IV de la OMS) y una resonancia magnética craneal previa (6 días antes) a quien se le realizó una exploración PET craneal y de cuerpo entero. La exploración de cuerpo entero también mostró captación de radiofármaco en una lesión asociada con cáncer de próstata, confirmada posteriormente por histopatología. (3) El tercer paciente fue un hombre de sesenta años con antecedentes de tabaquismo, alcoholismo, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión arterial sistémica de 20 años de evolución; no se informaron otros antecedentes cardiovasculares. Consultó por dolor torácico opresivo en escala de 8/10, irradiado a brazo izquierdo y cuello de 2 h de evolución, acompañado de cefalea, diaforesis y disnea. Al día siguiente presentó síntomas similares y fue ingresado en urgencias. El electrocardiograma basal mostró elevación del ST en derivaciones anteriores (V1-V4). Los análisis de sangre iniciales mostraron CK-MB 255 UI/L, CK 2623, glucosa 386 mg/dL y NT-proBNP 2638 pg/mL. Se incluyó el diagnóstico de infarto agudo de miocardio anterior con elevación del ST y sin perfusión. A los 3 días se realizó estudio de perfusión miocárdica con SPECT con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI; ININ) mediante protocolo de reposo-estrés, así como resonancia magnética cardíaca multiparamétrica. ^{68}Ga -DOTA-iFAP/PET se adquirió a los 10, 30 y 60 minutos después de la inyección del radiotrazador de la región cardíaca con fotogramas de 10 minutos, cada uno con corrección de atenuación de TC de dosis baja.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Modelado molecular

El modelado molecular realizó la comparación entre iFAP, DOTA- HYNIC-iFAP con las moléculas más representativas con inhibición confirmada, ARI-3099 y FAPI-04. A partir del modelado molecular se obtuvieron las constantes de afinidad y con ello se logró determinar la constante de inhibición, como se muestra en la tabla 3 tanto iFAP, como DOTA-HYNIC-iFAP mostraron constantes de inhibición significativamente mayores que ARI-3099 y FAPI-04, respectivamente. Además, con el modelado molecular se evaluaron los sitios de interacción tanto de iFAP (figura 11) como de DOTA-HYNIC-iFAP (figura 12) con el sitio activo de FAP, en donde ambos mostraron interacción con la Ser-624, la cual es responsable de la actividad enzimática de FAP.

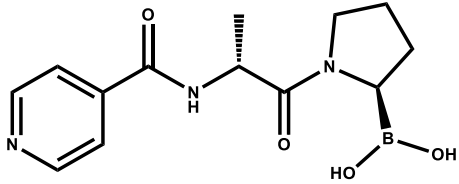
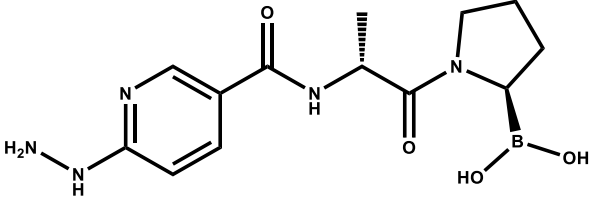
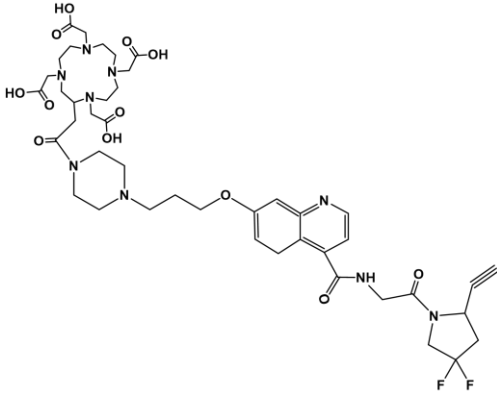
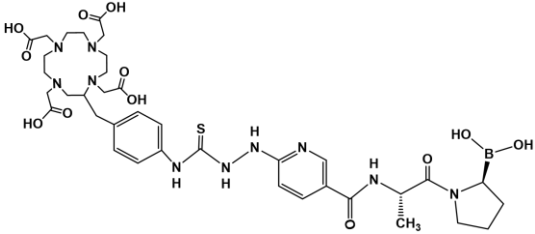
En el caso de la interacción de iFAP con FAP como se muestra en la figura 11, el incremento en la afinidad puede atribuirse a la presencia de los Nitrógenos en la hidrazina de HYNIC, los cuales favorecen las interacciones de van der Waals y los enlaces de hidrógeno de iFAP con los residuos Glu-203, Glu-204, Phe-350 y Phe-351.

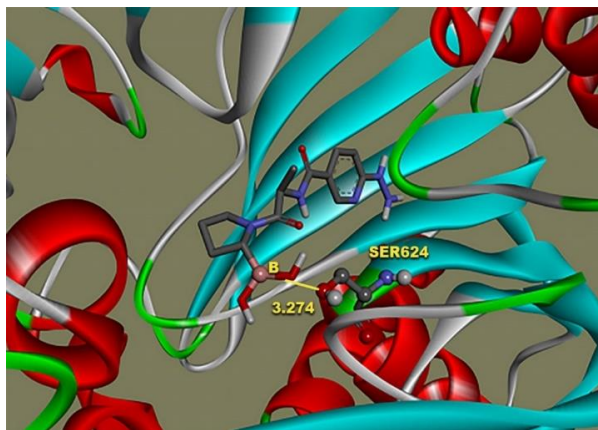
En el caso de la interacción de DOTA-HYNIC-iFAP con FAP como se muestra en la figura 12, el aumento de la constante de afinidad incluso significativamente mayor que iFAP se puede atribuir al mayor carácter hidrofóbico de DOTA-HYNIC-iFAP, el cual interacciona de forma más favorable con el pocket hidrofóbico S1 que se encuentra en la entrada del sitio activo de FAP, como se puede apreciar en las interacciones de DOTA-iFAP con los residuos de aminoácidos de FAP correspondientes a Tyr-625, Tyr-541, Trp-623, Gly-735 y Gly-626.

Es importante mencionar que se tiene confirmado que la participación del residuo de Ala-123 es lo que le proporciona la actividad endopeptidasa a FAP, tanto de iFAP, como de DOTA-iFAP interacción con Ala-123, lo cual se atribuye a una selectividad de los inhibidores hacia FAP sobre las DDPs[78].

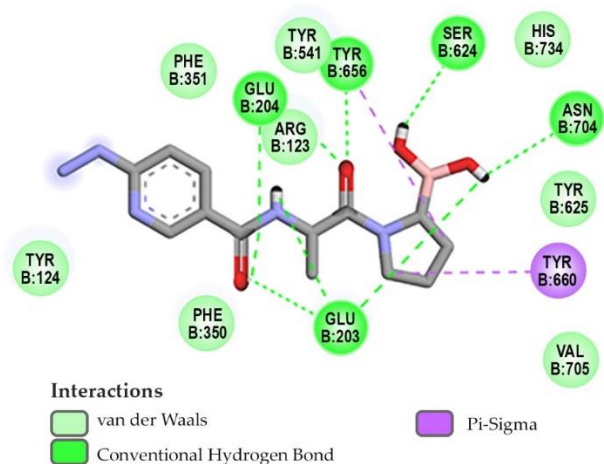
Estos resultados *in silico* soportaron la posibilidad de que tanto la estructura de iFAP y DOTA-iFAP poseían interacción selectiva y afinidad hacia FAP.

Tabla 3. Comparación de las afinidades, K_i y distancia de enlace de los ligandos evaluados por docking y la proteína FAP.

Ligando	Afinidad (kcal/mol)	K_i (nM)	Distancia Ser-624 a Boro (Å)
ARI-3099 	-6.60	14.07	3.657
iFAP 	-8.53	0.536	3.247
FAPI-04 	-10.56	18.12	4.29
DOTA-D-Alanine-BoroPro (DOTA-iFAP) 	-10.89	18.02	4.49

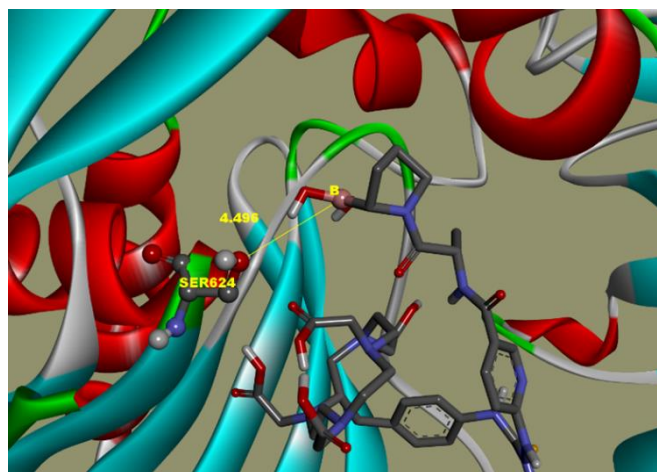


(a)

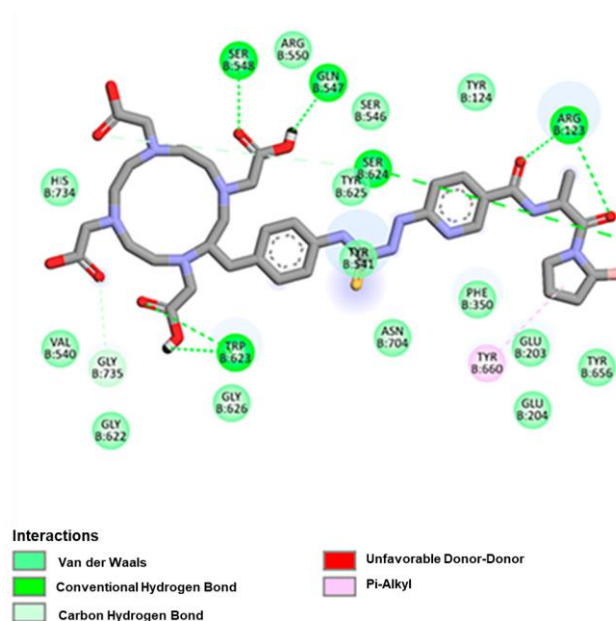


(b)

Figura 11. Modelado molecular: (a) interacción de iFAP en el sitio activo de FAP (b) mapeo de interacciones entre iFAP y los residuos de aminoácidos de FAP.



(a)



(b)

Figura 12. Modelado molecular: (a) interacción de DOTA-iFAP en el sitio activo de FAP (b) mapeo de interacciones entre DOTA-iFAP y los residuos de aminoácidos de FAP.

6.2 Caracterización Fisicoquímica del sistema ^{99m}Tc -iFAP

6.2.1 Caracterización por UV-Vis

El espectro UV-vis del HYNIC-iFAP muestra bandas a 206 nm y 208 nm, que están asignados a las transiciones $n \rightarrow \sigma^*$ de la hidracina (C-NH-NH_2). La banda fuerte a 275 nm y el hombro a 304 nm están asociados con transiciones de $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ (grupos $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}=\text{N}$) del anillo de piridina. Como se puede observar en la figura 13.

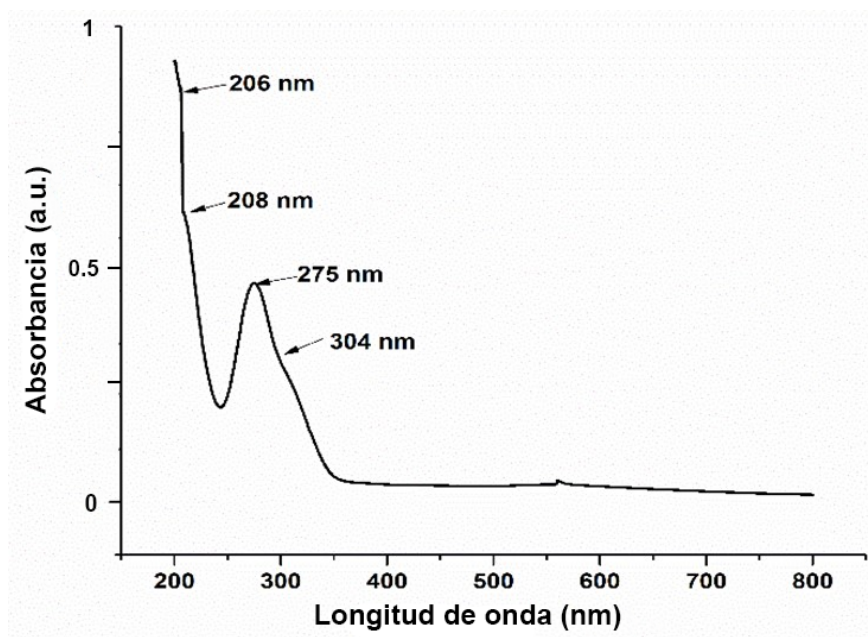


Figura 13. Espectro UV-vis de iFAP

6.2.2 Caracterización FT-IR

En el espectro FT-IR de iFAP que se muestra en la figura 14, las bandas en 1359 cm^{-1} y 1316 cm^{-1} son asociadas con la vibración B-O del ácido borónico [79] y la banda en 3335 cm^{-1} es asociada con las vibraciones (N-H) ν del anillo de piridina. La banda a 3240 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones generadas tanto por los grupos O-H del ácido bórico como de la vibración N-H de la amina hidracina. La banda a 2950 cm^{-1} corresponde a la vibración ν_s , mientras que la banda a 2880 cm^{-1} indica la vibración ν_{as} de $\text{-C-H(CH}_3\text{)}$ del aminoácido alanina. Las bandas encontradas en la región de 2978 cm^{-1} y 2835 cm^{-1} corresponden a las vibraciones (-CH_2) ν_s y (-CH_2) ν_{as} de los metilenos en el anillo de prolina [80]. La banda en 1675 cm^{-1} está asociada a las vibraciones $\text{C}=\text{O}$ de la amida terciaria, mientras que la banda en 1608 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones $\text{C}=\text{O}$ de la amida secundaria. Las bandas entre $1450\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ están asignadas a la región del anillo aromático $\text{C-C}=\text{C}$; las de 3064 cm^{-1} y 3032 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de estiramiento de C-H aromático, y las bandas en 1128

cm^{-1} y 1199 cm^{-1} se asocian a la flexión en el plano de C-H aromático, mientras que las bandas entre $900\text{--}670\text{ cm}^{-1}$ se atribuyen a las vibraciones de flexión fuera del plano del C-H aromático; todos ellos resultado de la presencia del anillo piridina [81]. Las bandas entre $1450\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ también se correlacionan con las vibraciones de estiramiento C-N y C-N-H de la amida II.

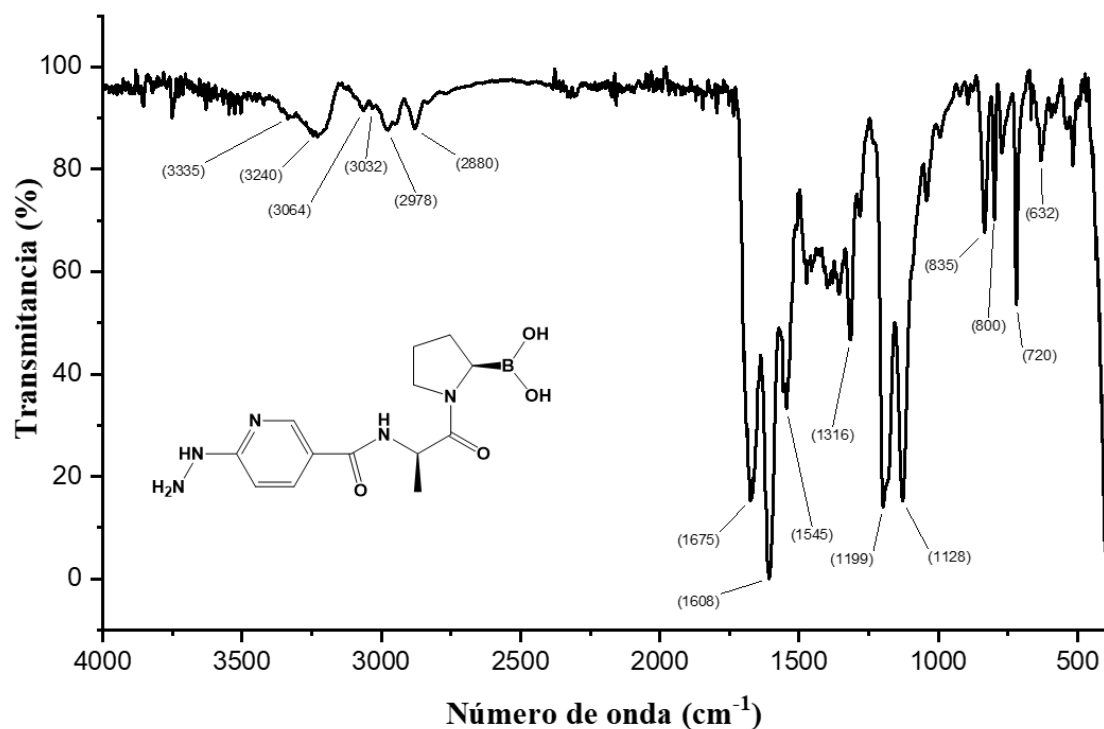


Figura 14. Espectro FT-IR de iFAP.

