




^{99m}Tc-HYNIC/Cy7-Fab(Bevacizumab): su empleo como agente de imagen en mieloma múltiple

^{99m}Tc-HYNIC/Cy7-Fab(Bevacizumab): its use as an imaging agent in Multiple Myeloma.

^{99m}Tc-HYNIC/Cy7-Fab (Bevacizumab): seu uso como agente de imagem em mieloma múltiplo.

 <https://doi.org/10.35954/SM2023.42.1.4.e302>

Ximena Aida Camacho Damata ^a  <https://orcid.org/0000-0002-0755-3834>
 Carolina Perroni ^b  <https://orcid.org/0000-0002-6790-4851>
 Mirel Cabrera ^c  <https://orcid.org/0000-0002-5225-1106>
 Marcos Tassano ^d  <https://orcid.org/0000-0001-6685-4656>
 Camila María Longo Machado ^e  <https://orcid.org/0000-0001-6122-1147>
 Camila de Godoi Carneiro ^f  <https://orcid.org/0000-0002-6547-398X>
 Mara de Souza Junqueira ^g  <https://orcid.org/0000-0002-2404-6543>
 Daniele Faria de Paula ^h  <https://orcid.org/0000-0002-1766-2786>
 María García ⁱ  <https://orcid.org/0000-0002-2918-5761>
 Marcelo Luis Fernández Lomonaco ^j  <https://orcid.org/0000-0002-5036-1459>
 Carlos Buchpiguel ^k  <https://orcid.org/0000-0003-0956-2790>
 Hugo Cerecetto ^l  <https://orcid.org/0000-0003-1256-3786>
 Roger Chammas ^m  <https://orcid.org/0000-0003-0342-8726>
 Eloisa Riva ⁿ  <https://orcid.org/0000-0002-4750-034X>
 Juan Pablo Gambini ^o  <https://orcid.org/0000-0001-5368-3464>
 Pablo Cabral ^p  <https://orcid.org/0000-0001-7344-2027>

- (a) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
 (b) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
 (c) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
 (d) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
 (e) Nuclear Medicine Medical Investigation Laboratory LIM43-Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP, São Paulo, Brazil.
 (f) Nuclear Medicine Medical Investigation Laboratory LIM43-Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP, São Paulo, Brazil.
 (g) Laboratório de Oncologia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo Nº 455 - Cerqueira César - CEP: 01246903, São Paulo, Brazil.

Recibido para evaluación: enero 2023

Aceptado para publicación: marzo 2023

Correspondencia: Ximena Camacho. Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Matajojo 2055, C.P. 11400, Montevideo, Uruguay. Tel: (+598) 294921199.

E-mail de contacto: xcdamata@gmail.com





- (h) Nuclear Medicine Medical Investigation Laboratory LIM43-Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP, São Paulo, Brazil.
- (i) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- (j) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- (k) Nuclear Medicine Medical Investigation Laboratory LIM43-Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP, São Paulo, Brazil.
- (l) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- (m) Laboratório de Oncologia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo Nº 455- Cerqueira César - CEP: 01246903, São Paulo, Brazil
- (n) Clínica Hematológica. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- (o) Centro de Medicina Nuclear e Imagenología Molecular, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- (p) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

RESUMEN

Introducción: el mieloma múltiple es un trastorno hematológico maligno y el segundo cáncer de la sangre más frecuente. El proceso de la angiogénesis tumoral es fundamental para el crecimiento y metástasis de muchos tipos de tumores, incluido en mieloma múltiple. Se sabe que la sobreexpresión del factor de crecimiento endothelial vascular se encuentra asociado a un mal pronóstico en esta patología, representando un blanco clave para la terapia anti-angiogénica en mieloma múltiple. El anticuerpo monoclonal Bevacizumab es capaz de unirse con gran afinidad al factor de crecimiento endothelial vascular bloqueando su acción.

Objetivo: evaluar el Fab(Bevacizumab) marcado con ^{99m}Tc o Cy7 como potenciales agentes de imagen moleculares de la expresión de factor de crecimiento endothelial vascular en mieloma múltiple.

