



Revista de
**Medicina e
Investigación**

www.elsevier.es



ARTÍCULO ORIGINAL

Cinética de internalización del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57) Lys}^3\text{-BN}$ en linfocitos humanos empleando el ensayo cometa

M. A. Luna-Gutiérrez^{a,b}, J. Castillo-Cadena^{a,*} y G. Ferro-Flores^b

^aLaboratorio de Genética, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Méx., México

^bLaboratorio de Investigación de Materiales Radioactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Toluca, Méx., México

PALABRAS CLAVE

Daño al DNA;
Linfocitos;
Radiofármaco; TAT-
BN; Cáncer de mama;
México.

Resumen

Introducción: Los receptores del péptido liberador de la gastrina (GRP-r) se sobreexpresan en cáncer de mama y próstata. La bombesina (BN) se une específica y fuertemente a GRP-r, esto es el fundamento para marcar la BN con radiación gamma. El TAT (49-57) es un péptido que penetra fácilmente la membrana celular por lo que, conjugado a diferentes proteínas, actúa como un “caballo de Troya” al aumentar la internalización de fármacos a la célula. El radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57)-Lys}^3\text{-BN}$ fue sintetizado con la finalidad de utilizarse en una etapa temprana de la carcinogénesis, para el diagnóstico y terapia del cáncer de mama.

Objetivo: Determinar la internalización mediante el ensayo cometa del radiofármaco con y sin TAT, induciendo daño al DNA.

Materiales y métodos: Se emplearon linfocitos humanos, con los siguientes protocolos: a) TAT-BN, b) $^{99m}\text{Tc-Lys}^3\text{-BN}$; c) $^{99m}\text{Tc-TAT (49-57)-Lys}^3\text{-BN}$ y d) grupo control. Se realizó el ensayo cometa y se evaluó la cinética de internalización a 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos en 3 repeticiones con cada uno, con actividades de 2.9, 6.6, 9.01 y 14.8 MBq. Se leyeron 100 células por tiempo y tratamiento, se determinó el *Tail* momento (TM). Se aplicó Kruskal-Wallis con $p \leq 0.05$ para la comparación entre los tratamientos.

Resultados: El daño causado por el $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ es mayor y diferente significativamente a los 30 minutos, respecto al control, mientras que $^{99m}\text{Tc-BN}$ y TAT-BN no los son.

Conclusiones: Esto demuestra que el TAT-BN favorece la internalización del radiofármaco.

KEYWORDS

DNA damage;
Lymphocytes;
Radiopharmaceutical;
TAT-BN; Breast
cancer; Mexico.

Internalization kinetics of the radiopharmaceutical $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57)Lys}^3\text{-BN}$ in human lymphocytes using the comet assay

Abstract

Introduction: Gastrin-releasing peptide receptors (GRP-r) are overexpressed in breast and prostate cancer cells. Bombesin (BN) binds specifically and strongly to GRP-r and this is the basis for BN labeling with gamma ray emitting radionuclides. TAT (49-57) is a peptide that readily penetrates the cell membrane so that, when it is conjugated to different proteins, it can act as a “Trojan

* Autor para correspondencia: Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan s/n, C.P. 50100, Toluca, Méx., México. Teléfono y Fax: (722) 217 5109. Correo electrónico: jcastillo_cadena@hotmail.com (J. Castillo-Cadena).

horse” facilitates drug internalization to the cell. The radiopharmaceutical $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57)-Lys}^3\text{-BN}$ was designed for diagnosis and therapy at early stage of breast cancer.

Objective: To determine the role of TAT in the kinetics of radiopharmaceutical internalization measured by DNA damage induction by means of comet assay.

Materials and methods: Human lymphocytes were treated with the following a) TAT-BN, b) $^{99m}\text{Tc-BN}$, or c) $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57)-Lys}^3\text{-BN}$, also an untreated group was conformed. The internalization was evaluated at 0, 5, 10, 15, 30 and 60 minutes after exposure with 3 repetitions each, and for radiopharmaceuticals with 2.9, 6.6, 9.0 and 14.8 MBq activities. DNA damage was scored in 100 cells per time and treatment, as tail moment (TM). A Kruskal-Wallis variance analysis with $p \leq 0.05$ was applied for comparison between treatments.