6.2.3 Pureza radioquímica

El análisis de HPLC de fase reversa del producto iFAP después del liofilizado mostró un pico a un tiempo de retención de 10.3 min, como se observa en la figura 15, se recuperó el producto perteneciente a ese tiempo de retención y se evaluó por espectrometría de masas como lo indica el apartado 5.3.1.3 correspondiendo con el peso molecular de iFAP, igualmente se evaluó el espectro UV-Vis, el cual correspondía al espectro de la iFAP (figura 13). La pureza química fue de 92 %.

Para la pureza radioquímica, el tiempo de retención de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP observado fue de 10.9 min, los 0.6 min diferentes al tiempo de retención de iFAP corresponden al tiempo que tarda la muestra en pasar por el detector de radiactividad que se encuentra después que el detecto de UV-Vis. Como se observa en la figura 16 la pureza radioquímica fue mayor al 98 %, también se pueden observar 2 señales a tiempos de retención de 3.5 min y 6.0 min, las cuales se atribuyen a las impurezas de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/Tricina, respectivamente.

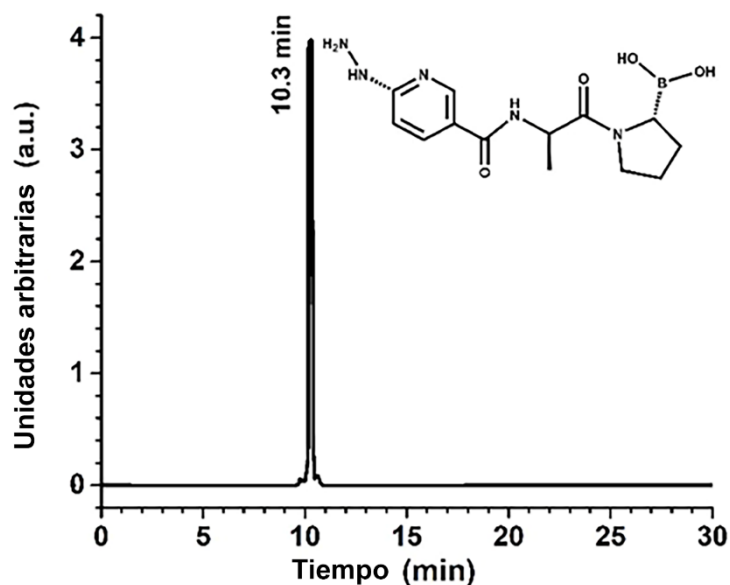


Figura 15. Cromatograma HPLC de iFAP.

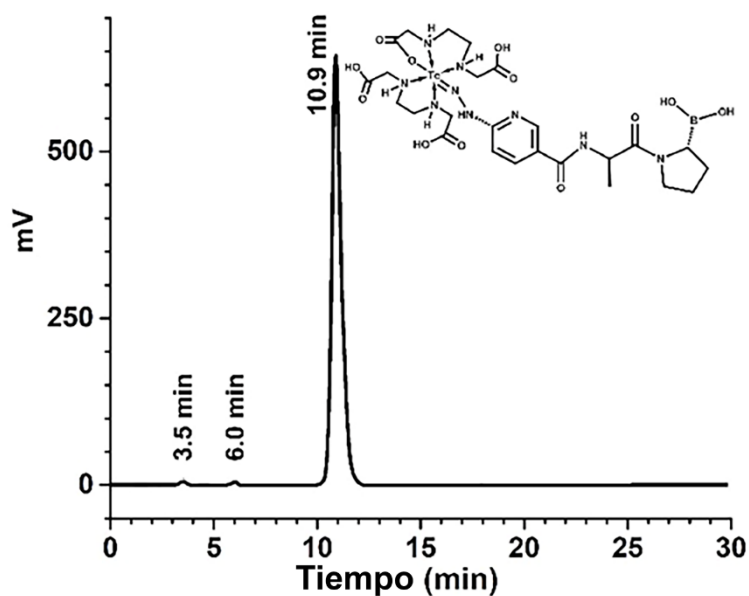


Figura 16. Cromatograma radio HPLC de ^{99m}Tc -iFAP

6.2.4 Espectrometría de masas

El producto final presentó el espectro de masas esperado, en la figura 17 se puede observar el ion molecular con una señal en m/z 322 (Calc. 321) $[\text{M}+\text{H}]^+$, también se observa el peso molecular de la forma dimerizada con un m/z 646 (Calc. 321) $2\text{x}[\text{M}+2\text{H}]^+$. Otras señales observadas a 304 y 607 m/z corresponden a la formación de iones éster de boronato asignados a $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ y $2\text{x} [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$,

respectivamente[82], [83]. El espectro de UV-Vis correspondiente con el tiempo de retención de iFAP mediante HPLC.

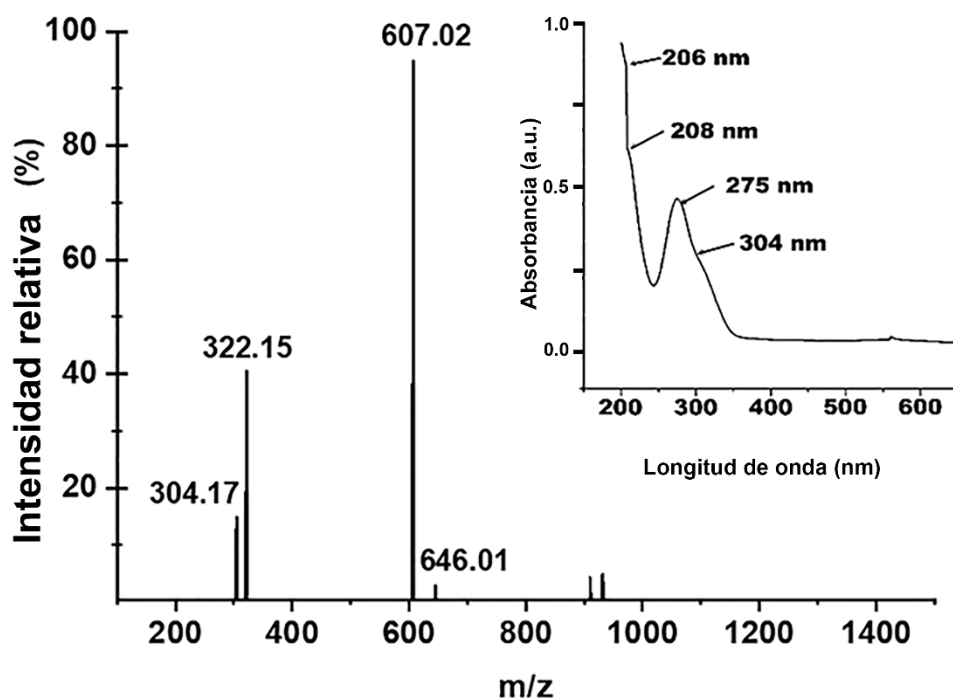


Figura 17. Espectro de masas de iFAP.

6.3 Evaluación *in vitro* de ^{99m}Tc -iFAP

6.3.1 Análisis de western blot

Dado que FAP es una peptidasa anclada a membrana altamente expresada por fibroblastos asociados a cáncer en el estroma tumoral de casi todos los tipos de tumores epiteliales malignos, no es posible evaluar la afinidad de ^{99m}Tc -iFAP utilizando células cancerosas no transfectadas. El uso de un cultivo de células cancerosas primarias, obtenido mediante un procedimiento de biopsia, es una opción, ya que hay estroma tumoral presente. Las células N30 utilizadas en esta investigación son células endometriales del estroma humano primario [84]. La expresión de FAP en células N30 se confirmó mediante análisis de Western blot (figura 18), en donde se emplearon el anticuerpo monoclonal anti-FAP y fibroblastos humanos como control negativo.

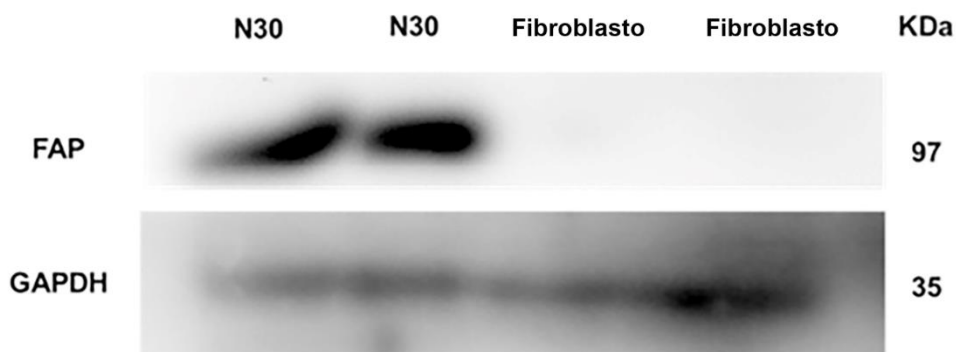


Figura 18. Ensayo de Western blot para las células N30 FAP + (tumor primario estromal) y fibroblastos humanos FAP -. GAPDH fue utilizada como control de peso molecular.

6.3.2 Reconocimiento de iFAP por FAP expresada en células N30

El ligando iFAP se unió covalentemente a la superficie de nanopartículas de óxido de lutecio (solución coloidal Lu_2O_3 -iFAP), en la imagen de fluorescencia se puede observar la internalización de las nanopartículas en las células N30 (figura 19b); muy probablemente debido a un reconocimiento molecular específico (iFAP/FAP) como primera interacción, y luego, como mecanismo de internalización pasiva, debido a la naturaleza inherente de las nanopartículas (50-100 nm). Cuando las nanopartículas de Lu_2O_3 no se conjugaron con el ligando iFAP, la internalización celular fue escasa (figura 19e), lo que representa evidencia cualitativa del reconocimiento específico de iFAP (figura 19).

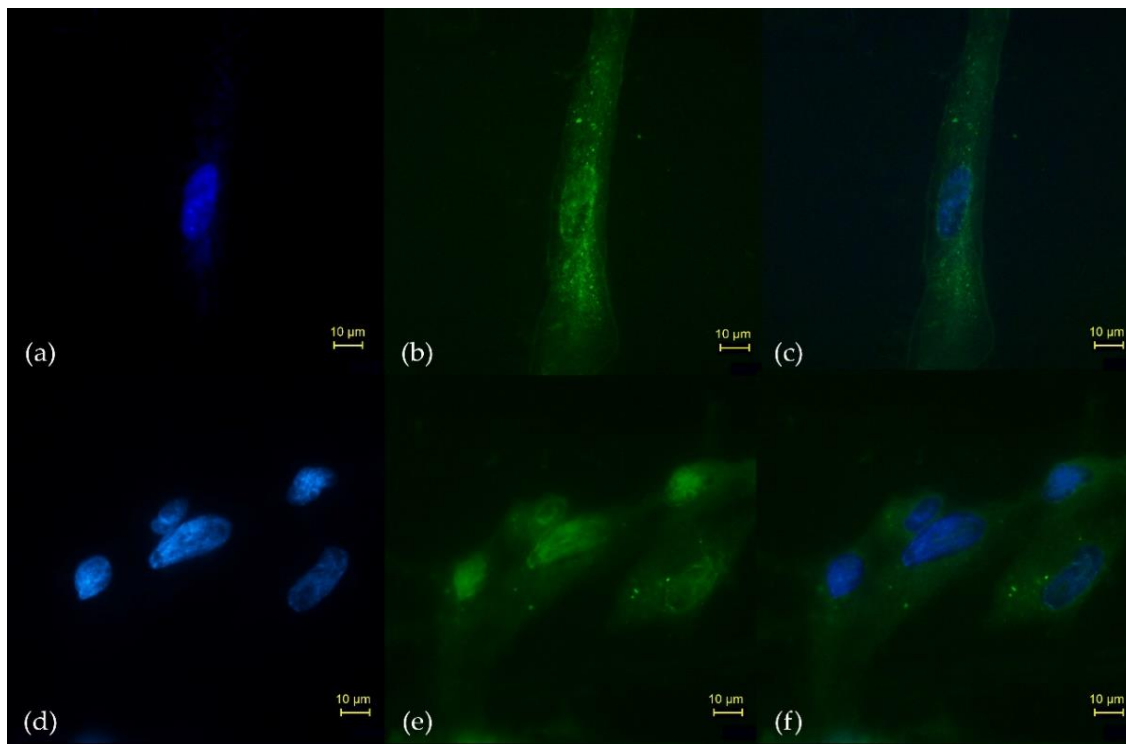


Figura 19. Campos microscópicos de 40x. (a,d) Núcleos de las células N30 FAP +, (b) Lu_2O_3 -iFAP (Control) (c, e) imágenes fusionadas.

6.3.3 Captación e internalización

Como se muestra en la figura 20 en el ensayo de captación e internalización celular, se encontró que N30 mostró una diferencia significativa en el porcentaje de captación celular de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP en comparación con los fibroblastos ($p < 0,05$). Sin embargo, en el caso de internalización de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP tanto las células N30 como los fibroblastos mostraron mínima internalización, sin diferencia significativa entre ellas, lo que confirma que la captación del sistema $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP está asociada con la expresión de FAP en la membrana de las células N30 del estroma y que la interacción radiofármaco con FAP no desencadena la internalización del sistema.

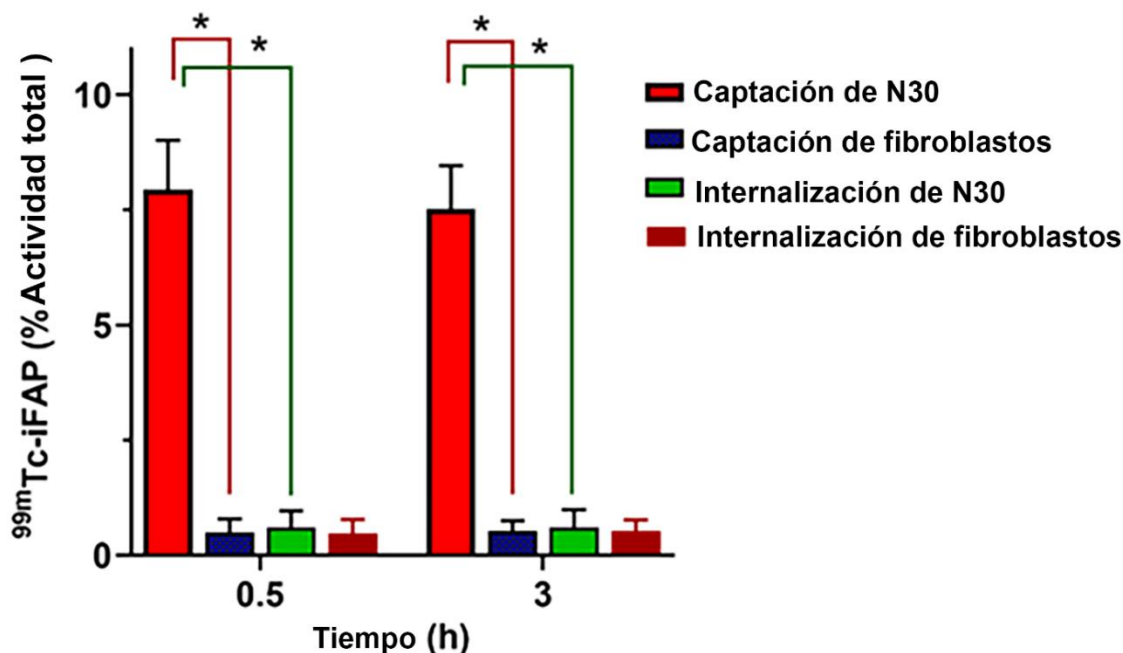


Figura 20. Captación e internalización de ^{99m}Tc -iFAP en células N30 FAP + y Fibroblastos humanos FAP- (n=6). Diferencia significativa $p < 0.05$ t-student.

6.4 Evaluación *in vivo* de ^{99m}Tc -iFAP

6.4.1 Biodistribución

La evaluación de la biodistribución de ^{99m}Tc -iFAP en ratones desnudos con tumores inducidos de cáncer de hígado (células Hep-G2) mostró una captación tumoral del 7.05 % y del 5.18 % de la actividad administrada por gramo de tejido (% ID/g) a los 30 min y 2 h después de la inyección, respectivamente, con eliminación rápida principalmente a través de los riñones (Tabla 4).