Material y métodos: la expresión de factor de crecimiento endothelial vascular fue analizada mediante citometría de flujo en la línea celular humana de mieloma múltiple, la MM1S. Fab(Bevacizumab) fue producido mediante digestión de Bevacizumab con papaína, conjugado a NHS-HYNIC-Tfa y radiomarcado con ^{99m}Tc . Se realizaron estudios de biodistribución y de tomografía computarizada por emisión del fotón simple. A su vez, Fab(Bevacizumab) fue marcado con Cy7 para obtener imágenes de fluorescencia *in vivo* hasta 96 horas.

Resultados: el análisis por citometría de flujo en la línea celular MM1S reveló que la expresión de factor de crecimiento endothelial vascular es predominantemente intracelular. Los estudios de biodistribución y SPECT/CT del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) mostraron una rápida eliminación sanguínea y una significativa captación a nivel renal y tumoral. Las imágenes por fluorescencia empleando Cy7-Fab (Bevacizumab) permitieron la visualización tumoral hasta 96 h p.i.

Conclusiones: logramos visualizar la expresión de factor de crecimiento endothelial vascular *in vivo* en mieloma múltiple mediante el empleo del fragmento Fab del anticuerpo anti-VEGF (Bevacizumab) marcado con ^{99m}Tc y Cy7. Estos nuevos agentes de imagen molecular podrían ser empleados potencialmente en el ámbito clínico para la estadificación y el seguimiento de pacientes con mieloma múltiple, mediante la visualización radioactiva *in vivo* de la expresión de factor de crecimiento endothelial vascular en todo el cuerpo. La imagen óptica de estos trazadores mejoraría el muestreo tumoral y podría guiar la extirpación quirúrgica.

PALABRAS CLAVE: Fab(Bevacizumab); Factor de Crecimiento Endotelial Vascular; Imagenología Molecular; Mieloma Múltiple; ^{99m}Tc .

ABSTRACT

Introduction: Multiple myeloma is a hematologic malignancy and the second most common blood cancer. The process of tumor angiogenesis is central to the growth and metastasis of many types of tumors, including multiple myeloma. Overexpression of vascular endothelial growth factor is known to be associated with poor prognosis in this pathology, representing a key target for anti-angiogenic therapy in multiple myeloma. The monoclonal antibody Bevacizumab is able to bind with high affinity to vascular endothelial growth factor blocking its action.

Objective: To evaluate ^{99m}Tc- or Cy7-labeled Fab(Bevacizumab) as potential molecular imaging agents of vascular endothelial growth factor expression in multiple myeloma.

Material and Methods: Vascular endothelial growth factor expression was analyzed by flow cytometry in the multiple myeloma human cell line, MM1S. Fab(Bevacizumab) was produced by digestion of Bevacizumab with papain, conjugated to NHS-HYNIC-Tfa and radiolabeled with ^{99m}Tc. Biodistribution and single photon emission computed tomography studies were performed. In turn, Fab(Bevacizumab) was labeled with Cy7 to obtain *in vivo* fluorescence images up to 96 hours.

Results: Flow cytometry analysis in the MM1S cell line revealed that vascular endothelial growth factor expression is predominantly intracellular. Biodistribution and SPECT/CT studies of the ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab) complex showed rapid blood clearance and significant renal and tumor uptake.

Fluorescence imaging using Cy7-Fab(Bevacizumab) allowed tumor visualization up to 96 h p.i.

Conclusions: We were able to visualize vascular endothelial growth factor expression *in vivo* in multiple myeloma using the Fab fragment of the anti-VEGF antibody (Bevacizumab) labeled with ^{99m}Tc and Cy7. These new molecular imaging agents could potentially be employed in the clinical setting for staging and monitoring of patients with multiple myeloma by *in vivo* radioactive visualization of vascular endothelial growth factor expression throughout the body. Optical imaging of these tracers would improve tumor sampling and could guide surgical excision.

KEYWORDS: Fab(Bevacizumab); Vascular Endothelial Growth Factor; Molecular Imaging; Multiple Myeloma; ^{99m}Tcnetium.