Results: The damage caused by $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57)-Lys}^3\text{-BN}$ is significantly higher than that caused by $^{99m}\text{Tc-BN}$ and TAT-BN.

Conclusion: This demonstrates that TAT favors the internalization of the radiopharmaceutical.

2214-2134 © 2014. Universidad Autónoma del Estado de México. Publicado por Elsevier México. Todos los derechos reservados.

Introducción

En México, el cáncer de mama representa la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 60 años¹, esto involucra un gran problema de salud pública. Por eso es importante contar con nuevas formas que nos permitan detectar el cáncer de mama en una etapa temprana. Una de las nuevas alternativas es por medio del uso de los radiofármacos de tercera generación, estos se emplean en medicina nuclear para obtener imágenes de blancos moleculares específicos y son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos, tales como receptores y enzimas².

El radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57) Lys}^3\text{-BN}$ podría permitir para el diagnóstico la proyección de imagen clínica específica de tumores de pecho y próstata, debido a los receptores y a los componentes que contiene². Los receptores del péptido liberador de la gastrina (GRP-r) se encuentran distribuidos en muchos órganos, pero se sobreexpresan en la membrana de las células malignas, especialmente en las de cáncer de mama y próstata³. Los GRP-r se unen específicamente a la bombesina (BN), este fuerte enlace es el fundamento para marcar la BN con radionúclidos emisores de radiación gamma para la obtención *in vivo* de imágenes de GRP-r por técnicas de medicina nuclear molecular⁴. Es importante señalar que después de la interacción receptor-ligando (GRP-r-BN) en la membrana celular, una parte del complejo es internalizado al citoplasma celular⁵⁻⁸. Por otro lado, se sabe que el dominio básico de la proteína TAT del HIV-1, es decir el TAT (49-57), es un péptido que penetra o atraviesa fácilmente la membrana celular por lo que, conjugado a diferentes fármacos, proteínas, péptidos y nanopartículas, actúa como un “caballo de Troya” al incrementar de forma significativa la internalización celular de los diferentes fármacos o biomoléculas⁹.

Por tanto, el [^{99m}Tc]N₂S₂-TAT(49-57)-Lys³-BN podría incrementar de manera significativa la internalización del radiofármaco y con ello, el contraste de las lesiones cancerosas en las imágenes, mejorando la sensibilidad y especificidad de los estudios diagnósticos. Considerando que la internalización se incrementará, las emisiones *auger* del ^{99m}Tc , podrían jugar un papel fundamental en la energía depositada dentro de la célula (dosis de radiación absorbida) con un posible efecto sinérgico en la terapia del cáncer¹⁰. El ensayo

cometa descrito por Singh et al., permite demostrar el daño al DNA de forma rápida y sin empleo de cultivos celulares. Consiste en células embebidas en un gel de agarosa grado electroforesis para brindarles soporte, posteriormente, se exponen a una corriente eléctrica que propicia la migración de los fragmentos del ADN dañado¹¹. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la internalización del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57) Lys}^3\text{-BN}$, empleando el ensayo cometa en linfocitos humanos.

Materiales y métodos

Agarosa de bajo punto de fusión (GIBCO BRL), agarosa de punto de fusión normal (GIBCO BRL), eluato de Na $^{99m}\text{TcO}_4$ obtenido de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ GETEC-ININ, Triton X-100 (Sigma), Trizma (Sigma), NaCl (Merck), KCl (Ferment), DMSO (Merk), HCl (Baker), EDTA (Sigma), TRIZMA (Sigma), KH₂PO₄ (J. T. Baker), NaH₂PO₄ (Sigma), NaOH (Merck), Et-Br (GIBCO-BRL), CH₃-OH (J. T. Baker), K₂CrO₄ (Reasol) CH₃-CH₂-OH (J. T. Baker), CH₃CN (Mallinckrodt), CH₃COONH₃ (J. T. Baker), TFA (Sigma), SnCl₂ (Sigma), MEC (J. T. Baker)

Obtención de la muestra

Se extrajeron de 2 a 3 mL de sangre periférica de 3 individuos clínicamente sanos, por punción venosa, en un tubo con 0.1 mL de heparina por cada mL de sangre.