En la figura 21 se muestran los análisis biocinéticos en los cuatro principales tejidos/órganos diana del radiofármaco: sangre, hígado, riñones y tumor. Los resultados indicaron un aclaramiento sanguíneo muy rápido, donde el 88.6 % del radiotrazador se eliminó con una vida media (rápida) de 0.24 h ($t_{1/2} = \ln 2/2.93$) y 11.4 % con una vida media (lenta) de 2.57 h ($t_{1/2} = \ln 2/0.27$). El modelo biocinético de los riñones mostró un comportamiento de eliminación triexponencial (tres fases de eliminación), donde el 49.4 % de la actividad fue eliminada con una vida media (rápida) de 0.26 h ($t_{1/2} = \ln 2/2.71$), el 6.3 % con una vida media de 0.45 h ($t_{1/2} = \ln 2/1.54$), y el 44.3 % tuvo un tiempo medio de eliminación (lenta) de 3.85 h ($t_{1/2} = \ln 2/0.18$). De todas las constantes de eliminación mostradas en el modelo biocinético de los principales órganos diana, el tumor tuvo la constante de

eliminación rápida más baja ($\lambda_{\text{eff}} = 0.41$), así como la constante de eliminación lenta más baja ($\lambda_{\text{eff}} = 0.12$), con respecto a todos los demás órganos; por lo tanto, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP mostró los tiempos de residencia más largos en los tumores. El ligando frío (iFAP) no mostró efectos adversos cuando se administró en una dosis de 40 mg/kg a ratones Balb-C sanos.

Tabla4. Biodistribución de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP in ratones con tumores (Hep-G2) inducidos, indicado como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).				
Tejido	Tiempo			
	15 min	3 min	2 h	24 h
Sangre	2.07 ± 0.63	1.02 ± 0.32	0.33 ± 0.05	0.01 ± 0.0
Corazón	1.75 ± 0.08	0.88 ± 0.23	0.19 ± 0.03	0.00
Pulmón	1.11 ± 0.51	0.65 ± 0.19	0.02 ± 0.01	0.00
Hígado	2.78 ± 0.42	2.14 ± 0.51	1.05 ± 0.29	0.05 ± 0.03
Páncreas	0.64 ± 0.10	0.31 ± 0.12	0.12 ± 0.04	0.00
Bazo	1.07 ± 0.17	0.82 ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.00
Riñón	13.85 ± 2.27	11.18 ± 1.54	7.46 ± 1.02	1.89 ± 0.53
Intestino	1.42 ± 0.74	0.93 ± 0.14	0.22 ± 0.10	0.00
Estomago	0.71 ± 0.08	0.39 ± 0.12	0.25 ± 0.03	0.00
Músculo (muslo izquierdo)	0.39 ± 0.15	0.31 ± 0.11	0.18 ± 0.06	0.00
Hueso	0.20 ± 0.09	0.14 ± 0.06	0.13 ± 0.02	0.00
Tumor	9.87 ± 1.94	7.05 ± 1.13	5.18 ± 0.82	2.37 ± 0.26

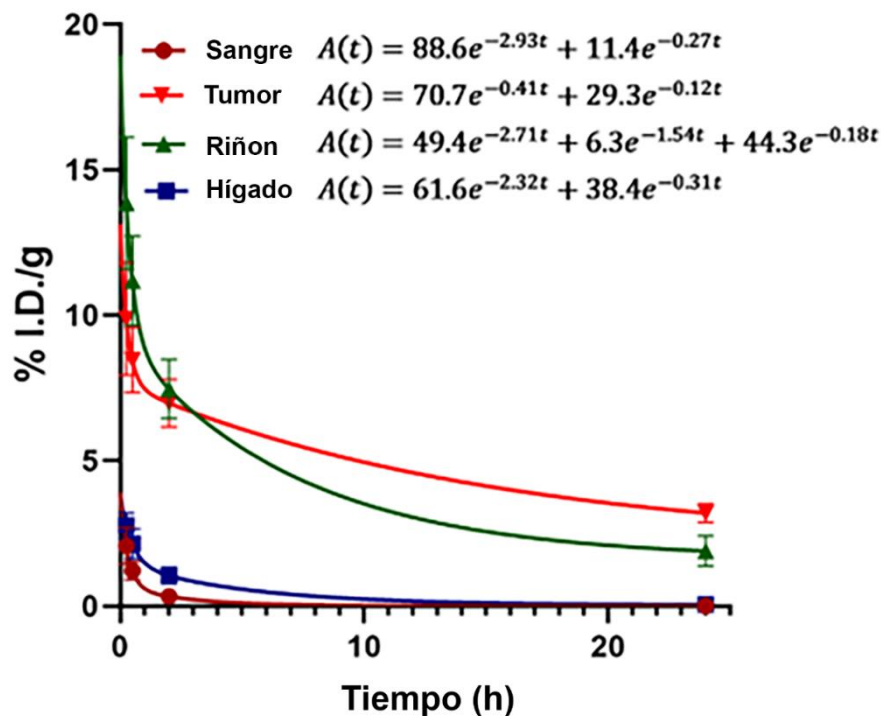


Figura 21. Modelo biocinético de $^{99m}\text{Tc-iFAP}$ en los 4 órganos principales: Sangre, tumor, riñón e hígado (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ t-student.

6.5 Generación de imagen

Las imágenes Micro SPECT/CT de $^{99m}\text{Tc-iFAP}$ en ratones desnudos con lesiones de Hep-G2 inducidas mostraron una alta captación tumoral ($\text{SUV}_{\text{max}} = 5.0 \pm 1.2$) a los 30 minutos después de la administración (figura 22a), la captación tumoral mostró una diferencia significativa a las 24 h ($\text{SUV}_{\text{max}} = 2.7 \pm 0.6$) (figura 22b), como se observa en los muslos derechos de ratones, donde se inocularon las células cancerosas (control positivo). En los muslos izquierdos se indujo un proceso inflamatorio con bacterias muertas (control negativo) en los cuales no se observó captación del radiotrazador $^{99m}\text{Tc-iFAP}$ (figura 22).

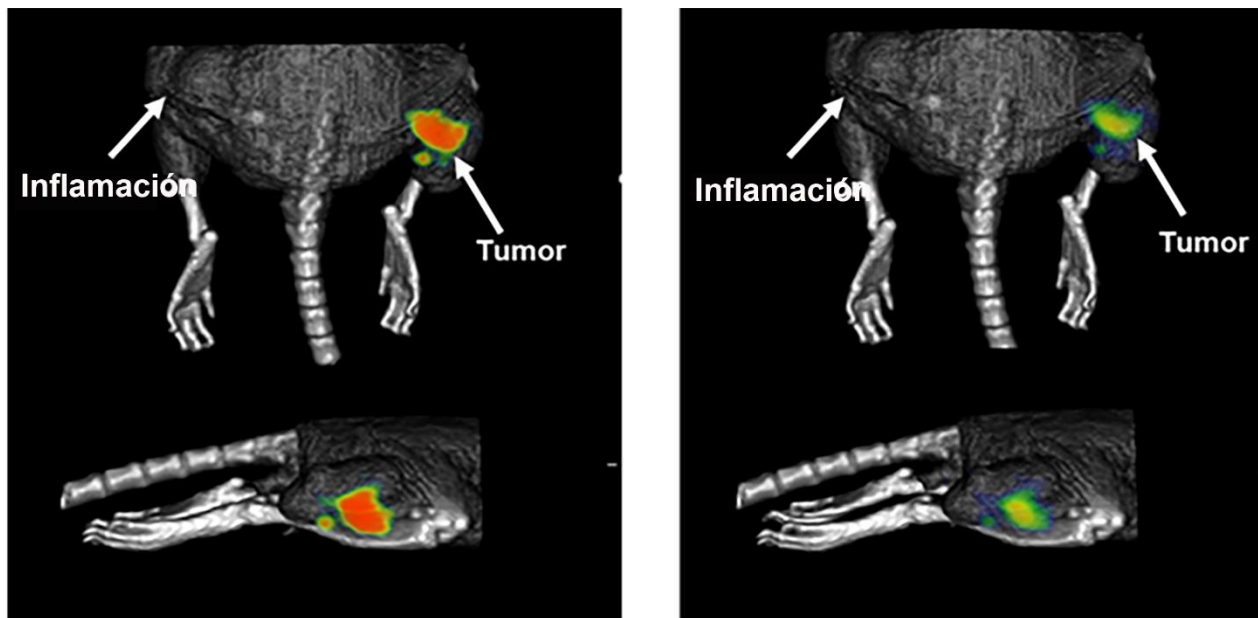


Figura 22. Imágenes Micro-SPECT/CT de ^{99m}Tc -iFAP en un ratón desnudo con tumor Hep-G2 inducido a (a) 30 min (SUV máx. de 5.6) y (b) 24 h (SUV máx. de 2.4) después de la administración del radiofármaco. El muslo izquierdo, donde se indujo un proceso inflamatorio con bacterias muertas (control negativo), no se observó captación del radiotrazador.

6.6 Evaluación fisicoquímica de ^{68}Ga -DOTA-iFAP

6.6.1 Caracterización UV-Vis

El espectro UV-Vis de iFAP muestra bandas a 206 nm y 208 nm, relacionadas con las transiciones de hidracina (C-NH-NH_2) $n \rightarrow \sigma^*$ (figura 13). Estas bandas desaparecen en DOTA-iFAP (figura 23) debido a la interacción entre el N de hidracina y el carbonilo de benceno-DOTA. Además, aparece la banda a 260 nm asociada con las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ del grupo $-\text{C}=\text{S}-\text{N}-$. El hombro a 297 nm está asociado con las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ del anillo de piridina (grupo $\text{C}=\text{N}-$).

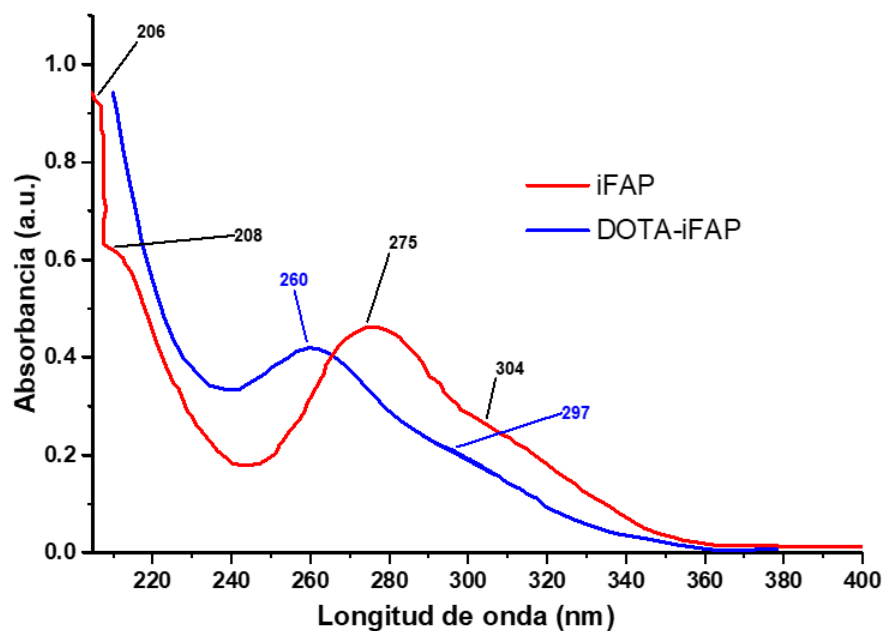


Figura 23. Espectro UV-Vis de iFAP y DOTA-iFAP.

6.6.2 Espectrometría FT-IR:

En el espectro FT-IR de iFAP, se observaron bandas a 3335 cm^{-1} , 1675 cm^{-1} , 1128 cm^{-1} y 1199 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones NH (de hidracina) (figura 14). Estas bandas desaparecieron en el espectro DOTA-iFAP; en su lugar aparecieron las bandas correspondientes a N-H (1683 cm^{-1} y 1617 cm^{-1}). Además, se observó una nueva banda en la señal de 1457 cm^{-1} , asignada a los grupos -C=O del anillo DOTA (figura 24). En ambos espectros se observaron las bandas correspondientes a la vibración B-O ($1359\text{-}1355\text{ cm}^{-1}$) y las correspondientes a las $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ y $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ (2989 cm^{-1} y 2880 cm^{-1}).

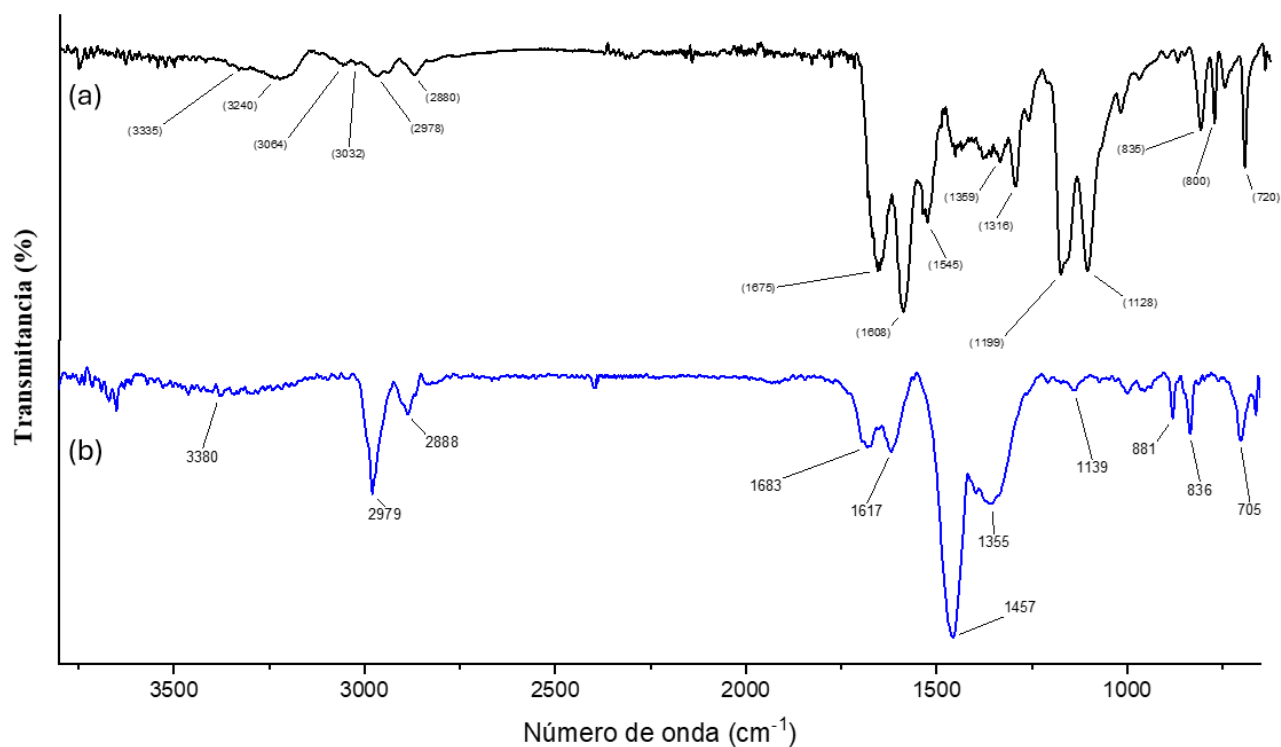


Figura 24. Espectro FT-IR de: (a) iFAP, (b) DOTA-iFAP.

6.6.3 Pureza radioquímica

El espectro del análisis por HPLC de fase reversa (figura 25) realizado al final de la reacción muestra la presencia de iFAP (colocado en exceso) con un tiempo de retención (t_R) de 11.09 min y DOTA-iFAP ($t_R = 11.5$ min), lo que comprobó que se llevó a cabo la reacción de conjugación. La diferencia entre los tiempos de retención permitió la purificación por HPLC del conjugado DOTA-iFAP (utilizando una columna preparativa C-18).

El análisis por radio HPLC del DOTA-iFAP radiomarcado con ^{68}Ga mostró un rendimiento radioquímico de $76.2 \pm 5.2\%$ y una pureza radioquímica superior al 95 % (figura 26) con un tiempo de retención de 12.17 min. La diferencia entre los tiempos de retención de DOTA-iFAP (11.5 min) y ^{68}Ga -DOTA iFAP (^{68}Ga -iFAP) (12.17 min) se debe a que el volumen del tubo entre el detector de radio y el detector UV-Vis es de 0.7 mL, lo que produce una diferencia. entre los cromatogramas de 0.7 min a un caudal de 1 ml/min.