RESUMO

Introdução: o mieloma múltiplo é uma malignidade hematológica e o segundo câncer de sangue mais comum. O processo de angiogênese tumoral é fundamental para o crescimento e a metástase de muitos tipos de tumores, incluindo o mieloma múltiplo. Sabe-se que a superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular está associada a um prognóstico ruim no mieloma múltiplo, representando um alvo importante para a terapia antiangiogênica no mieloma múltiplo. O anticorpo monoclonal Bevacizumab é capaz de se ligar com alta afinidade ao fator de crescimento endotelial vascular e bloquear sua ação.

Objetivo: avaliar o Fab(Bevacizumab) marcado com ^{99m}Tc ou Cy7 como possíveis agentes de imagem molecular da expressão do fator de crescimento endotelial vascular no mieloma múltiplo.

Material e métodos: a expressão do fator de crescimento endotelial vascular foi analisada por citometria de fluxo na linha celular de mieloma múltiplo MM1S. O Fab(Bevacizumab) foi produzido pela digestão do Bevacizumab com papaína, conjugado com NHS-HYNIC-Tfa e radiomarcado com ^{99m}Tc. Foram realizados estudos de biodistribuição e tomografia computadorizada por emissão de fóton único. Por sua vez, o Fab (Bevacizumab) foi marcado com Cy7 para geração de imagens de fluorescência *in vivo* por até 96 horas.



Resultados: a análise de citometria de fluxo na linha celular MM1S revelou que a expressão do fator de crescimento endotelial vascular é predominantemente intracelular. Os estudos de biodistribuição e SPECT/CT do complexo ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) mostraram uma rápida depuração sanguínea e uma captação renal e tumoral significativa. A imagem de fluorescência usando Cy7-Fab(Bevacizumab) permitiu a visualização do tumor até 96 horas p.i.

Conclusões: conseguimos visualizar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular *in vivo* no mieloma múltiplo usando o fragmento Fab do anticorpo anti-VEGF (Bevacizumab) marcado com ^{99m}Tc e Cy7. Esses novos agentes de imagem molecular poderiam ser usados no cenário clínico para o estadiamento e o monitoramento de pacientes com mieloma múltiplo, visualizando radioativamente a expressão do fator de crescimento endotelial vascular *in vivo* em todo o corpo. A geração de imagens ópticas desses traçadores melhoraria a amostragem do tumor e poderia orientar a excisão cirúrgica.

PALAVRAS-CHAVE: Fab(Bevacizumab); Fator de Crescimento do Endotélio Vascular; Imagens Moleculares; Mieloma Múltiplo; ^{99m}Tc Technetium.

1. INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple (MM) es un trastorno hematológico maligno caracterizado por la proliferación clonal de células plasmáticas (CPs) en la médula ósea (MO), producción de paraproteínas monoclonales en sangre y/o suero y la sobreproducción de inmunoglobulinas monoclonales (1-5).

Se sabe que el MM es una enfermedad de las CPs caracterizada por una estrecha relación entre las células tumorales y el microambiente de la MO, promoviendo el crecimiento y el desarrollo de células mielomatosas (6). En los últimos años, se ha demostrado que en enfermedades hematológicas existe un incremento del proceso angiogénico en el microambiente de la MO, incluyendo en MM, demostrando un rol patofisiológico potencial en esta enfermedad. En MM, como en tumores sólidos, la progresión de la enfermedad se caracteriza por una etapa pre-angiogénica de progresión tumoral lenta seguido por el “cambio angiogénico” y un posterior estado angiogénico asociado con el crecimiento tumoral progresivo (7).

Se ha demostrado que el proceso angiogénico ocurre en la etapa de transición de gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS,

por sus siglas en inglés) tanto a MM quiescente o asintomático como a MM activo o sintomático (8,9).

La angiogénesis incrementada en la MO en MM se encuentra sostenida por un desequilibrio entre la producción de factores pro- y anti-angiogénicos por parte de las células mielomatosas y células del microambiente. Las células mielomatosas interactúan con distintas células del microambiente de la MO (células estromales de la MO (BMSC), fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, linfocitos T, monocitos/macrófagos y mastocitos), provocando la producción de factores de crecimiento que favorecen su supervivencia; desencadenando la proliferación de las células endoteliales y el proceso angiogénico. Uno de los factores producidos por las células mielomatosas y por el microambiente, y que poseen un rol esencial para inducir la angiogénesis en MM, es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se ha demostrado que las células mielomatosas son capaces de producir VEGF directamente (10), siendo capaz de estimular la secreción de VEGF por las células estromales de la MO, las cuales sucesivamente inducen la producción de VEGF por las células mielomatosas de forma parácrina (11-13).