Se realizaron 3 réplicas del ensayo cometa por actividad radiactiva. Se sometieron a los siguientes tratamientos: a) péptido TAT-BN; b) $^{99m}\text{Tc-BN}$; c) $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ y d) sin tratamiento, el cual fue tomado como grupo control.

Marcado de radiofármacos

Para el marcado de $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT(49-57)Lys}^3\text{-BN}$ o $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ en un vial, se colocó 1 mg de N₂S₂-TAT(49-57)-BN, este fue disuelto en 1 mL de solución salina. A 10 µL de esta solución se le adicionaron 4 µL de *buffer* de tartrato de sodio (50 mg/mL de tartrato de sodio en NH₄OH/NH₄CH₃COOH 0.1 M, pH 9.5), 4 µL de solución SnCl₂ (10 mg de SnCl₂ en 10 µL HCl concentrado diluido en 10 mL de agua inyectable) y 25 µL de pertecneiato de Sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$). Finalmente, se mezcló y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura

ambiente. Las actividades empleadas para el marcado son 2.9, 6.6, 9.01 y 14.8 MBq. La pureza radioquímica fue evaluada por HPLC fase reversa.

Por otro lado, el marcado del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Lys³-BN o ^{99m}Tc -BN, se realizó colocando 1 mg de HYNIC-BN en 200 μL de etanol al 10%, y 800 μL de agua inyectable previamente nitrogenada. A 20 μL de esta solución se le adicionaron 500 μL de EDDA/TRICINA, 500 μL de pertecneciato ($^{99m}\text{TcO}_4\text{:Na}$) y 20 μL de solución de SnCl_2 (10 mg de SnCl_2 en 10 μL HCl concentrado diluido en 10 mL de agua inyectable), y se colocó en baño seco a 90°C durante 15 minutos. Las actividades empleadas para el marcado son 2.9, 6.6, 9.01 y 14.8 MBq. La pureza radioquímica fue evaluada por HPLC fase reversa.

Ensayo cometa (Singh et al., 1988)

Preparación de laminillas: en un portaobjetos se colocaron 200 μL de agarosa de punto de fusión normal (APFN) al 0.75%, con ayuda de la punta de la micropipeta se extiende formando una capa homogénea, 15 μL de linfocitos (25,000 células) se añaden en un tubo de 1 mL con 100 μL de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al 0.75% disuelta en *buffer* de fosfatos. Se mezclan y se colocan en los portaobjetos embebidos previamente con el APFN. Se le coloca un cubreobjetos, se deja que solidifiquen a 4°C durante 5 minutos, se retira cuidadosamente el cubreobjetos por desplazamiento y se agregan 100 μL de ABPF y el cubreobjetos. Se deja solidificar a 4°C durante 4 a 5 min y se retira el cubreobjetos. Los geles se sumergen en solución de lisis recién preparada (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, NaOH 0.25 M, Tritón 1 %, DMSO 10 %, pH 10) durante 24 horas protegidas de la luz.

Corrimiento electroforético: las laminillas se sacan de la solución de lisis y se colocan en la cámara de electroforesis de manera horizontal, cubriéndolas con el amortiguador de electroforesis a 4°C (10 N de NaOH, 200 mM de EDTA, pH 13) durante 40 minutos. Posteriormente, se exponen a una corriente eléctrica de 25 V a 300 mA durante 40 minutos, usando una fuente de poder (Sigma Techware PS250-1). Una vez transcurrido el tiempo, las laminillas se enjuagan con solución de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.5) 3 veces por 3 minutos y se colocan en metanol 5 minutos. Todo el procedimiento se hace en condiciones de luz tenue para evitar el daño adicional al DNA.