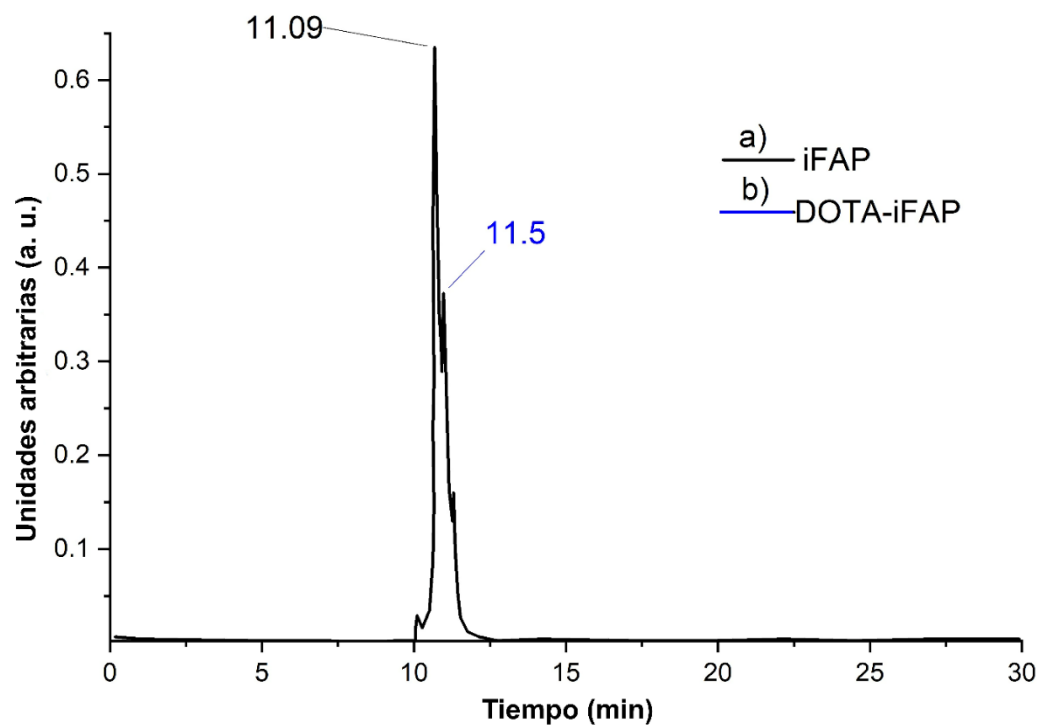


Figura 25. Cromatograma HPLC de iFAP y DOTA-iFAP.

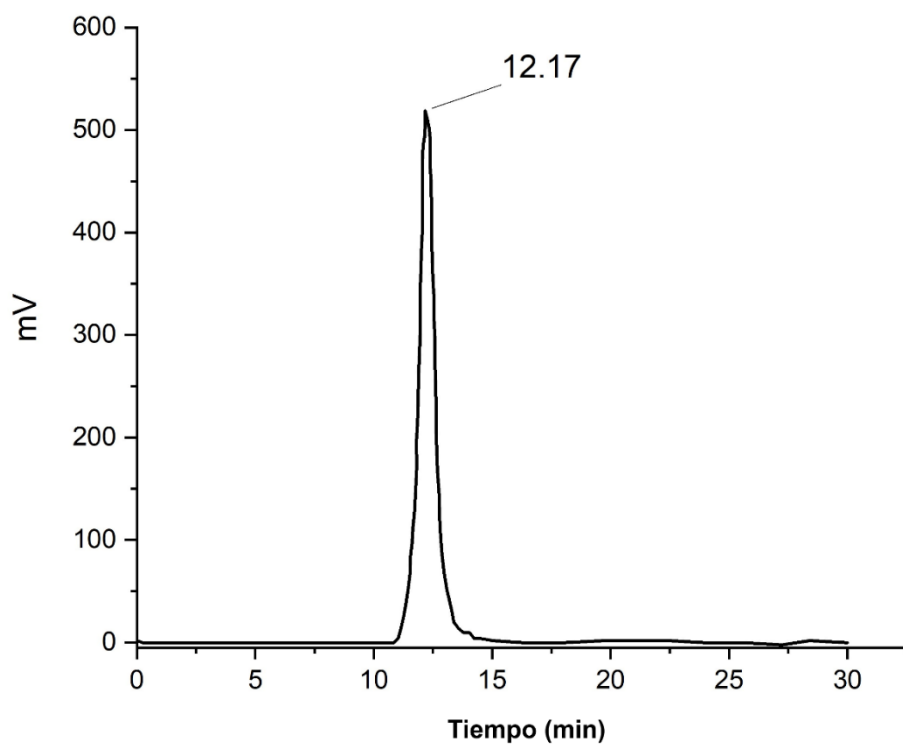


Figura 26. Cromatograma radio-HPLC de ^{68}Ga -DOTA-iFAP.

6.6.4 Espectrometría de masas

El espectro de masas de HPLC para el pico iFAP ($t_R = 11.04$ min) mostró la señal correspondiente con m/z 322 (cal. 321) $[M+H]^+$ y m/z 606 $2 \times [M+H-H_2O]^+$ (figura 27a), mientras que el espectro de masas de HPLC para el pico DOTA-iFAP ($t_R = 11.5$ min) mostró señales correspondientes con m/z 855,48 (cal. 872) $[M+H-H_2O]$ y m/z 428,29 $[M+H-H_2O]/2$. Se observó el mismo espectro para el producto DOTA-iFAP liofilizado purificado (figura 27b).

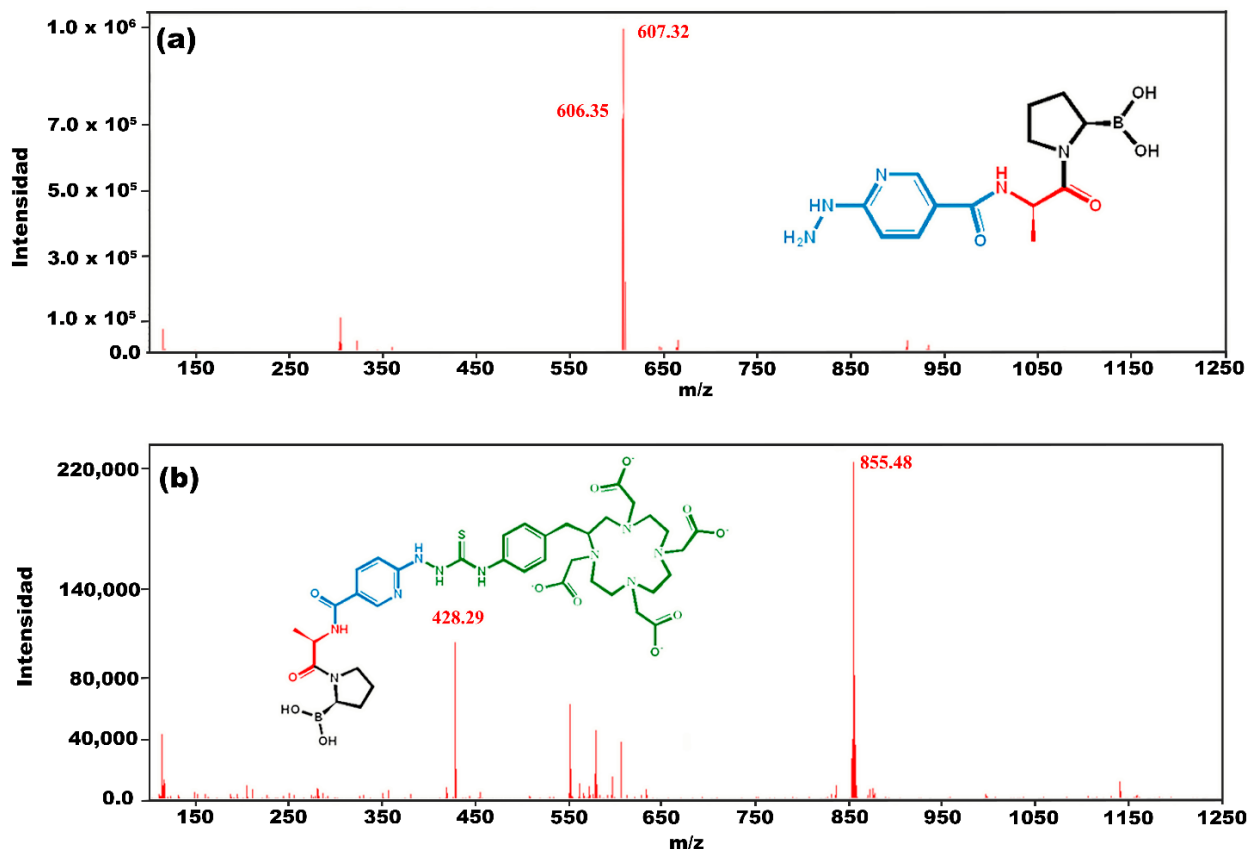


Figura 27. Espectro de masas: (a) iFAP, (b) DOTA-iFAP.

6.7 Evaluación *in vitro* del sistema ^{68}Ga -DOTA-iFAP

6.7.1 Ensayo de afinidad

El ensayo de unión competitiva de ^{68}Ga -iFAP con el péptido no marcado (DOTA-iFAP) en células HCT116 mostró una IC_{50} de ^{68}Ga -iFAP de 5.7×10^{-10} M (0.57 nM) (figura 28). El valor de IC_{50} indicó una buena afinidad por la proteína FAP en comparación con el de ^{68}Ga -FAPi-04 ($\text{IC}_{50} = 6.5$ nM) o ^{68}Ga -FAPi-13 ($\text{IC}_{50} = 4.5$ nM) [85]. Sin embargo, para una comparación real, los ensayos de unión deben realizarse en las mismas condiciones experimentales.

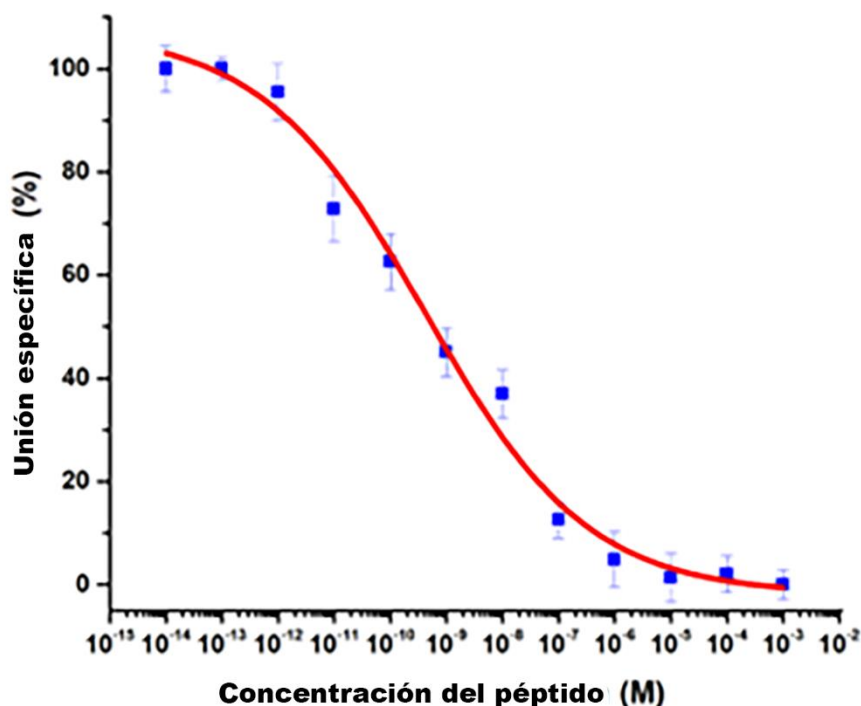


Figura 28. Ensayo de afinidad de ^{68}Ga -DOTA-iFAP (420 nmol/GBq) con 12 concentraciones del péptido no marcado DOTA-iFAP en células HCT116 (1×10^5 células/placa). ^{68}Ga -DOTA-iFAP $\text{IC}_{50} = 5.7 \times 10^{-10}$ M (0.57 nM).

6.7.2 Ensayo de Western Blot e inmunofluorescencia

La expresión de FAP en células HCT116 (FAP teñida de verde con anti FAP y núcleos teñidos de azul con DAPI) y la baja expresión de FAP en células AR42J (figura 29) se confirmaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y Western blot. (figura 30) asegurando que la absorción de ^{68}Ga -DOTA-iFAP es específica y esté asociada con la presencia de FAP en las células HCT116.

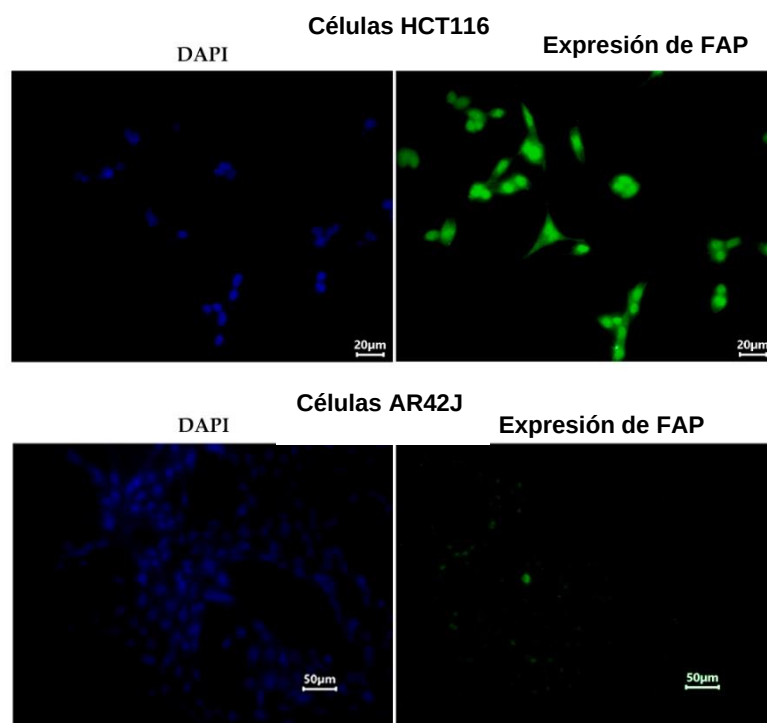


Figura 29. Micrografías de inmunofluorescencia para las células HCT116 (arriba), demostrando la expresión positiva de FAP y células AR42J (abajo) con baja expresión de FAP.

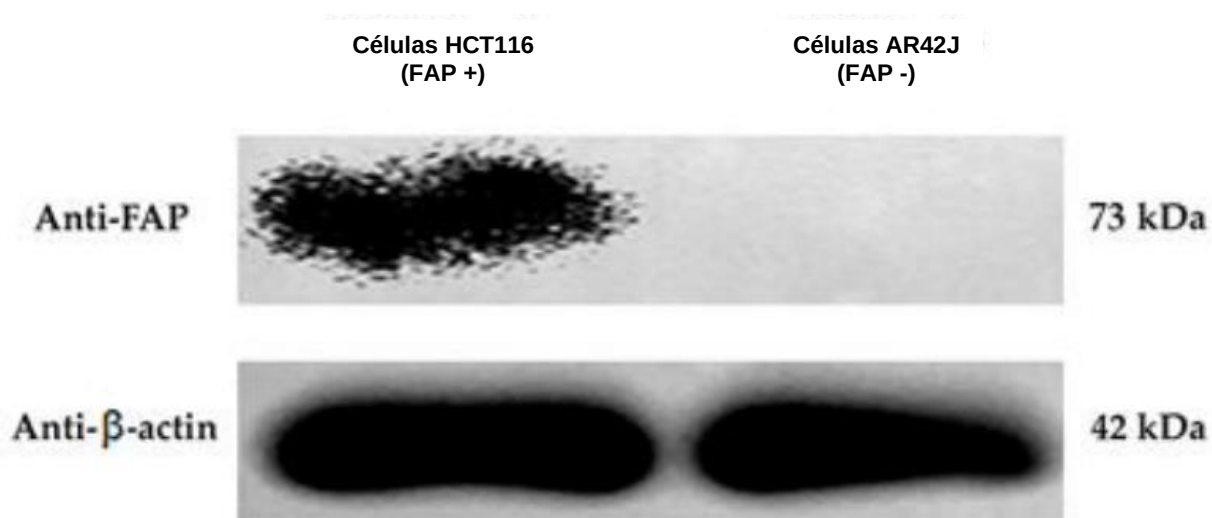


Figura 30. Ensayo de western blot que demuestra la expresión de FAP de las células HCT116 en comparación con las células AR42J. Se utilizó anticuerpo de B-Actina control de peso molecular.

6.7.3 Captación e internalización

En la cinética de captación e internalización (figura 31), se observó que las células HCT116 (control positivo FAP) absorbieron el radiofármaco ^{68}Ga -DOTA-iFAP con una rápida internalización. Es decir, después de 30 minutos de incubación, la proporción de captación de ^{68}Ga -DOTA-iFAP con respecto a las células AR42J fue cercana a 1 porque todo el ^{68}Ga -iFAP captado por las células HCT116 ya se había internalizado (relación de internalización HCT116/AR42J mayor a 4).