Donde la sobreexpresión de VEGF en MM está asociada a un mal pronóstico (7,14-17).

Actualmente la inhibición del proceso angiogénico es empleado para el tratamiento de MM, por ejemplo, mediante el empleo de Talidomida. Se ha visto que durante el tratamiento con esta droga los niveles del VEGF en la MO y en plasma disminuyen (18,19).

Por lo cual el bloqueo del VEGF sería una estrategia adecuada para contrarrestar esta enfermedad. Dicho bloqueo se puede lograr mediante el empleo del anticuerpo Bevacizumab (rhuMAb-VEGF, Avastin®, Genentech, USA). El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado capaz de unirse a todas las isoformas del VEGF humano con gran afinidad (20,21).

El uso de este anticuerpo actualmente se encuentra bien establecido en tumores sólidos, como cánceres de colon y carcinomas de células renales, y actualmente se encuentra en fase de pruebas en tumores onco-hematológicos como leucemia mieloide aguda y MM (9).

Muchas moléculas anti-angiogénicas han sido radiomarcadas para producir un agente diagnóstico y/o terapéutico (22-31), con potencial para detectar tumores emergentes, monitorizar las respuestas a tratamientos y predecir sus resultados; así como también poder determinar aquellos pacientes que podrían beneficiarse de una terapia anti-angiogénica. A su vez, estas moléculas podrían ser marcadas con un fluoróforo para obtener imágenes con alta resolución y a tiempo real de la expresión a nivel tumoral de VEGF (29-31), lo que permitiría guiar las intervenciones quirúrgicas. Los fluoróforos NIR se han utilizado cada vez más en este ámbito debido a que presentan razonable penetración con baja autofluorescencia tisular (32,33).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar potenciales agentes de

imagen radiactivos y fluorescentes para visualizar la expresión de VEGF en MM. Para llevarlo a cabo, marcamos Fab(Bevacizumab) con Cy7 y con ^{99m}Tc mediante NHS-HYNIC-Tfa como agente quelante bifuncional (AQB).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Modelo celular de MM Humano

La línea celular humana de MM (MM1S) fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC). El medio base utilizado fue RPMI-1640 (Capricorn), suplementadas con Suero Fetal Bovino (SFB) a una concentración final de 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL streptomycin. El cultivo fue incubado a 37 °C con 5% de CO₂ y una atmósfera del 95% de humedad.

2.2 Bevacizumab Fab fragments production

Bevacizumab (Avastin™, 25 mg/mL) producido por Genetech, Inc., fue adquirido de Laboratorios Roche, Uruguay.

Los fragmentos Fab fueron generados mediante la digestión de Bevacizumab utilizando papaína (Sigma-Aldrich, EE.UU.) según a lo descrito previamente por nuestro grupo (34,35).

Brevemente, Bevacizumab (25 mg/mL) se hizo reaccionar empleando una cantidad 1/10 (g/g) de papaína (1 mg/mL) disuelto en un buffer de reacción (20 mM de fosfato sódico monobásico, 10 mM de EDTA y 80 mM de clorhidrato de L-cisteína) durante 6 h a 37 °C, bajo agitación constante (225 rpm). Tras la digestión, la mezcla de reacción fue centrifugada a 200 g por 5 min hasta un volumen final de 100 µl y el sobrenadante fue eliminado; empleando un dispositivo de ultracentrifugación Centricom-30 (Sigma Aldrich).

Por último, los Fabs fueron purificados por cromatografía de afinidad empleando una columna de proteína A (Pierce). La concentración de proteína se midió a 280 nm y se ajustó a una concentración final de 1,0 mg/mL (36).