Las laminillas se tiñen con bromuro de etidio (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y se examinan al microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-516 nm y un filtro barrera de 590 nm. El daño se evaluó analizando 100 células (n=3) por laminilla en cada tiempo, con el software Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments), y el daño se evaluó con el Tail Moment (TM).

Resultados

Marcado de radiofármacos

El análisis por HPLC fase reversa, mostró un tiempo de retención de 10.7 minutos, con una pureza radioquímica de 99.5% e impurezas en un tiempo de retención de 3.5 minutos de 0.5%. La determinación de la pureza radioquímica del marcado del péptido N₂S₂-TAT (49-57)-Lys³-BN fue similar a

lo reportado por Santos et al.¹¹, con una pureza radioquímica de 92%. Las actividades que se utilizaron para el radio-marcado fueron de 2.9 MBq, 6.6 MBq, 9.01 MBq y 14.8 MBq. Para el marcado EDDA/HYNIC-BN se realizó el protocolo reportado por Ferro et al.², con una pureza radioquímica mayor a 90% utilizando las mismas actividades.

Ensayo cometa

El efecto del daño al DNA por los diferentes tratamientos en los linfocitos con una actividad de radiación de 2.9 MBq se puede observar en la figura 1, en donde durante los primeros 15 minutos, el comportamiento de todos los tratamientos fue homogéneo, sin mostrar diferencia significativa entre los mismos, sin embargo es importante destacar el incremento de la respuesta por los 2 radiofármacos y el péptido a los 30 minutos. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para demostrar diferencia significativa entre los tratamientos con el control, se encontró significancia con $p \leq 0.05$ al minuto 30, pero cuando llegan al minuto 60, hay reparación del ADN (fig. 1).

Se pudo observar claramente que al emplearse una actividad de 6.6 MBq existió un aumento en el minuto 30 por parte del radiofármaco ^{99m}Tc -TAT-BN, debido a que existe una mayor internalización al núcleo celular y por la emisión de electrones *auger* de baja energía. Para comprobarlo, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con una $p \leq 0.05$, la cual mostró que durante los primeros 15 minutos no existió diferencia significativa respecto al control por parte de los tratamientos, en cambio al llegar al minuto 30 todos los tratamientos tiene diferencias con respecto al testigo, pero en mayor cantidad con el radiofármaco ^{99m}Tc -TAT-BN (fig. 2).

La cinética de daño al DNA con 9.01 MBq se representa en la figura 3, en donde existió efecto genotóxico por parte de los tratamientos a los que se expusieron, sin embargo, se puede apreciar que el radiofármaco complejo ^{99m}Tc -TAT-BN produjo mayor daño a los pocos minutos de exponer a los linfocitos, y que existe un incremento gradual hasta alcanzar el minuto 30, posteriormente hay un decremento

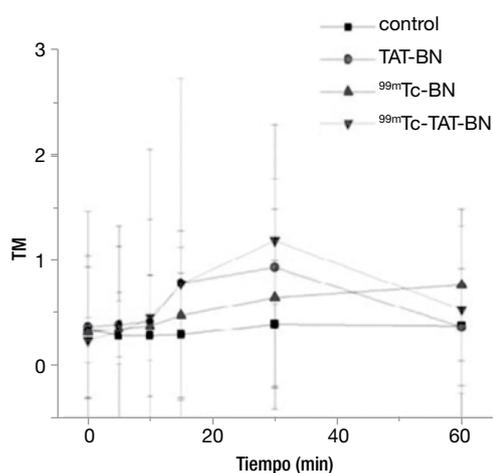


Figura 1 Cinética de daño al DNA por ensayo cometa a diferentes tiempos, con una actividad de 2.9 MBq evaluado por el Tail Moment.