La captación e internalización de ^{68}Ga -iFAP por las células AR42J no fue significativamente diferente de la señal de fondo. Después de 60 min, la cantidad de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en la membrana HCT116 (captación celular) aumentó significativamente (casi cuatro veces más que en las células AR42J), asociado con el tiempo de máxima captación celular, del cual una cantidad significativa fue internalizada después de 120 min.

Lindner et al. también demostró una internalización rápida y significativa de ^{68}Ga -FAPI-01 y ^{68}Ga -FAPI-02 de 30 a 60 minutos, lo que se atribuyó a un proceso de endocitosis dependiente de dinamina [86]. Por lo tanto, ^{68}Ga -DOTA-iFAP reconoce específicamente la proteína FAP, como se demuestra en este ensayo, que se correlaciona con el reconocimiento específico $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP [87].

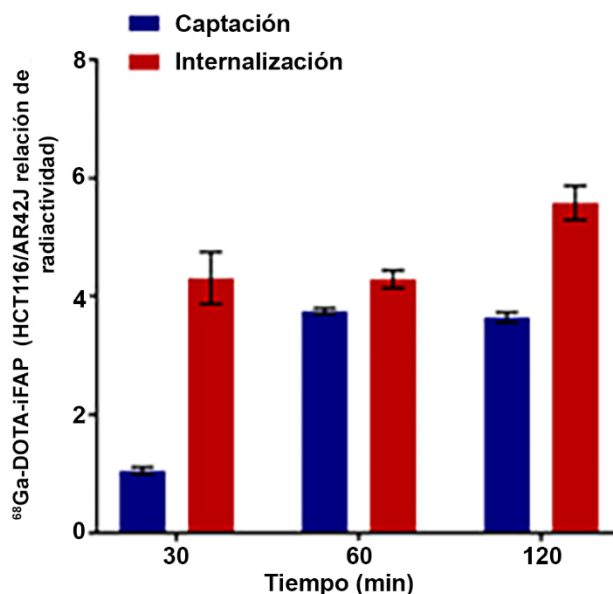


Figura 31. Relación de la captación e interacción de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en las células HCT116 respecto a las células AR42J como relación de la actividad de ^{68}Ga (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ t-student.

6.8 Evaluación *in vivo* de ^{68}Ga -DOTA-iFAP

6.8.1 Biodistribución

La evaluación de la biodistribución de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en ratones nu/un con tumores de cáncer de pulmón inducido (células HCT116) mostró una captación tumoral de $2.09 \pm 0.59\%$ de la actividad administrada por gramo de tejido (% ID/g) a los 30 minutos después de la inyección. Igualmente se observó una ligera disminución a 1 y 2 h ($1.98 \pm 0.45\%$ y 1.92 ± 0.68 , respectivamente). La eliminación extremadamente rápida se produjo principalmente por vía renal (figura 32). La biocinética en los cuatro órganos o tejidos dianas principales del radiofármaco (sangre, hígado, riñón y tumor) también se muestra en la figura 32. Los resultados indicaron una rápida eliminación en la sangre, lo que se correlacionó con los resultados encontrados en la distribución de otros FAPI [87], [88]. En el grupo de ratones con bloqueo del receptor, la captación del tumor fue de $0.69 \pm 0.13\%$ ID/g, que fue significativamente menor ($p < 0,05$) en comparación con el grupo no bloqueado (figura 32). El análisis inmunohistoquímico del tumor *ex vivo* mostró expresión de FAP, que puede asociarse con la captación tumoral específica de ^{68}Ga -DOTA-iFAP (figura 33). Además, la administración de radio ligando no mostró efectos adversos cuando se administró a ratones de laboratorio.

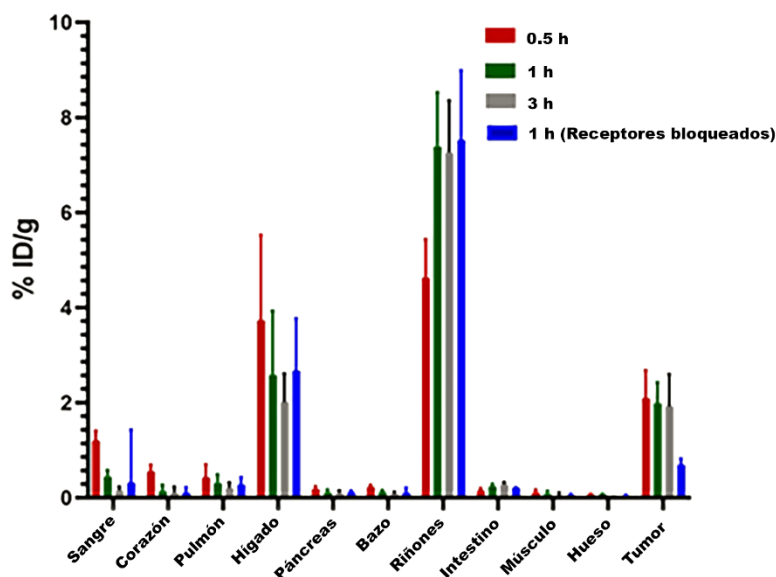


Figura 32. Biodistribución de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en ratones con tumores de cáncer de colon HCT116 a 0,5, 1 (con receptores bloqueados y desbloqueados) y 3 h después de la administración (n=3). Diferencia significativa $p < 0.05$ t-student.

6.9 Evaluación *ex vivo* de ^{68}Ga -DOTA-iFAP

6.9.1 Imágenes *ex vivo* del modelo de ratón infartado

Los ratones tratados con isoproterenol exhibieron una alta captación cardíaca de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en comparación con los corazones de control, como lo demuestran las imágenes radioisotópicas/de rayos X/*ex vivo* (figura 34). La alta captación del radiotrazador se asoció con la inducción de la expresión de FAP en respuesta al daño del tejido miocárdico inducido por isoproterenol, como lo confirma la inmunohistoquímica (figura 33), donde se puede observar, la expresión de FAP (color marrón) en el corazón de ratón del grupo tratado (infarto inducido) ya que, en condiciones normales, el corazón no sobreexpresa FAP como se demuestra en el grupo control (figura 35). Este hallazgo confirma el potencial de ^{68}Ga -DOTA-iFAP para determinar el riesgo de fibrosis excesiva después de un infarto de miocardio porque los fibroblastos reactivos modulan la fibrosis cardíaca y, en consecuencia, la remodelación del tejido postinfarto [89], [90], [91]. Por tanto, ^{68}Ga -iFAP puede proporcionar información sobre la progresión de la fibrosis y permitir una estimación de la supervivencia del paciente después de un infarto de miocardio, como se ha propuesto para otros derivados de FAPI [92], [93], [94].

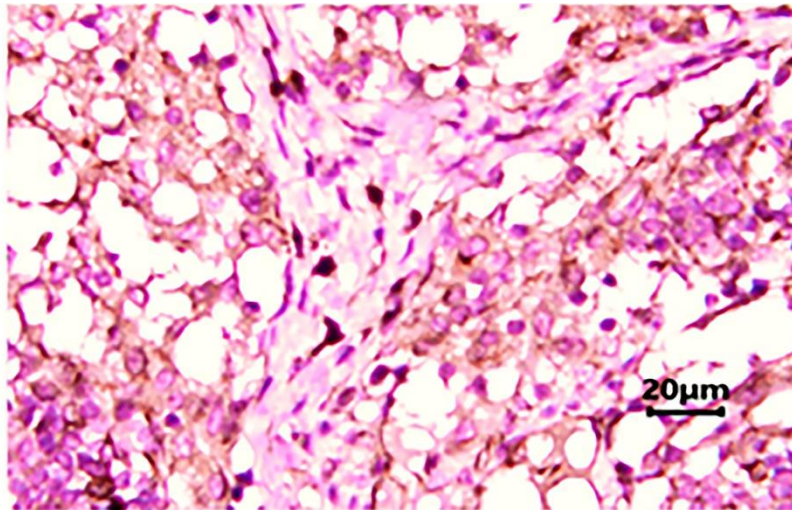


Figura 33. Micrografía de inmunohistoquímica del tumor HCT116 *ex vivo* que demuestra la expresión de FAP (color marrón).

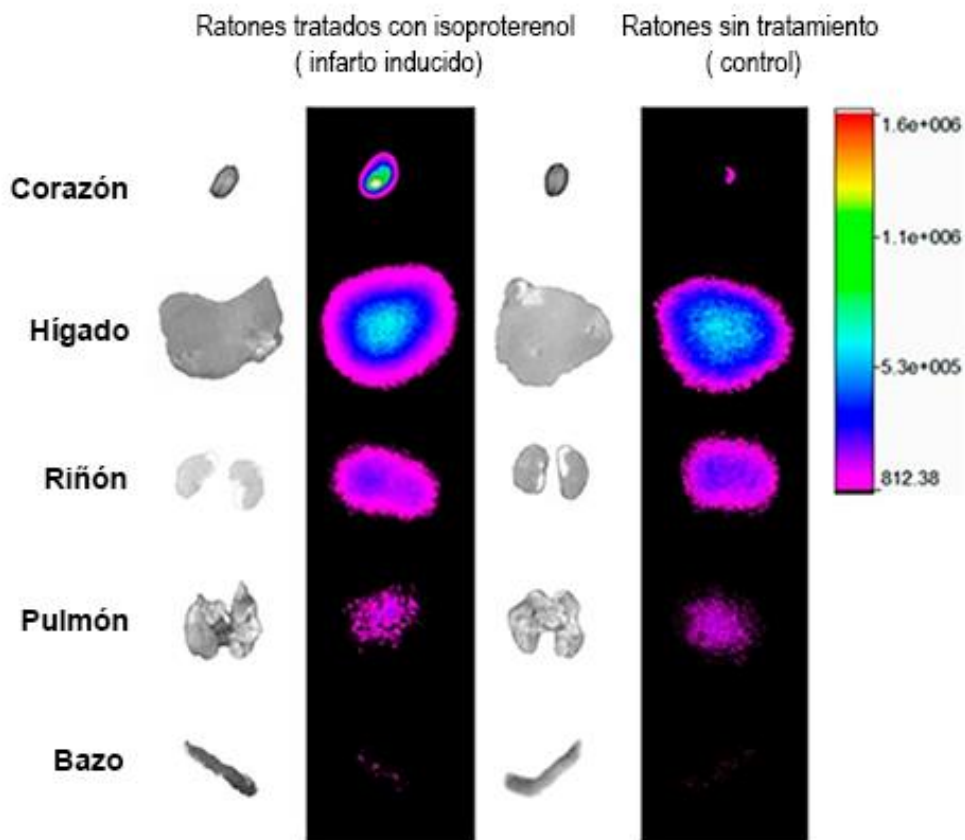


Figura 34. Imágenes de rayos X/radioisotópicas/*ex vivo* de la captación de ^{68}Ga -iFAP en un modelo de ratón infartado (tratado con isoproterenol) (izquierda) y en un ratón no tratado (derecha) 0.5 h después de la administración del radiotrazador.

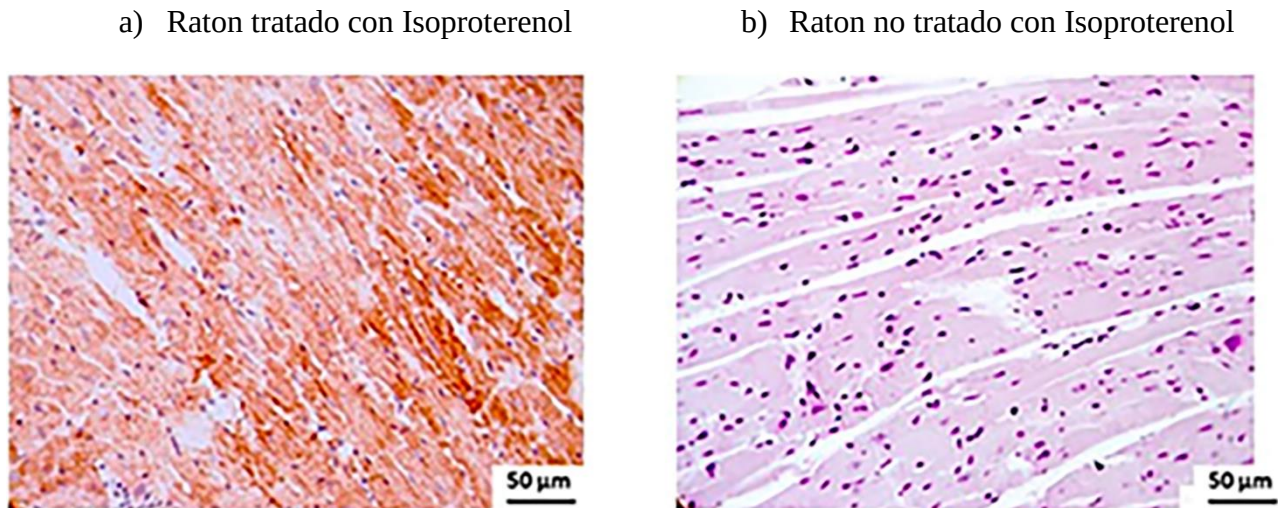


Figura 35. a) un ratón tratado con isoproterenol con un alto nivel de expresión de FAP (color marrón) y b) un ratón no tratado (sin sobreexpresión de FAP).

6.10 Evaluación clínica del sistema ^{68}Ga -iFAP.

6.10.1 Imagen clínica

No se observaron eventos adversos en pacientes, ni en voluntarios relacionados con el uso diagnóstico de ^{68}Ga -DOTA-iFAP. La biodistribución fisiológica del radioligando en la exploración corporal de voluntarios sanos 30 minutos después de la administración del radiotrazador se observó en el corazón (pool), el riñón y, en menor medida, el hígado. Se observó eliminación biliar y renal (figura 36). Después de 1 h, el ^{68}Ga -DOTA-iFAP se eliminó del torrente sanguíneo y permaneció solo en los órganos metabólicos, principalmente en el riñón (figura 36). La rápida eliminación de ^{68}Ga -DOTA-iFAP se correlacionó con la informada para otros radiotrazadores FAPI/PET [95], [96], [97].

Las imágenes del paciente diagnosticado con infarto agudo de miocardio mostraron una alta captación de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en la región anteroseptal correspondiente al área de infarto transmural de la lesión culpable (figura 37a). Las imágenes de SPECT con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi, utilizando un protocolo de reposo-estrés, mostraron un infarto transmural en el ápice y la región anteroseptal. La resonancia magnética cardíaca (RMC) multiparamétrica visualizó el realce tardío de gadolinio (LGE) en la región anteroseptal, demostrando también un infarto transmural (figura 37a). También hubo obstrucción microvascular en estos sitios. Recientemente Diekmann et al. presentaron 35 pacientes a los que se les realizó imágenes cardíacas multimodales, incluida PET con ^{68}Ga -DOTA-FAPI-46, dentro de los 11 días posteriores a la terapia de reperfusión para el infarto agudo de miocardio. Confirmaron que la regulación positiva regional de FAP por parte de fibroblastos activados mostró un contraste muy alto entre la región lesionada del infarto y el peri infarto. Además, la regulación positiva de la FAP excedió la región del infarto, lo que podría explicarse posiblemente por una fibrosis reactiva que puede comprometer el miocardio no infartado [98].

Se observó una captación significativa de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en tumores primarios confirmados histológicamente de glioblastoma de alto grado (figura 37b), cáncer de mama triple negativo (figura 37c) y cáncer de próstata (figura 37d).

FAP está muy involucrada en la remodelación de tejidos y promueve la tumorigénesis a través de múltiples mecanismos, incluida la angiogénesis con promoción de la invasión del tejido circundante, la supresión inmune, la transición epitelial-mesenquimatoso, la resistencia a los medicamentos y la promoción de células madre [99]. También se ha demostrado que la sobreexpresión de FAP está asociada con respuestas inmunes dependientes de linfocitos. Por lo tanto, la evaluación de la sobreexpresión de FAP mediante ^{68}Ga -DOTA-iFAP/PET o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP/SPECT en tumores primarios

o metastásicos permitirá determinar si el paciente se beneficiará de terapias con inhibidores de puntos de control inmunológico (ICI), tratamiento con radioterapia dirigida basada en FAP como los sistemas coloidales de doble objetivo basados en ^{177}Lu -FAP [100] o ^{177}Lu -iFAP/ ^{177}Lu -iPSMA [101]o, como opción óptima, la combinación de inmunoterapia y radioterapia dirigida, así como futuras terapias basadas en inhibidores de FAP para el tratamiento de cánceres agresivos.