2.3 Análisis por citometría de flujo

2.3.1 Tinción de la superficie

Tras disgregar el cultivo, las células fueron lavadas 3 veces en buffer fosfato salino (PBS, 5 min a 600 g). Luego las células son fijadas en Paraformaldehyde (PFA) al 2% frío disuelto en PBS e incubadas a 4 °C durante 15 min. Tras la fijación, las células son bloqueadas durante 1 h a 4 °C con PBS-3% de seroalbúmina bovina (BSA) y, a continuación, incubadas con 2 µg de Fab(Bevacizumab)-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (2 mg/mL) en PBS-1% de BSA. Tras 2 h de incubación en oscuridad a 37 °C, las células fueron lavadas 3 veces con PBS (5 min, 600 xg). Los datos fueron adquiridos en el citómetro de flujo FACSCALIBUR® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA) (37).

2.3.2 Tinción intracelular

Tras disgregar el cultivo en PBS, fijarlo en PFA al 2% y lavarlo, las células fueron permeabilizadas empleando 200 µl de Tween-20 al 0,2% (v/v) disuelto en PBS durante 30 min a 4 °C. Luego, las células fueron lavadas 3 veces con PBS-1% BSA (5 min, 600 xg) para eliminar el 0,2% (v/v) de Tween-20 del medio, bloqueadas durante 1 h a 4 °C con PBS-BSA 3% e incubadas con 2 µg de Fab(Bevacizumab)-FITC durante 2 h a 37 °C en oscuridad.

Por último, las células fueron lavadas 3 veces con PBS (5 min, 600 xg). Los datos fueron adquiridos y analizados como fue descrito previamente en la sección 2.2.1.

Los controles para la tinción de superficie e intracelular fueron células solas y control de isotipo-FITC (2 µg por cada ensayo) para determinar los niveles de autofluorescencia, y/o reacciones inespecíficas (37).

2.4 Unión del HYNIC al Fab(Bevacizumab), radiomarcado con ^{99m}Tecnecio y controles de calidad.

El agente quelante bifunciona NHS-HYNIC-Tfa fue sintetizado y conjugado al Fab(Bevacizumab) como fue descrito previamente por nuestro grupo (35-38).

Brevemente, fueron mezclados 0,213 µmol de Fab(Bevacizumab) a temperatura ambiente (TA) durante 30 min con 0,33 µmol de NHS-HYNIC-Tfa disuelto en 7,1 µL de Dimethylsulfoxido (DMSO). El conjugado fue purificado mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) Sephadex G-25 y Matrix-assisted laser desorption/ionization/time-of-flight (MALDI TOF/TOF) lineal fue empleado para determinar el nivel de conjugación. La marcación de Fab(Bevacizumab)-HYNIC con ^{99m}Tecnecio y los controles de calidad fueron realizados como fue descrito previamente por nuestro grupo (35-38).

Para ello, se mezclaron 44.6 mol de Tricina, 44.3 mol de SnCl₂.2H₂O y 6.7 nmol de Fab (Bevacizumab)-HYNIC y se les adicionaron una solución de Na^{99m}TcO₄ recién eluido. La mezcla fue incubada a TA por 30 min y la pureza radioquímica fue evaluada por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los análisis por HPLC fueron realizados empleando una columna TSKgel G2000SW XL 7.8 mm x 30 cm (Tosoh Bioscience, LLC, Japan) eluida con buffer fosfato 0.05 M (pH 7.0), modo isocrático (flujo 1 mL/min); empleando el equipo Agilent 1200, equipado con detectors de absorbancia UV y NaI(Tl) (25-28, 34,35, 37,38).

La integridad de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) fue analizada por medio de la incubación en suero y en distintas concentraciones de L-Cisteína a 37 °C.

Las mezclas de reacción fueron analizadas por HPLC hasta 4 h.

2.5 Animales e inducción tumoral

La línea celular MM1S a una concentración de $0,5 \times 10^7$ (con al menos un 95% de células viables) fueron inyectadas por vía intravenosa en ratones hembras BALB/c Nude, a nivel del dorso del animal en la zona interescapular (sitio denominado cruz del animal).