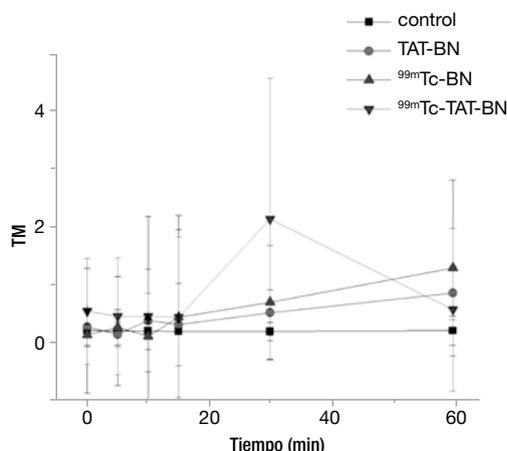


Figura 2 Cinética de internalización de inducción de daño al DNA por ensayo cometa, evaluado por *Tail Moment* con una actividad de 6.6 MBq.

cuando llega a los 60 y 90 minutos. En este experimento con una actividad 9.01 MBq se incrementó el tiempo hasta los 90 minutos, para determinar si se mantenía el daño o existía un proceso de reparación del mismo. Los tratamientos del péptido TAT-BN y $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ mostraron diferencia significativa con respecto al control desde el minuto 5 hasta alcanzar el valor máximo de daño al DNA con esta actividad al minuto 30, sin embargo al minuto 60 hay una disminución del efecto genotóxico pero continúa siendo significativo hasta llegar el minuto 90, donde ya no lo es. Cabe destacar que el radiofármaco $^{99m}\text{Tc-BN}$ durante los primeros 15 minutos produjo un daño no significativo con respecto al testigo, comenzó a incrementar su valor al minuto 30 y 60, donde alcanza su punto máximo y decae a los 90 minutos (fig. 3).

En la figura 4 podemos observar el comportamiento con una actividad de 14.8 MBq, el cual coincide con el descrito en la literatura con $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$, en donde existe un incremento en el daño por la internalización del TAT y por la emisión de los electrones *auger* por parte del ^{99m}Tc . La prueba de Kruscall-Wallis mostró que en todos los tratamientos existe diferencia significativa respecto al control $p \leq 0.05$.

Discusión

Existen diversas formas para la evaluación del daño al DNA, en esta investigación utilizamos el ensayo cometa que fue descrito por Singh et al.¹¹, por ser una técnica que permite detectar de manera fácil y rápida el daño que puede existir en el DNA, a nivel de células individuales, evaluado por el TM.

Se han realizado muchos trabajos empleando esta técnica, sin embargo, son pocos los que realizan en los radiofármacos. Pedraza et al. (2001) evaluó el efecto genotóxico inducido por la incorporación de los radiofármacos de ^{99m}Tc en la célula, determinado por esta técnica en linfocitos de ratón *in vitro* utilizando $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ y $^{99m}\text{Tc-gentisico}$ induciendo 98% y 94% de células con rompimiento de DNA nuclear, respectivamente, concluyeron que el daño fue producido por la acción de los electrones *auger* producto del decaimiento de ^{99m}Tc , depositando toda la energía en la

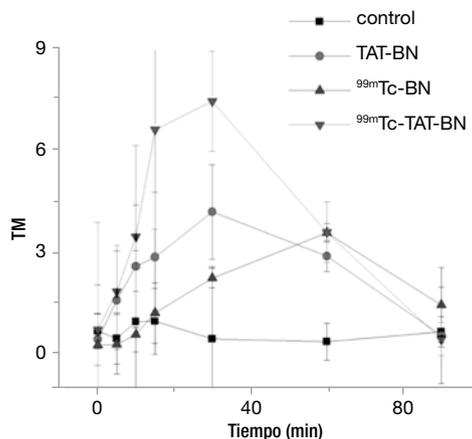


Figura 3 Cinética de daño al DNA por diferentes tratamientos evaluados por *Tail Moment*, con una actividad de 9.01 MBq.

célula, donde $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ se incorporó en el citoplasma, y $^{99m}\text{Tc-gentisico}$, se unió a la membrana celular, por lo tanto, los electrones *auger* pueden causar daño importante al DNA, cuando el radionúclido se incorpora en el radio de acción de algunos micrones del núcleo¹².