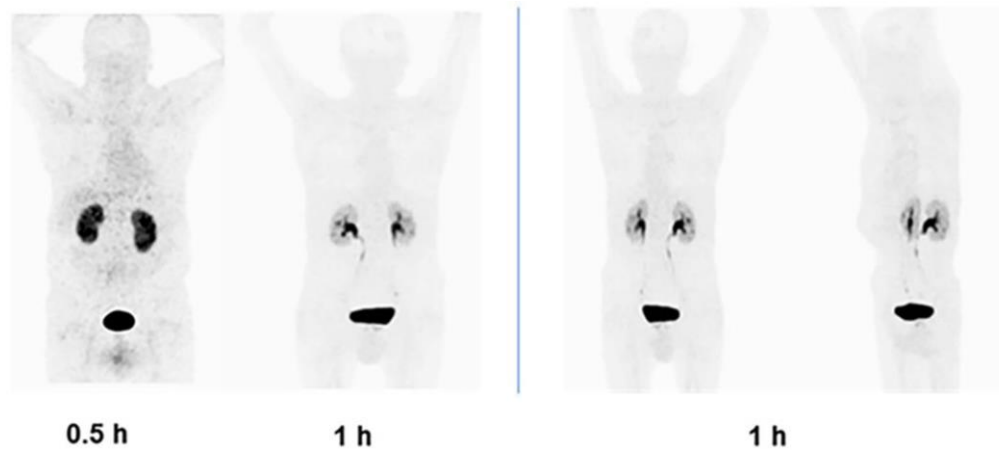


Figura 36. ^{68}Ga -iFAP/PET (anterior y lateral) de sujetos sanos a las 0,5 h y 1 h después de la administración intravenosa del radiotrazador (185 MBq).

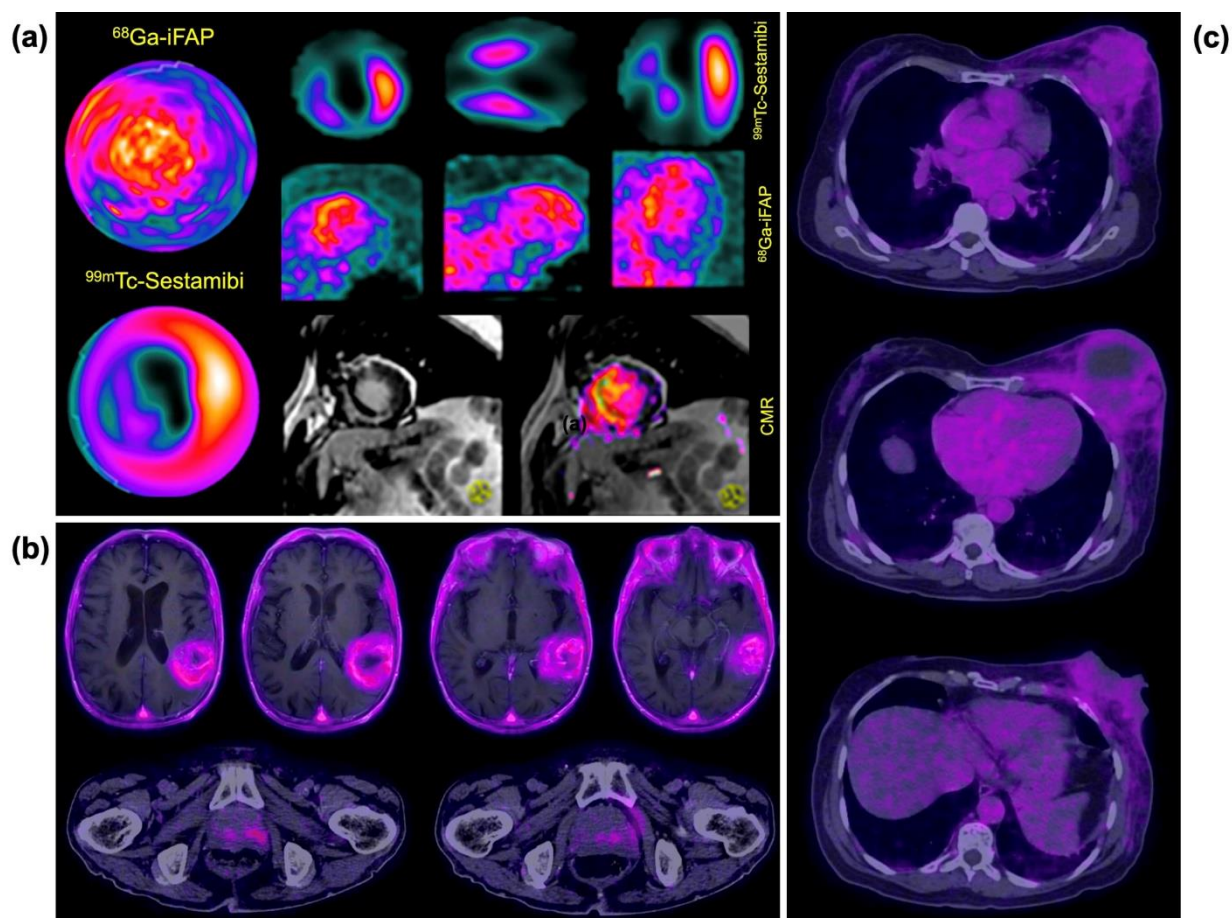


Figura 37. (a) ^{68}Ga -iFAP/PET, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi/SPECT y resonancia magnética cardíaca (RMC) en un paciente con infarto agudo de miocardio. Obsérvese la alta captación de ^{68}Ga -iFAP en la región anterosseptal correspondiente al área de infarto transmural de la lesión culpable. Captación de ^{68}Ga -DOTA-iFAP en tumores primarios histológicamente confirmados de (b) glioblastoma de alto grado en la región temporoparietal izquierda (arriba) que coexiste con cáncer de próstata (abajo) y (c) cáncer de mama izquierdo triple negativo con un gran componente necrótico central.

7 CONCLUSIONES

El ^{99m}Tc -iFAP, diseñado y sintetizado para esta investigación, muestra propiedades adecuadas como un nuevo radioligando inhibidor de FAP basado en la estructura ^{99m}Tc -HYNIC-D-alanina-boroPro para imágenes del microambiente tumoral SPECT. Los hallazgos de los análisis indican un reconocimiento específico de FAP, alta captación tumoral ($7,05 \pm 1,13$ % ID/g a los 30 min) y rápida eliminación renal. Los resultados encontrados en este estudio justifican estudios dosimétricos y clínicos adicionales para establecer la sensibilidad y especificidad de ^{99m}Tc -iFAP.

El radiotrazador ^{68}Ga -DOTA-D-Alanine-BoroPro (^{68}Ga -DOTA-iFAP) muestra propiedades adecuadas como un nuevo radiotrazador para imágenes PET/FAP en tejidos malignos y no malignos. Los resultados del análisis indican una alta estabilidad del radiotrazador en suero humano, especificidad *in vitro* e *in vivo* para FAP y una rápida eliminación renal en humanos. Los hallazgos de esta investigación justifican más ensayos clínicos y de dosimetría para establecer la especificidad y sensibilidad de la PET con ^{68}Ga -iFAP para la obtención de imágenes de expresión de FAP.

Los resultados preliminares de la evaluación clínica de la interacción de iFAP con pacientes de cáncer y de IAM muestran resultados satisfactorios de interacción específica, sugiriendo una respuesta favorable bajo las condiciones del estudio presentado en esta tesis. Sin embargo, es necesario ampliar el tamaño de la muestra para garantizar la representatividad y robustez de los resultados. Además, se deben considerar ajustes en el diseño del estudio para incluir todas las variables relevantes y asegurar que los hallazgos sean estadísticamente significativos y clínicamente relevantes. Solo así será posible obtener una evidencia sólida y confiable que permita validar la eficacia y seguridad del radiofármaco en una población más amplia.

8 ANEXOS

Se presentan como anexo I y II la primera página de los artículos generados a partir de esta investigación

8.1 ANEXO 1



Article

Design, Synthesis and Preclinical Assessment of ^{99m}Tc -iFAP for In Vivo Fibroblast Activation Protein (FAP) Imaging

Diana Trujillo-Benitez ^{1,2}, Myrna Luna-Gutiérrez ^{1,*}, Guillermina Ferro-Flores ^{1,*}, Blanca Ocampo-García ¹, Clara Santos-Cuevas ¹, Gerardo Bravo-Villegas ², Enrique Morales-Ávila ², Pedro Cruz-Nova ¹, Lorenza Díaz-Nieto ³, Janice García-Quiroz ³, Erika Azorín-Vega ¹, Antonio Rosato ^{4,5} and Laura Meléndez-Alafort ⁵

- ¹ Department of Radioactive Materials, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico; sarahitrujillo097@hotmail.com (D.T.-B.); blanca.ocampo@inin.gob.mx (B.O.-G.); clara.cuevas@inin.gob.mx (C.S.-C.); pedro.cruz.comecyt@inin.gob.mx (P.C.-N.); erica.azorin@inin.gob.mx (E.A.-V.)
 - ² Faculty of Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico; gevillegas@live.com.mx (G.B.-V.); emoralesav@uaemex.mx (E.M.-Á.)
 - ³ Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, Mexico; lorenzadiaz@gmail.com (L.D.-N.); janice.garcia@incmnsz.mx (J.G.-Q.)
 - ⁴ Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology, University of Padua, Via Gattamelata 64, 35138 Padua, Italy; antonio.rosato@unipd.it
 - ⁵ Department of Immunology and Molecular Oncology Diagnostics, Veneto Institute of Oncology IOV-IRCCS, Via Gattamelata 64, 35138 Padua, Italy; laura.melendez.alafort@iov.veneto.it
- * Correspondence: myrna.luna@inin.gob.mx (M.L.-G.); guillermina.ferro@inin.gob.mx (G.F.-F.)



Citation: Trujillo-Benitez, D.; Luna-Gutiérrez, M.; Ferro-Flores, G.; Ocampo-García, B.; Santos-Cuevas, C.; Bravo-Villegas, G.; Morales-Ávila, E.; Cruz-Nova, P.; Díaz-Nieto, L.; García-Quiroz, J.; et al. Design, Synthesis and Preclinical Assessment of ^{99m}Tc -iFAP for In Vivo Fibroblast Activation Protein (FAP) Imaging. *Molecules* **2022**, *27*, 264. <https://doi.org/10.3390/molecules27010264>

Academic Editor: Alessandra Boschi

Received: 14 December 2021

Accepted: 30 December 2021

Published: 1 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Fibroblast activation protein (FAP) is expressed in the microenvironment of most human epithelial tumors. ^{68}Ga -labeled FAP inhibitors based on the cyanopyrrolidine structure (FAPi) are currently used for the detection of the tumor microenvironment by PET imaging. This research aimed to design, synthesize and preclinically evaluate a new FAP inhibitor radiopharmaceutical based on the ^{99m}Tc -((R)-1-((6-hydrazinylnicotinoyl)-D-alanyl) pyrrolidin-2-yl) boronic acid (^{99m}Tc -iFAP) structure for SPECT imaging. Molecular docking for affinity calculations was performed using the AutoDock software. The chemical synthesis was based on a series of coupling reactions of 6-hydrazinylnicotinic acid (HYNIC) and D-alanine to a boronic acid derivative. The iFAP was prepared as a lyophilized formulation based on EDDA/ SnCl_2 for labeling with ^{99m}Tc . The radiochemical purity (R.P.) was verified via ITLC-SG and reversed-phase radio-HPLC. The stability in human serum was evaluated by size-exclusion HPLC. In vitro cell uptake was assessed using N30 stromal endometrial cells (FAP positive) and human fibroblasts (FAP negative). Biodistribution and tumor uptake were determined in Hep-G2 tumor-bearing nude mice, from which images were acquired using a micro-SPECT/CT. The iFAP ligand ($K_i = 0.536$ nM, AutoDock affinity), characterized by UV-Vis, FT-IR, ^1H -NMR and UPLC-mass spectroscopies, was synthesized with a chemical purity of 92%. The ^{99m}Tc -iFAP was obtained with a R.P. >98%. In vitro and in vivo studies indicated high radiotracer stability in human serum (>95% at 24 h), specific recognition for FAP, high tumor uptake ($7.05 \pm 1.13\%$ ID/g at 30 min) and fast kidney elimination. The results found in this research justify additional dosimetric and clinical studies to establish the sensitivity and specificity of the ^{99m}Tc -iFAP.

Keywords: fibroblast activation protein; FAP inhibitors; technetium-99m; HYNIC-iFAP

1. Introduction

Fibroblast activation protein (FAP) is a type II serine protease that cleaves peptides after proline residues with endopeptidase and dipeptidyl-peptidase activities. FAP is primarily expressed on activated stromal fibroblasts present in most human epithelial tumors but not in normal fibroblasts [1].

Article

⁶⁸Ga-DOTA-D-Alanine-BoroPro Radiotracer for Imaging of the Fibroblast Activation Protein in Malignant and Non-Malignant Diseases

Diana Trujillo-Benítez ^{1,2}, Myrna Luna-Gutiérrez ^{1,*}, José G. Aguirre-De Paz ^{1,2}, Pedro Cruz-Nova ¹, Gerardo Bravo-Villegas ², Joel E. Vargas-Ahumada ³, Paola Vallejo-Armenta ⁴, Enrique Morales-Avila ², Nallely Jiménez-Mancilla ⁵, Rigoberto Oros-Pantoja ⁵, Clara Santos-Cuevas ¹, Erika Azorín-Vega ¹, Blanca Ocampo-García ¹ and Guillermina Ferro-Flores ^{1,*}

- ¹ Department of Radioactive Materials, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico; sarahi.t.servicios@inin.gob.mx (D.T.-B.); clara.cuevas@inin.gob.mx (C.S.-C.)
- ² Faculty of Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico
- ³ Nuclear Medicine Department, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico City 14000, Mexico
- ⁴ Nuclear Medicine Department, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City 14000, Mexico
- ⁵ Cátedras, CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico; nallely.jimenez@inin.gob.mx
- ⁶ Faculty of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico
- * Correspondence: myrna.luna@inin.gob.mx (M.L.-G.); guillermina.ferro@inin.gob.mx (G.F.-F.)

Citation: Trujillo-Benítez, D.; Luna-Gutiérrez, M.; Aguirre-De Paz, J.G.; Cruz-Nova, P.; Bravo-Villegas, G.; Vargas-Ahumada, J.E.; Vallejo-Armenta, P.; Morales-Avila, E.; Jiménez-Mancilla, N.; Oros-Pantoja, R.; et al. ⁶⁸Ga-DOTA-D-Alanine-BoroPro Radiotracer for Imaging of the Fibroblast Activation Protein in Malignant and Non-Malignant Diseases. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 532. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16040532>

Academic Editor: Leonard I. Wiebe

Received: 9 January 2024

Revised: 22 January 2024

Accepted: 29 January 2024

Published: 12 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Recently, we reported a new fibroblast activation protein (FAP) inhibitor radiopharmaceutical based on the ^{99m}Tc-((R)-1-((6-hydrazinylpicolinoyl)-D-alanyl) pyrrolidin-2-yl) boronic acid (^{99m}Tc-HYNIC-D-Alanine-BoroPro) (^{99m}Tc-HYNIC-iFAP) structure for tumor microenvironment SPECT imaging. This research aimed to synthesize ⁶⁸Ga-[2,2',2'',2''']-(2-(4-(2-(5-(((S)-1-((S)-2-borono-pyrrolidin-1-yl)-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)hydrazine-1-carbothioamido)benzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid] (⁶⁸Ga-DOTA-D-Alanine-BoroPro) (⁶⁸Ga-iFAP) as a novel radiotracer for PET imaging and evaluate its usefulness for FAP expression in malignant and non-malignant tissues. The coupling of p-SCN-benzene DOTA with HYNIC-iFAP was used for the chemical synthesis and further labeling with ⁶⁸Ga. Radiochemical purity was verified by radio-HPLC. The specificity of ⁶⁸Ga-iFAP was evaluated in HCT116 cells, in which FAP expression was verified by immunofluorescence and Western blot. Biodistribution and biokinetic studies were performed in murine models. ⁶⁸Ga-iFAP uptake at the myocardial level was assessed in mice with induced infarction. First-in-human images of ⁶⁸Ga-iFAP in healthy subjects and patients with myocardial infarction, glioblastoma, prostate cancer, and breast cancer were also obtained. DOTA-D-Alanine BoroPro was prepared with a chemical purity of 98% and was characterized by UPLC mass spectroscopy, FT-IR, and UV-vis. The ⁶⁸Ga-iFAP was obtained with a radiochemical purity of >95%. In vitro and in vivo studies demonstrated ⁶⁸Ga-iFAP-specific recognition for FAP, rapid renal elimination, and adequate visualization of the glioblastoma, breast tumor, prostate cancer, and myocardial infarction sites. The results of this research justify further dosimetry and clinical trials to establish the specificity and sensitivity of ⁶⁸Ga-iFAP PET for FAP expression imaging.