Los animales fueron controlados diariamente durante al menos 1 mes evaluando el crecimiento tumoral. Todos los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas en estanterías ventiladas (Alesco, Campinas, SP, Brasil) con alimento y agua esterilizados a voluntad, en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con los principios éticos adoptados por el Colegio Brasileño de Experimentación Animal y aprobados por el Comité Ético de Investigación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo (número de aprobación del procedimiento 279/12). Ratones BALB/c sanos, de 8-10 semanas de edad (20-24 g), se obtuvieron del bioterio animal de la Universidad de la República, Uruguay. Todos los animales se mantuvieron con comida y agua ad libitum durante todo el experimento, en un ambiente de temperatura y humedad controladas. Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con los principios éticos adoptados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de Uruguay (número de aprobación del procedimiento 240011-002308-14).

2.6 Estudios de biodistribución *in vivo*

La evaluación biológica *in vivo* del ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) fue realizada por estudios de biodistribución en ratones Balb/C normales y Balb/C nude previamente inoculados con células MM1S. Animales (n=5 por grupo

y por tiempo) fueron inyectados por la vena de la cola con aproximadamente 1.8 MBq del Fab(Tocilizumab) radiomarcado purificados y eutanizados por drogas anestésicas (xilazina-100mg/Kg and ketamina-300 mg/Kg) luego de 2 y 6 h. Los tejidos seleccionados (tumor, corazón, hígado, pulmones, tiroides, riñones, estómago, bazo, tracto gastrointestinal y vejiga) fueron extirpados, enjuagados de la sangre residual, pesados y sus radiactividades medidas en un detector de NaI(Tl). La sangre y orina fueron también colectados y medidos en el contador gamma. La actividad en los órganos o tejidos del tumor fue expresada como porcentaje de actividad (% Act) y como porcentaje de actividad por gramo de tejido (% Act/g).

2.7 Conjugación de Fab(Bevacizumab) con Cianina 7-NHS ester.7

Una solución de 2 mg/mL de Fab(Bevacizumab) fue disuelta en 0.5 mL de NaCl 0.15 M y centrifugados a 14000 g por 10 min at 4 °C empleando un cartucho de centrifugación Amicon Ultra 0.5 mL 10K MWCO (Sigma-Aldrich). Posteriormente, el buffer fue sustituido por NaHCO₃ 0.1 M (pH 8.3) y esta solución conteniendo Fab(Bevacizumab) fue mezclada con una solución de Cy7NHS-éster disuelto en DMSO. La reacción fue incubada durante 2 h en oscuridad. Para remover el Cy7-NHS libre, las mezclas fueron centrifugadas a 14000g por 10 min a 4 °C. Luego, el buffer de los conjugados fue reemplazado por PBS 1X pH 7.4.

La concentración de proteínas en mg/mL fue calculada según la siguiente:

$$\text{mg/mL Proteína} = (\text{Abs280} - 0.04 \times \text{Abs747}) / 1.4$$

La relación de Cy7:Fab(Bevacizumab) en el conjugado final fue calculado según la siguiente fórmula:



Relación de Cy7/ Fab(Bevacizumab) = (Abs747 x MWFab(Bevacizumab) / mg/mL Proteína x ϵ_{cy7}

($\epsilon_{cy7} = 210000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)

2.8 Imagenología molecular

2.8.1 Imágenes SPECT/CT

Las imágenes SPECT/CT (Single-photon emission computed tomography/computed tomography) fueron llevadas a cabo empleando un equipamiento microPET/SPECT/CT (Triumph, Trifoil Imaging Inc). Luego de 21 días de la inoculación subcutánea de las líneas celulares de MM (MM1S) en ratones hembras Balb/C nude (BALB/c nu/nu), una mezcla de isoflurano: oxígeno de 2:2.5% fue usado para la anestesia seguido de la inyección intravenosa de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab)(74-185 MBq/ratón). Todas las imágenes SPECT/CT fueron adquiridas empleando un colimador five pinhole (0.8 mm de resolución espacial, 55 x 55 mm campo trans-axial de visión, 64 proyecciones, FOV=46mm) y reconstruidas con un filtro OSEM de corrección (5 interacciones con 8 subconjuntos) con un 20% de ventana- ^{99m}Tc seguido de la generación DICOM por el software Amira 4.1 (FEI Visualization Sciences Group, Bordeaux, Zuse Institute, Berlin, Germany) y la co-registración fue analizada con el software Amide (39).