El efecto genotóxico producido por el péptido TAT-BN es por la habilidad que tiene la proteína TAT de penetrar al núcleo celular, esto ha sido reportado por Green¹³ y Frankel¹⁴, quienes observaron la habilidad de los 86 aminoácidos del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) llamado TAT que penetraba a las células y activaba la transcripción. Subsecuentemente, encontraron que una región básica de la proteína en los residuos 49-57 era responsable de esta habilidad de penetrar a las células. Por otro lado, Futaki en el 2005, realizó una revisión de cómo actúa el TAT en la internalización celular, concluyó que el segmento de la proteína TAT en los residuos de 48-60 contiene 6 argininas y 2 lisinas, y éstas son responsables del carácter hidrofílico y naturaleza básica del péptido, y que conjugándose a proteínas de fusión se internalizarán eficientemente en las células y existirá una influencia en funciones de la célula, como ciclos celulares¹⁵.

Otra causa por la que el TAT podría fragmentar el DNA es porque, induce proliferación celular, esto fue descrito por Bettaccini en 2005¹⁶, quienes evaluaron el crecimiento de células epiteliales mamarias expuestas a diferentes dosis de TAT (0, 10, 50, 100 y 500 ng/mL), la actividad la midieron por análisis colorimétrico de XTT, monocapas y PCR. Con los 2 primeros, identificaron una respuesta significativa en la proliferación en dichas células, la PCR la utilizaron para detectar alteraciones del receptor, factor de crecimiento y expresión de la transcripción de citocina después de la exposición al TAT, con estos resultados llegaron a la conclusión de que el TAT tiene un efecto mitogénico sobre las células mamarias, que estimulan la expresión de genes de significancia patogénica en la infección VIH y realza la expresión de las citocinas, estos resultados podrían correlacionarse con el aumento de cometas producido por TAT-BN sin marcar con ^{99m}Tc .

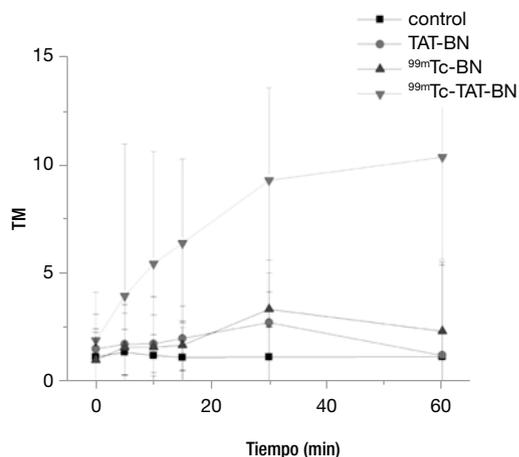


Figura 4 Cinética de internalización con los 3 tratamientos con una actividad de 14.8 MBq con el *Tail Moment*.

En relación con ^{99m}Tc-BN sin TAT, Ferro et al.² realizó un ensayo de internalización de este radiofármaco utilizando células PC-3, las cuales dividieron en 2 grupos: bloqueadas y sin bloquear, y fueron expuestas a ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-BN en diferentes tiempos de incubación a saber: 2, 4, 6 y 24 horas, midieron la actividad internalizada, y obtuvieron el 8% de internalización a las 2 horas y 11.5% a las 4 horas en el grupo sin bloquear, determinaron que existió diferencia significativa en comparación con las bloqueadas. En nuestros resultados el comportamiento de este radiofármaco se internalizó a los 60 minutos medidos con la técnica de ensayo cometa, por lo tanto, el sistema y condiciones implicadas en el presente estudio ofrece una mejor estrategia para detectar la internalización celular por medio de la fragmentación al DNA.