Keywords: fibroblast activation protein; FAP inhibitor; FAP imaging; gallium-68

1. Introduction

The FAP protein, a serine protease, exhibits overexpression in reactive stromal fibroblasts in more than 90% of epithelial cancers, correlating with a dismal prognosis in colon, pancreatic, ovarian, and hepatocellular carcinomas [1]. In addition, it is present during wound healing and at sites of inflammation such as arthritis and atherosclerotic plaques.

8.3 ANEXO III

Aprobación del protocolo y Consentimiento informado para los estudios clínicos de la eficacia diagnóstica de $^{68}\text{Ga}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP en tumores sólidos y en el seguimiento de la remodelación cardíaca post-infarto.



Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Renacimiento de la excelencia

Carta de Aceptación

Ref: INCAR-DG-DI-ACEP-056-2021

No. de protocolo en el INCAR:	21-1258
Nombre del estudio:	Activación de fibroblastos en pacientes por SICA por IFAP marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SPECT Y ^{68}Ga -PET
Número del estudio:	-----
Patrocinador Externo (si aplica):	Instituto Nacional de Investigación Nucleares (ININ) Instituto Nacional de Cancerología (INCAN)
Sitio donde se realizará el estudio:	Departamento de Cardiología Nuclear del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Domicilio del sitio donde se realizará el estudio:	Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, C.P. 14080. Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México

Ciudad de México, a 7 de octubre de 2021.

Dr. Erick Alexanderson Rosas
Jefe del Departamento de Cardiología Nuclear
Investigador Responsable del Proyecto
Presente.

Dr. Alexanderson:

Me permito informar a usted, que su propuesta de proyecto de investigación ha sido aprobada por el Comité de Investigación en su Novena Sesión Ordinaria el 23 de septiembre de 2021 y por el Comité de Ética en Investigación en su Sesión Ordinaria del 30 de septiembre de 2021.

Al realizar este proyecto, adquiere el compromiso ineludible de informar a los Comités y a la Dirección de Investigación trimestralmente, los avances de su proyecto, publicaciones y las presentaciones en congresos que genere.

Le envío un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Gilberto Vargas Alarcón
Director de Investigación.

c.c.p. Subdirección de Investigación Clínica
Departamento de Trabajo Social
Expediente.

GVA'ehg

Juan Badiano, No. 1, Col. Sección XVI, CP. 14080, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México.
Tel: (55) 5670 9411 ext. 24201, 4303. www.incardiologia.org.mx

Graciela Villa Nueva Medina
Clave 9313
Cardiología Nuclear
Fecha: 13/09/21.





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Renacimiento de la excelencia

INCAR-DG-DI-CI-DICT-054-2021

Dictamen del Comité de Investigación

No. de protocolo en el INCAR:	21-1258
Nombre del estudio:	Activación de fibroblastos en pacientes por SICA por IFAP marcado con ^{99m}Tc -SPECT Y ^{68}Ga -PET
Número del estudio:	----
Tipo de Reunión:	Ordinaria
Asistentes:	Dr. Manlio Fabio Márquez Murillo, Dr. Gilberto Vargas Alarcón, Dra. Martha Franco Guevara, Dr. Julio Sandoval Zárate, Dr. Héctor González Pacheco, Dr. Mauricio López Meneses, Dr. Juan Francisco Fritche Salazar y Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal
Patrocinador Externo (si aplica):	Instituto Nacional de Investigación Nucleares (ININ) Instituto Nacional de Cancerología (INCAN)
Sitio donde se realizará el estudio:	Departamento de Cardiología Nuclear del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Domicilio del sitio donde se realizará el estudio:	Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, C.P. 14080. Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México

Ciudad de México, a 23 de septiembre de 2021.

Dr. Erick Alexanderson Rosas
Jefe del Departamento de Cardiología Nuclear
Investigador Responsable del Proyecto
Presente.

Dr. Alexanderson:

Le informamos que los documentos que se mencionan a continuación, han sido revisados y aprobados por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, hoy en su Novena Sesión Ordinaria.

1. Propuesta de proyecto de investigación, en español.
2. Carta de Consentimiento Informado para participar en protocolo de Investigación Clínica, en español.

Esta aprobación, tiene vigencia hasta el 23 de septiembre de 2022. En caso de requerir una ampliación, deberá enviar al Comité un reporte de progreso, al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia y así evitar la suspensión de su protocolo.

El Comité de Investigación no sella ningún documento, sólo emite dictamen.

Atentamente,

Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal
Presidenta del Comité de Investigación.

c.c.p. Expediente

ACZM'ehg

Juan Badiano, No. 1, Col. Sección XVI, C.P. 14080, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México.
Tel: (55) 5370 3911 ext. 2420, 2420x www.incardiologia.org.mx





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Renacimiento de la excelencia

Ciudad de México, 23 de septiembre de 2021.
REF. INCAR-DG-DI-CI-EVAL-104-2021.

Dr. Erick Alexanderson Rosas
Jefe del Departamento de Cardiología Nuclear
Investigador Responsable del Proyecto
Presente.

Dr. Alexanderson:

El Comité de Investigación en sesión reglamentaria revisó el protocolo: **Activación de fibroblastos en pacientes por SICA por IFAP marcado con ^{99m}Tc -SPECT Y ^{68}Ga -PET**, en el que usted funge como responsable y resolvió:

- ☒ Aprobarlo y turnarlo al Comité de Ética en Investigación
- ☐ Aprobarlo, no requiere sanción del Comité de Ética en Investigación ni del CICUAL
- ☐ Aprobarlo y turnarlo al Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL)
- ☐ Solicitar su revisión y nuevo envío
- ☐ Rechazarlo

COMENTARIOS:

La aceptación definitiva queda sujeta al dictamen aprobatorio del Comité de Ética en Investigación.

Atentamente,

Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal
Presidenta del Comité de Investigación.

c.c.p. Expediente.

ACZM'ehg

Juan Badiano, No. 1, Col. Sección XVI, C.P. 14000, Alameda Tlalpa, Ciudad de México.
Tel: (55) 5375 0411 Ext. 24200, 24205 www.incar.mx



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Lugar y Fecha _____

APROBADO
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

Activación de fibroblastos en pacientes post SICA por iFAP marcado con ^{99m}Tc -SPECT y ^{68}Ga -PET

Protocolo 21-1258
Aprobado ☐
Unanimidad ☐
Mayoría ☐
Fecha 30 sept 2021

Registrado ante el Comité Local de Investigación y de Ética con el número:

Los objetivos del estudio son: -Valorar el patrón de captación del iFAP como la presencia de activación de fibroblastos en pacientes post infarto agudo del miocardio. -Identificar aquellos pacientes post infarto en riesgo de generar una fibrosis excesiva y por ende, falla cardiaca, en un estadio en que los pacientes se podrían beneficiar de tratamientos oportunos. -Valorar comparativamente las 2 vías metabólicas de PET/CT con ^{68}Ga -iFAP y SPECT con ^{99m}Tc -iFAP, su marcaje, distribución, captación, lavado, actividad en tiempo, calidad de imagen y eliminación. - Investigar la correlación de la captación de iFAP con los hallazgos de: a. Perfusión miocárdica con ^{99m}Tc -MIBI SPECT. b. Resonancia magnética cardiaca. c. Ecocardiograma. d. Biomarcadores. Integrar resultados para dictar posibles vías fisiológicas de la activación patológica de fibrosis en la falla cardiaca. -Establecer nuevas líneas de investigación con posibilidades teragnosticas.

Los procedimientos a los que me someteré consisten en:

- 1) Estudio de medicina nuclear de gammagrafía con ^{68}Ga -iFAP o SPECT con ^{99m}Tc -iFAP: inyección intravenosa de un medicamento, con adquisición de imágenes a 10 minutos, 30 minutos y 1 hora de distribución.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: dolor en sitio de punción, sangrado leve, reacción alérgica, incomodidad durante el estudio.

Los investigadores responsables se han comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar

cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi patología.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, y si soy paciente institucional, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el INC Ignacio Chávez.

El Investigador responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente:

Nombre, firma y matrícula del investigador responsable.

Dr. Erick Alexanderson Rosas

Co-Investigadora Dra. Isabel Carvajal Juárez

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: 55732911 Ext: 21000 y 21001

Testigos

Nombre _____

Nombre _____

Dirección _____

Dirección: _____



APROBADO
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez
Protocolo 21-1238
Unanimidad ☐ Aprobado ☐
Mayoría ☐
Fecha 30 sept 2021

9 REFERENCIAS

- [1] F. Bray *et al.*, “Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 74, no. 3, pp. 229–263, May 2024, doi: 10.3322/caac.21834.
- [2] R. Lange, N. Schreuder, and H. Hendrikse, “Radiopharmaceuticals,” in *Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products*, P. Le Brun, S. Crauste-Manciet, I. Krämer, J. Smith, and H. Woerdenbag, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2023, pp. 531–550. doi: 10.1007/978-3-031-20298-8_23.
- [3] F. F. Alqahtani, “SPECT/CT and PET/CT, related radiopharmaceuticals, and areas of application and comparison,” Feb. 01, 2023, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jsps.2022.12.013.
- [4] M. Li, M. H. Younis, Y. Zhang, W. Cai, and X. Lan, “Clinical summary of fibroblast activation protein inhibitor-based radiopharmaceuticals: cancer and beyond,” *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 49, no. 8, pp. 2844–2868, Jul. 2022, doi: 10.1007/s00259-022-05706-y.
- [5] Y. Liu *et al.*, “Fibroblast activation protein targeted therapy using [177Lu]FAPi-46 compared with [225Ac]FAPi-46 in a pancreatic cancer model,” *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 49, no. 3, pp. 871–880, Feb. 2022, doi: 10.1007/s00259-021-05554-2.
- [6] D. Trujillo-Benítez *et al.*, “Design, Synthesis and Preclinical Assessment of 99m Tc-iFAP for In Vivo Fibroblast Activation Protein (FAP) Imaging,” *Molecules*, vol. 27, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/molecules27010264.
- [7] X. Luo *et al.*, “SPECT Imaging with Tc-99m-Labeled HYNIC-FAPi-04 to Extend the Differential Time Window in Evaluating Tumor Fibrosis,” *Pharmaceutics*, vol. 16, no. 3, Mar. 2023, doi: 10.3390/ph16030423.
- [8] Y. Mori, K. Dendl, J. Cardinale, C. Kratochwil, F. L. Giesel, and U. Haberkorn, “FAPi PET: Fibroblast Activation Protein Inhibitor Use in Oncologic and Nononcologic Disease,” Mar. 01, 2023, *Radiological Society of North America Inc.* doi: 10.1148/radiol.220749.
- [9] M. M. A. Sidrak *et al.*, “Fibroblast Activation Protein Inhibitor (FAPi)-Based Theranostics—Where We Are at and Where We Are Heading: A Systematic Review,” Feb. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms24043863.
- [10] J. Kupusovic *et al.*, “Visualization of fibroblast activation after myocardial infarction using 68Ga-FAPi-PET,” *Eur Heart J*, vol. 42, no. Supplement_1, Oct. 2021, doi: 10.1093/eurheartj/ehab724.0255.
- [11] S. H. Hassanpour and M. Dehghani, “Review of cancer from perspective of molecular,” *Journal of Cancer Research and Practice*, vol. 4, no. 4, pp. 127–129, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.jcrpr.2017.07.001.
- [12] Y. Chen, D. Gao, L. Huang, and C. Hill, “In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 81, pp. 128–141, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2014.05.009.

- [13] H. M. Jeong, M. J. Kwon, and Y. K. Shin, "Overexpression of Cancer-Associated Genes via Epigenetic Derepression Mechanisms in Gynecologic Cancer," *Front Oncol*, vol. 4, no. February, pp. 1–13, 2014, doi: 10.3389/fonc.2014.00012.
- [14] I. Kostić, N. Jain, D. Aran, A. J. Butte, and M. Sirota, "Cross-tissue Analysis of Gene and Protein Expression in Normal and Cancer Tissues," *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 24799, May 2016, doi: 10.1038/srep24799.
- [15] H. M. Jeong, M. J. Kwon, and Y. K. Shin, "Overexpression of Cancer-Associated Genes via Epigenetic Derepression Mechanisms in Gynecologic Cancer," *Front Oncol*, vol. 4, no. February, pp. 1–13, 2014, doi: 10.3389/fonc.2014.00012.
- [16] R. V. J. Chari, "Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs," *Acc Chem Res*, vol. 41, no. 1, pp. 98–107, Jan. 2008, doi: 10.1021/ar700108g.
- [17] X. Chen, L. Liu, and C. Jiang, "Charge-reversal nanoparticles: novel targeted drug delivery carriers," Jul. 01, 2016, *Chinese Academy of Medical Sciences*. doi: 10.1016/j.apsb.2016.05.011.
- [18] A. Abdelmoez *et al.*, "Screening and identification of molecular targets for cancer therapy," *Cancer Lett*, vol. 387, pp. 3–9, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.002.
- [19] K. O. Alfarouk *et al.*, "Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp," *Cancer Cell Int*, vol. 15, no. 1, p. 71, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12935-015-0221-1.
- [20] R. V. J. Chari, "Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs," *Acc Chem Res*, vol. 41, no. 1, pp. 98–107, Jan. 2008, doi: 10.1021/ar700108g.
- [21] G. C. Kocal and Y. Baskin, "Polymorphisms in Pharmacogenetics of Personalized Cancer Therapy," in *Genetic Polymorphisms*, vol. i, no. tourism, InTech, 2017, p. 13. doi: 10.5772/intechopen.69207.
- [22] K. M. Tully, N. B. Sobol, P. M. R. Pereira, and J. S. Lewis, "Molecular Imaging Companion Diagnostics," in *Companion and Complementary Diagnostics*, Elsevier, 2019, pp. 201–228. doi: 10.1016/B978-0-12-813539-6.00010-9.
- [23] M. Patiño-Zarco, C. Enrique-Rojas Marin, C. Moctezuma-Velasco, E. Neyra-Ortiz, and E. A. Medina-Villaseñor, "Revisiones Casos y Revisiones de Salud 2018;1(0) Imagenología en cáncer. Diferentes técnicas diagnósticas de imagen para cáncer Imaging in cancer. Different diagnostic imaging techniques for cancer," 2018.
- [24] A. Zannetti, R. Fonti, and L. Pace, "Nuclear imaging in cancer theranostics," 2007. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/6401425>
- [25] A. Timmis *et al.*, "European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: Executive Summary," *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*, vol. 8, no. 4, pp. 377–382, Jul. 2022, doi: 10.1093/ehjqcco/qcac014.
- [26] M. A. Khan *et al.*, "Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study," *Cureus*, Jul. 2020, doi: 10.7759/cureus.9349.

- [27] A. Tymińska *et al.*, “Ischemic Cardiomyopathy versus Non-Ischemic Dilated Cardiomyopathy in Patients with Reduced Ejection Fraction— Clinical Characteristics and Prognosis Depending on Heart Failure Etiology (Data from European Society of Cardiology Heart Failure Registries),” *Biology (Basel)*, vol. 11, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/biology11020341.
- [28] P. Rajiah, Y. Desai, D. Kwon, and S. D. Flamm, “CARDIAC IMAGING MR Imaging of Myocardial Infarction 1,” *RadioGraphics*, p. 33, 2013, doi: 10.1148/rg.335125722/-/DC1.
- [29] M. Mujoomdar *et al.*, “Optimizing Health System Use of Medical Isotopes and Other Imaging Modalities,” 2012.
- [30] R. Taillefer and F. Harel, “Radiopharmaceuticals for cardiac imaging: Current status and future trends,” Aug. 01, 2018, *Springer New York LLC*. doi: 10.1007/s12350-018-1194-y.
- [31] G. S. Heo, D. Sultan, and Y. Liu, “Current and novel radiopharmaceuticals for imaging cardiovascular inflammation,” Mar. 01, 2020, *Edizioni Minerva Medica*. doi: 10.23736/S1824-4785.20.03230-6.
- [32] L. B. N. Langer *et al.*, “Molecular imaging of fibroblast activation protein after myocardial infarction using the novel radiotracer [68Ga]MHLL1,” *Theranostics*, vol. 11, no. 16, pp. 7755–7766, 2021, doi: 10.7150/THNO.51419.
- [33] J. Diekmann *et al.*, “Cardiac Fibroblast Activation in Patients Early After Acute Myocardial Infarction: Integration with MR Tissue Characterization and Subsequent Functional Outcome,” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 63, no. 9, pp. 1415–1423, Sep. 2022, doi: 10.2967/jnumed.121.263555.
- [34] S. J. H. Waaijer *et al.*, “Molecular imaging in cancer drug development,” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 59, no. 5, pp. 726–732, 2018, doi: 10.2967/jnumed.116.188045.
- [35] M. Saeed, Z. Xu, B. G. De Geest, H. Xu, and H. Yu, “Molecular Imaging for Cancer Immunotherapy: Seeing Is Believing,” *Bioconj Chem*, vol. 31, no. 2, pp. 404–415, 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00851.
- [36] M. Gauberti, A. P. Fournier, D. Vivien, and S. M. de Lizarrondo, “Molecular magnetic resonance imaging (mMRI),” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1718, pp. 315–327, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-7531-0_19.
- [37] W. Du, Y. Wang, Q. Luo, and B. F. Liu, “Optical molecular imaging for systems biology: From molecule to organism,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 386, no. 3, pp. 444–457, 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0541-z.
- [38] R. D. Leone and J. D. Powell, “Metabolism of immune cells in cancer,” *Nat Rev Cancer*, vol. 20, no. 9, pp. 516–531, 2020, doi: 10.1038/s41568-020-0273-y.
- [39] S. AMRANI, Y. HALIMI, and M. TAHIRI, “Composite Materials Using Expanded Perlite as a Charge and Plastic Wastes as Reinforcement, Elaboration and Properties,” *GSTF International Journal of Chemical Sciences*, vol. 1, no. 2, pp. 47–68, 2014, doi: 10.7603/s40.
- [40] V. Talwar, K. V. Pradeep Babu, and S. Raina, “An overall review of targeted therapy in solid cancers,” *Curr Med Res Pract*, vol. 7, no. 3, pp. 99–105, 2017, doi: 10.1016/j.cmrp.2017.04.002.