2.8.2 Imágenes PET

Las imágenes PET fueron llevadas a cabo empleando un equipamiento microPET/SPECT/CT (Triumph, Trifoil Imaging Inc). Luego de 21 días de la inoculación subcutánea de la línea celular de MM (MM1S) en ratones hembras Balb/C nude (BALB/c nu/nu), una mezcla de isoflurano: oxígeno de 2:2.5% fue usado para la anestesia seguido de la inyección

intravenosa en la vena de la cola de ^{18}F -FDG, (74-111 MBq/mice). Luego de 1 h, las imágenes PET fueron adquiridas (tres adquisiciones por lotes con 5 minutos cada lote) y reconstruidas con el software Triumph PET seguido de la generación DICOM por el software Amira 4.1 (FEI Visualization Sciences Group, Bordeaux, Zuse Institute, Berlin, Germany) y la co-registración fue analizada con el software Amide (39).

2.8.3 Imágenes por fluorescencia

Las imágenes por fluorescencia *in vivo* fueron realizadas en ratones portadores de tumores MM1S con Cy7-Fab(Bevacizumab) (100 μg) hasta 96 h p.i. Se utilizó como control un ratón Balb/c nude sano no inyectado con Cy7-Fab (Bevacizumab). Las imágenes fueron adquiridas empleando filtros de excitación de 745 nm y de emisión de 800 nm en una cámara con dispositivo de acoplamiento de carga iVis Spectrum (Perkin-Elmer). Las imágenes de fluorescencia fueron cuantificadas mediante cuantificación de la eficiencia radiante total ([fotones/s] / [$\mu\text{W}/\text{cm}^2$]) utilizando el software Living Image 4.3.1. Para realizar los estudios de imagen por fluorescencia todos los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano-oxígeno 1-2%.

2.9 Análisis estadísticos

Todos los datos fueron analizados mediante ANOVA unidireccional seguido de pruebas post hoc de Bonferroni con el programa GraphPad Prism 4.0. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,5$.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis por citometría de flujo

En la figura 1 se observan los histogramas respectivos de los análisis por citometría de flujo realizados en la línea celular MM1S sin permea-

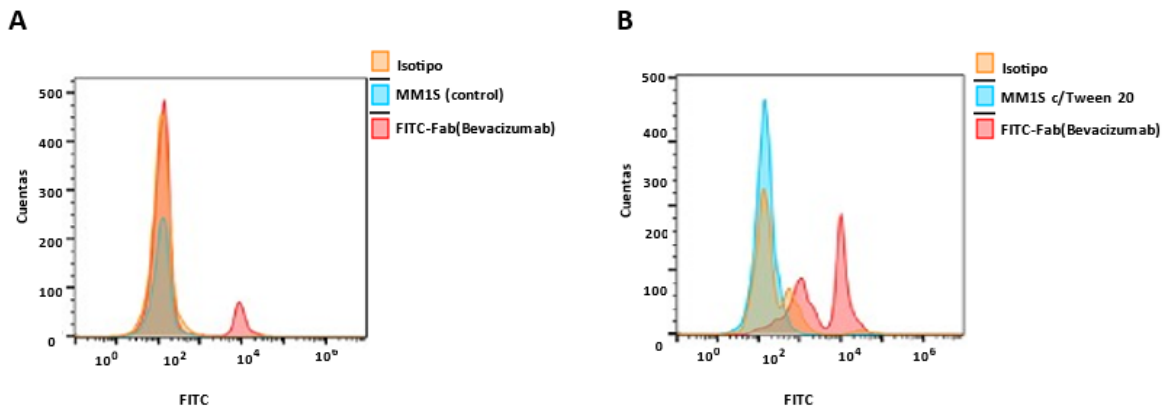


Figura 1. Análisis por citometría de flujo en la línea celular MM1S A) sin permeabilizar y B) permeabilizadas con Tween empleando: control sólo células; control de isotipo y FITC-Fab(Bevacizumab).

bilizar como permeabilizadas con Tween 20%, empleando FITC-Fab(Bevacizumab). Se observó un incremento de la capacidad de unión del FITC-Fab(Bevacizumab) al VEGF al ser permeabilizadas las células. Por lo tanto, el VEGF es detectado principalmente por tinción intracelular, confirmando su expresión a dicho nivel.