Por otro lado, en esta investigación, con relación al ^{99m}Tc-TAT-BN el efecto que produjo a los 30 minutos con todas las actividades empleadas es debido a la internalización del TAT al núcleo celular y por la emisión de electrones *auger* producidos por ^{99m}Tc. Los resultados que obtuvimos en los experimentos con una actividad de 14.8 MBq, se puede observar que ^{99m}Tc-N₂S₂-TAT(49-57)-BN, ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-BN y el péptido TAT-BN internalizaron en el núcleo celular, esto también fue demostrado por Santos en el 2009, quien realizó la cinética de internalización de estos 2 radiofármacos en células de cáncer de mama MCF7, MDA y PC3; de cáncer de próstata, mostraron resultados importantes en la internalización en las 3 líneas celulares, las cuales se inhibieron significativamente al ser incubadas con la BN. Sin embargo, existió mayor penetración del radiofármaco que contenía el TAT, ya que se encontraba en mayor proporción en el citoplasma y el que tenía sólo BN se encontraba en la membrana mostrando gran diferencia¹⁰. También, podemos mencionar los resultados de Constantini et al.¹⁷, quien propuso el mecanismo por el cual atraviesa el TAT la membrana celular y transporta su carga dentro de la célula, hipotetizaron que existe una interacción inicial de la carga entre los grupos catiónicos de la guanidina y residuos de arginina con las proteínas y fosfolípidos de la célula de superficie que están cargados negativamente por los grupos fosfato y sulfato¹⁷.

En cuanto al efecto de los electrones *auger*, Faraggi et al.¹⁸ probó que el ¹¹¹In emite 14.7 electrones *auger* por decaimiento con una energía de 6.75 KeV, y que la radiación de dosis absorbida en el núcleo estimando ser de 2 a 35 veces del doble o mayor del decaimiento en el núcleo, comparado con el decaimiento ocurrido dentro del citoplasma o en la célula de superficie, estas propiedades hacen que el ¹¹¹In y otros emisores de electrones *auger*, sean altamente citotóxicos y dañen al DNA cuando decaen cerca del núcleo de célula, teóricamente haciéndolas altamente selectivas para matar a las células cancerosas¹⁸. Buchegger et al., reportó que la doble hélice de DNA presenta un diámetro aproximado de 2 nanómetros, y que en un decaimiento típico de la radiación de los electrones *auger*, la energía más alta ocurre en rangos de 1 y 2 nanómetros. Esto significa, que la energía local calculada por un emisor de electrones *auger* incorporado al DNA afectará a la doble hélice con una energía de 1.6 MGy o más, esta energía de radiación es en gran parte suficiente para dañar a la doble hélice del DNA sobre las distancias de varios nucleótidos¹⁹.

En el presente estudio las cinética del inducción del daño al DNA por los diferentes tratamientos y actividades radiactivas, mostraron que existe una reparación del DNA producido por ^{99m}Tc-N₂S₂-TAT-BN y el péptido TAT-BN, tal como lo reportan Cossio (2004) empleando el ensayo cometa, quienes evaluaron el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducida por radiación ultravioleta en células sanguíneas humanas, utilizando muestras de voluntarios clínicamente sanos y de pacientes que tenían xeroderma pigmentoso (XP), los resultados que obtuvieron en la exposición de los leucocitos a la fuente de luz UV, mostraron que no hubo diferencias entre los valores reportados antes de la irradiación en el tiempo 0, pero al alcanzar el minuto 30 se produjo un aumento significativo de la longitud total de migración de las células sanas hasta 10.96 ± 0.88 y de los XP 6.54 ± 0.81 . Las longitudes totales de las células sanas disminuyeron (7.34 ± 0.97) a los 60 minutos de exposición, mientras que en las XP se observó un ligero aumento. Proponen que la disminución de la longitud total del cometa está relacionado con las acción de las polimerasas y las ADN ligasas que actúan sintetizando y sellando la molécula, cuya actividad depende en gran medida de la disponibilidad de precursores de la síntesis de ADN presentes en la célula²⁰.

Los resultados de esta investigación muestran que la fragmentación del DNA a diferentes actividades de radiación del radiofármaco puede llegar a ser una buena herramienta para el diagnóstico, ya que, si bien existe un efecto genotóxico en el linfocito, este tiene la habilidad de repararse con actividades bajas a los 60 minutos, produciendo el daño basal con una actividad de 14.8 MBq, lo que redundará en beneficio del paciente.