- [41] S. Carlson, "A Glance At The History Of Nuclear Medicine," *Acta Oncol (Madr)*, vol. 34, no. 8, pp. 1095–1102, Jan. 1995, doi: 10.3109/02841869509127236.
- [42] M. E. Crestoni, *Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy*. Elsevier Inc., 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14205-2.
- [43] D. Dance, S. Christofiedes, and A. D. A. Maidment, "HANDBOOK IAEA- Diagnostic Radiology Physics," *Diagnostic Radiology Physics A Handbook for Teachers and Students*, pp. 209–235, 2014.
- [44] B. Q. Lee, T. Kibédi, A. E. Stuchbery, and K. A. Robertson, "Atomic Radiations in the Decay of Medical Radioisotopes: A Physics Perspective," *Comput Math Methods Med*, vol. 2012, pp. 1–14, 2012, doi: 10.1155/2012/651475.
- [45] Y. Tanaka *et al.*, "Gateway Vectors for Plant Genetic Engineering: Overview of Plant Vectors, Application for Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) and Multigene Construction," in *Genetic Engineering - Basics, New Applications and Responsibilities*, vol. 2, InTech, 2012, ch. Radiolabel, pp. 137–164. doi: 10.5772/32009.
- [46] J. Magill, *Radioactivity Radionuclides Radiation*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. doi: 10.1007/b138236.
- [47] F. Buchegger, F. Perillo-Adamer, Y. M. Dupertuis, and A. Bischof Delaloye, "Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective," *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 33, no. 11, pp. 1352–1363, Oct. 2006, doi: 10.1007/s00259-006-0187-2.
- [48] S. Thorotrast, "Radiopharmaceuticals General adverse effects and adverse reactions," p. 2016, 2016, doi: 10.1016/B978-0-444-53717-1.01387-1.
- [49] D. Sarko, M. Eisenhut, U. Haberkorn, and W. Mier, "Bifunctional Chelators in the Design and Application of Radiopharmaceuticals for Oncological Diseases," *Curr Med Chem*, vol. 19, no. 17, pp. 2667–2688, 2012, doi: 10.2174/092986712800609751.
- [50] J. Nairne, P. B. Iveson, and A. Meijer, "Imaging in Drug Development," in *Progress in Medicinal Chemistry*, 1st ed., vol. 54, Elsevier B.V., 2015, pp. 231–280. doi: 10.1016/bs.pmch.2014.10.002.
- [51] S. R. Banerjee and M. G. Pomper, "Clinical applications of Gallium-68," Jun. 2013. doi: 10.1016/j.apradiso.2013.01.039.
- [52] F. F. Alqahtani, "SPECT/CT and PET/CT, related radiopharmaceuticals, and areas of application and comparison," Feb. 01, 2023, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jsps.2022.12.013.
- [53] G. Ferro-Flores, C. Arteaga de Murphy, and L. Melendez-Alafort, "Third Generation Radiopharmaceuticals for Imaging and Targeted Therapy," *Curr Pharm Anal*, vol. 2, no. 4, pp. 339–352, 2006, doi: 10.2174/157341206778699555.
- [54] E. J. Hamson, F. M. Keane, S. Tholen, O. Schilling, and M. D. Gorrell, "Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy," *Proteomics Clin Appl*, vol. 8, no. 5–6, pp. 454–463, 2014, doi: 10.1002/prca.201300095.

- [55] M. S. Lawrence *et al.*, "Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types," *Nature*, vol. 505, no. 7484, pp. 495–501, 2014, doi: 10.1038/nature12912.
- [56] E. Puré and R. Blomberg, "Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics," *OncogenePro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics*, vol. 37, no. 32, pp. 4343–4357, 2018, doi: 10.1038/s41388-018-0275-3.
- [57] P. Busek, R. Mateu, M. Zubal, L. Kotackova, and A. Sedo, "Targeting Fibroblast activation protein in cancer - Prospects and caveats," *Frontiers in Bioscience - Landmark*, vol. 23, no. 10, pp. 1933–1968, 2018, doi: 10.2741/4682.
- [58] A. Šimková, P. Bušek, A. Šedo, and J. Konvalinka, "Molecular recognition of fibroblast activation protein for diagnostic and therapeutic applications," *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, vol. 1868, no. 7, p. 140409, 2020, doi: 10.1016/j.bbapap.2020.140409.
- [59] K. Jansen *et al.*, "Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a xanthine scaffold," *Medchemcomm*, vol. 5, no. 11, pp. 1700–1707, 2014, doi: 10.1039/c4md00167b.
- [60] S. A. Meadows *et al.*, "Ala657 and conserved active site residues promote fibroblast activation protein endopeptidase activity via distinct mechanisms of transition state stabilization," *Biochemistry*, vol. 46, no. 15, pp. 4598–4605, 2007, doi: 10.1021/bi062227y.
- [61] A. A. Fitzgerald and L. M. Weiner, "The role of fibroblast activation protein in health and malignancy," Sep. 01, 2020, *Springer*. doi: 10.1007/s10555-020-09909-3.
- [62] M. Syed *et al.*, "Fibroblast activation protein inhibitor (FAPi) PET for diagnostics and advanced targeted radiotherapy in head and neck cancers," *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 47, no. 12, pp. 2836–2845, Nov. 2020, doi: 10.1007/s00259-020-04859-y.
- [63] R. Baghban *et al.*, "Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance," *Cell Communication and Signaling*, vol. 18, no. 1, pp. 1–19, 2020, doi: 10.1186/s12964-020-0530-4.
- [64] M. Tripathi, S. Billet, and N. A. Bhowmick, "Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression," *Cell Adh Migr*, vol. 6, no. 3, pp. 231–235, 2012, doi: 10.4161/cam.20419.
- [65] T. Lindner *et al.*, "Development of quinoline-based theranostic ligands for the targeting of fibroblast activation protein," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 59, no. 9, pp. 1415–1422, 2018, doi: 10.2967/jnumed.118.210443.
- [66] G. Ferro-Flores *et al.*, "Radiolabeled protein-inhibitor peptides with rapid clinical translation towards imaging and therapy," *Curr Med Chem*, vol. 27, pp. 1–15, 2019, doi: 10.2174/0929867327666191223121211.
- [67] M. A. Sánchez-Garrido *et al.*, "Fibroblast activation protein (FAP) as a novel metabolic target," *Mol Metab*, vol. 5, no. 10, pp. 1015–1024, 2016, doi: 10.1016/j.molmet.2016.07.003.
- [68] L. B. N. Langer *et al.*, "Molecular imaging of fibroblast activation protein after myocardial infarction using the novel radiotracer [68Ga]MHLL1," *Theranostics*, vol. 11, no. 16, pp. 7755–7766, 2021, doi: 10.7150/THNO.51419.

- [69] M. F. Mayola and J. T. Thackeray, "The Potential of Fibroblast Activation Protein-Targeted Imaging as a Biomarker of Cardiac Remodeling and Injury," Jun. 01, 2023, *Springer*. doi: 10.1007/s11886-023-01869-8.
- [70] C. F. Deacon, "Physiology and Pharmacology of DPP-4 in Glucose Homeostasis and the Treatment of Type 2 Diabetes," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 10, no. February, Feb. 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00080.
- [71] S. E. Poplawski *et al.*, "Identification of selective and potent inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase," *J Med Chem*, vol. 56, no. 9, pp. 3467–3477, 2013, doi: 10.1021/jm400351a.
- [72] K. Jansen *et al.*, "Extended structure-activity relationship and pharmacokinetic investigation of (4-quinolinoyl)glycyl-2-cyanopyrrolidine inhibitors of fibroblast activation protein (FAP)," *J Med Chem*, vol. 57, no. 7, pp. 3053–3074, 2014, doi: 10.1021/jm500031w.
- [73] T. Lindner *et al.*, "Development of quinoline-based theranostic ligands for the targeting of fibroblast activation protein," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 59, no. 9, pp. 1415–1422, Sep. 2018, doi: 10.2967/jnumed.118.210443.
- [74] "Standards and Operational Guidance for Ethics Review of Health-Related Research with Human Participants."
- [75] "DECLARACIÓN DE HELSINKI Antecedentes y posición de la Comisión Nacional de Bioética."
- [76] C. L. D. Ortiz, G. C. Completo, R. C. Nacario, and R. B. Nellas, "Potential Inhibitors of Galactofuranosyltransferase 2 (GlfT2): Molecular Docking, 3D-QSAR, and In Silico ADMETox Studies," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-52764-8.
- [77] M. Luna-Gutiérrez *et al.*, "Targeted Endoradiotherapy with Lu2O3-iPSMA/-iFAP Nanoparticles Activated by Neutron Irradiation: Preclinical Evaluation and First Patient Image," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 4, p. 720, Mar. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14040720.
- [78] S. A. Meadows *et al.*, "Ala657 and conserved active site residues promote fibroblast activation protein endopeptidase activity via distinct mechanisms of transition state stabilization," *Biochemistry*, vol. 46, no. 15, pp. 4598–4605, 2007, doi: 10.1021/bi062227y.
- [79] M. Karabacak, L. Sinha, O. Prasad, A. M. Asiri, and M. Cinar, "An experimental and theoretical investigation of Acenaphthene-5-boronic acid: Conformational study, NBO and NLO analysis, molecular structure and FT-IR, FT-Raman, NMR and UV spectra," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 115, pp. 753–766, 2013, doi: 10.1016/j.saa.2013.06.092.
- [80] S. N. Kane, A. Mishra, and A. K. Dutta, "International Conference on Recent Trends in Physics 2016 (ICRTP2016)," *J Phys Conf Ser*, vol. 755, no. 1, p. 011001, Oct. 2016, doi: 10.1088/1742-6596/755/1/011001.
- [81] J. Coates, "Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006, pp. 1–23. doi: 10.1002/9780470027318.a5606.
- [82] D. G. Hall, "Boronic acid catalysis," Jul. 07, 2019, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c9cs00191c.

- [83] P. J. Pandiyan, R. Appadurai, and S. Ramesh, "A high throughput analysis of boronic acids using ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry," *Analytical Methods*, vol. 5, no. 13, pp. 3386–3394, Jul. 2013, doi: 10.1039/c3ay40542g.
- [84] S. Y. Park, H. M. Kim, and J. S. Koo, "Differential expression of cancer-associated fibroblast-related proteins according to molecular subtype and stromal histology in breast cancer," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 149, no. 3, pp. 727–741, Feb. 2015, doi: 10.1007/s10549-015-3291-9.
- [85] T. Lindner *et al.*, "Development of quinoline-based theranostic ligands for the targeting of fibroblast activation protein," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 59, no. 9, pp. 1415–1422, Sep. 2018, doi: 10.2967/jnumed.118.210443.
- [86] T. Lindner, A. Loktev, F. Giesel, C. Kratochwil, A. Altmann, and U. Haberkorn, "Targeting of activated fibroblasts for imaging and therapy," Dec. 01, 2019, *SpringerOpen*. doi: 10.1186/s41181-019-0069-0.
- [87] D. Trujillo-Benítez *et al.*, "Design, Synthesis and Preclinical Assessment of ^{99m}Tc-iFAP for In Vivo Fibroblast Activation Protein (FAP) Imaging," *Molecules*, vol. 27, no. 1, p. 264, Jan. 2022, doi: 10.3390/molecules27010264.
- [88] H. Chen *et al.*, "Comparison of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-FAPI-04 and [¹⁸F] FDG PET/CT for the diagnosis of primary and metastatic lesions in patients with various types of cancer," *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 47, no. 8, pp. 1820–1832, Jul. 2020, doi: 10.1007/s00259-020-04769-z.
- [89] B. Xie *et al.*, "Fibroblast activation protein imaging in reperfused ST-elevation myocardial infarction: comparison with cardiac magnetic resonance imaging," *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 49, no. 8, pp. 2786–2797, 2022, doi: 10.1007/s00259-021-05674-9.
- [90] J. Tillmanns *et al.*, "Fibroblast activation protein alpha expression identifies activated fibroblasts after myocardial infarction," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 87, pp. 194–203, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.08.016.
- [91] Y. Ma, R. P. Iyer, M. Jung, M. P. Czubryt, and M. L. Lindsey, "Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps," May 01, 2017, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.tips.2017.03.001.
- [92] Z. Varasteh *et al.*, "Molecular imaging of fibroblast activity after myocardial infarction using a ⁶⁸Ga-labeled fibroblast activation protein inhibitor, FAPI-04," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 60, no. 12, pp. 1743–1749, 2019, doi: 10.2967/jnumed.119.226993.
- [93] S. Notohamiprodjo *et al.*, "Imaging of cardiac fibroblast activation in a patient after acute myocardial infarction using ⁶⁸Ga-FAPI-04," *Journal of Nuclear Cardiology*, vol. 29, no. 5, pp. 2254–2261, Oct. 2022, doi: 10.1007/s12350-021-02603-z.
- [94] S. Notohamiprodjo *et al.*, "Imaging of cardiac fibroblast activation in a patient after acute myocardial infarction using ⁶⁸Ga-FAPI-04," *Journal of Nuclear Cardiology*, vol. 29, no. 5, pp. 2254–2261, Oct. 2022, doi: 10.1007/s12350-021-02603-z.

- [95] Y. Dong *et al.*, “The Superiority of Fibroblast Activation Protein Inhibitor (FAPI) PET/CT Versus FDG PET/CT in the Diagnosis of Various Malignancies,” Feb. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/cancers15041193.
- [96] A. Loktev *et al.*, “retention,” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 60, no. 10, pp. 1421–1429, 2019, doi: 10.2967/jnumed.118.224469.
- [97] M. Zhang *et al.*, “[68Ga]Ga-DOTA-FAPI-04 PET/MR in patients with acute myocardial infarction: potential role of predicting left ventricular remodeling,” *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 50, no. 3, pp. 839–848, Feb. 2023, doi: 10.1007/s00259-022-06015-0.
- [98] J. Diekmann *et al.*, “Cardiac Fibroblast Activation in Patients Early After Acute Myocardial Infarction: Integration with MR Tissue Characterization and Subsequent Functional Outcome,” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 63, no. 9, pp. 1415–1423, Sep. 2022, doi: 10.2967/jnumed.121.263555.
- [99] Z. Kalaei *et al.*, “The Prognostic and therapeutic value and clinical implications of fibroblast activation protein- α as a novel biomarker in colorectal cancer,” Dec. 01, 2023, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s12964-023-01151-y.
- [100] R. P. Baum *et al.*, “Feasibility, Biodistribution, and Preliminary Dosimetry in Peptide-Targeted Radionuclide Therapy of Diverse Adenocarcinomas Using ^{177}Lu -FAP-2286: First-in-Humans Results,” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 63, no. 3, pp. 415–423, Mar. 2022, doi: 10.2967/jnumed.120.259192.
- [101] M. Luna-Gutiérrez *et al.*, “Targeted Endoradiotherapy with Lu^{203} -iPSMA/-iFAP Nanoparticles Activated by Neutron Irradiation: Preclinical Evaluation and First Patient Image,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14040720.