Conclusiones

En conclusión, el daño al DNA producido por el radiofármaco ^{99m}Tc.TAT-BN en 30 y 60 minutos con las actividades de 2.9, 6.6, 9.01 y 14.8 MBq, es por la internalización del TAT al núcleo celular y por la emisión de electrones *auger* del decaimiento del ^{99m}Tc, dado por la cantidad de energía que se produce en un volumen pequeño.

Financiamiento

Esta investigación fue parcialmente financiada por el proyecto 2806-2009 de la UAEM, y el proyecto CB-908 del ININ.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecemos al Dr. Jorge Serment, Dr. Madrigal, Biol. David Becerra, M. Virginia Cruz, M. Leticia Santos, Q. Noé Cruz, Q. Blanca Ocampo, M. Enrique Morales, Q. Andrea, Biol. Diana Espinoza, Dra. Sandra García y al Sr. Ángel Reyes, por su apoyo en la realización de este trabajo.

Bibliografía

1. Consultado en febrero 14 de 2008. <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad>.
2. Ferro G, Arteaga C, Rodríguez J, et al. Preparation and evaluation of $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-[Lys3]-bombesin}$ for imaging gastrin-releasing peptide receptor-positive tumours. *Nucl Med Commun* 2006;27:371-376.
3. Gugger M, Reubi J. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol* 1999;155:2067-2076.
4. Scopinaro F, De Vincentis G, Varvarigou AD, et al. $^{99m}\text{Tc-bombesin}$ detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. *Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:1378-1382.
5. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews* 2003;24:389-427.
6. Lin KS, Luu A, Baidoo KE, et al. A new high affinity technetium- 99m -bombesin analogue with low abdominal accumulation. *Bioconj Chem* 2005;16:43-50.
7. Nock B, Nikolopoulou A, Chiotellis E, et al. [^{99m}Tc] Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumor imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:247-250.
8. Nock B, Nikolopoulou A, Galanis A, et al. Potent Bombesin-like peptides for GRP-receptor targeting of the tumor with ^{99m}Tc a preclinical study. *J Med Chem* 2005;48:100-104.
9. Dietz GP, Bähr M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* 2004;27:85-131.
10. Santos C, Ferro G, Arteaga C, et al. Design, preparation, in vitro and in vivo evaluation of $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57)-BN}$. A target-specific hybrid radiopharmaceutical. *Int J Pharm* 2009;375:75-83.
11. Singh N, Mc Coy M, Tice E. Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-191.
12. Pedraza M, Ferro G, Mendiola MT, et al. Assessment of radiation-induced DNA damage caused by the incorporation of $^{99m}\text{Tc-radiopharmaceuticals}$ in linfocitos murinos. *Mutat Res* 2000;465:139-144.
13. Green M, Loewenstein P. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus of chemically synthesized human immunodeficiency virus TAT transactivator protein. *Cell* 1988;55:1179-1188.
14. Frankel A, Pabo C. Cellular uptake of the TAT protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988;55:1189-1193.
15. Futaki S. Membrane permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:547-558.
16. Bettaccini A, Baj A, Accolla R, et al. Proliferative activity of extracellular HIV-1 Tat protein in human epithelial cells, expression profile of the pathogenetically relevant genes. *BMC Microbiol* 2005;5:1-13.
17. Constantini D, Meiduo H, Reilly R. Peptide motifs for insertion of radiolabeled biomolecules into cell and routing to the nucleus cancer imaging or radiotherapeutic applications. *Cancer Biother Radiopharm* 2008;23:3-24.
18. Faraggi M, Gardin I, Labriolle C. The influence of tracer localization on electron dose rate derived to the cell nucleus. *Nucl Med* 1994;35:l.
19. Buchegger F, Perillo F, Dupertuis Y, et al. Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:1352-1363.
20. Cossio M, Gonzales Y, García J, et al. Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrogeno y radiación ultravioleta en células sanguíneas humanas. *Acta Farm Bonaerense* 2004;23:277-284.