Al realizar un análisis comparativo de las intensidades medias de fluorescencias (IMF) Fab (Bevacizumab) conjugado a FITC en la línea celular de MM humano MM1S, se observó que el fragmento no presenta un significativo incremento de la IMF cuando las células MM1S no son permeabilizadas. Sin embargo, al ser permeabilizadas dichas células y de esta forma lograr acceder a los antígenos intracelulares de dichas células, el fragmento incrementa su IMF debido al reconocimiento al VEGF (comparado al reconocimiento del control de isotipo FITC-IgG1); esto demuestra la especificidad de la unión del Fab (Bevacizumab) en dicha línea celular (figura 2).

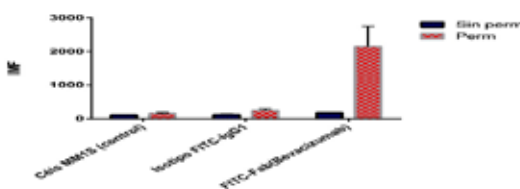


Figura 2. Intensidad media de fluorescencia (IMF) en la línea celular MM1S sin permeabilizar y permeabilizadas con Tween empleando: control sólo células; control de isotipo FITC-IgG1 y FITC-Fab(Bevacizumab).

Mediante este estudio fue que nos alentó a inocular esta línea celular para la inducción de tumores de MM y realizar de esta forma los estudios *in vivo* de biodistribución e imagenológicos.

3.2 Estudios *in vivo* de biodistribución

Los estudios de biodistribución *in vivo* en ratones Balb/c normales y Balb/C nude portadores de tumores de MM inducidos por la inoculación de células MM1S se encuentran resumidos en la Tabla 1 y en las figuras 3 a 5. Los niveles de radioactividad en sangre en ratones normales fueron $0.69 \pm 0.09\%$ DI/g y $0.74 \pm 0.20\%$ DI/g a las 2 y 6 h p.i. respectivamente; mientras que la radiactividad sanguínea para ratones BALB/c nude con tumores MM1S inducidos fue de $3.13 \pm 0.35\%$ DI/g y $2.79 \pm 0.50\%$ DI/g a 2 y 6 h p.i, respectivamente. Esto demuestra una menor eliminación sanguínea del fragmento Fab radiomarcado en ratones normales comparado a los portadores de tumores inducidos, cuya diferencia podría deberse al efecto de las células tumorales a nivel humoral. Se observó una absorción renal ($40.48 \pm 0.80\%$ DI/g y $39.92 \pm 0.63\%$ DI/g a 2 y 6 p.i. respectivamente) relacionada con la eliminación del fragmento Fab radiomarcado en ratones Balb/c normales. A 2 y 6 h p.i, 48.78 ± 0.63 y $37.27 \pm 0.48\%$ DI de ^{99m}Tc-HYNI-Fab (Bevacizumab) fue excretado por la orina.



Valores similares de absorción renal y eliminación por la orina fueron observados en los ratones Balb/C Nude portadores de tumores inducidos.

Los datos de la biodistribución de la absorción a nivel tumoral de los ratones Balb/C nude portadores de tumores MM1S inducidos, revelaron una buena captación y retención de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab).

La captación tumoral para los ratones Balb/C nude portadores de tumores MM1S fue de $2.38 \pm 0.72\%$ DI/g y $1.06 \pm 0.18\%$ DI/g a 2 y 6 h p.i., respectivamente.

Las relaciones tumor-versus-músculo de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) en los ratones Balb/C nude portadores de tumores MM1S fueron 5.68 y 2.94 a 2 y 6 h, respectivamente.

Tejido	Ratones Balb/c normales		Ratones Balb/c nude portadores de MM inducido (MM1S)	
	2 h	6 h	2 h	6 h
Porcentaje de dosis inyectada/gramo (%DI/g)*				
Sangre	0.69±0.09	0.74±0.20	3.13±0.35	2.79±0.50
Hígado	1.35±0.03	0.91±0.14	1.79±0.31	2.85±0.61
Corazón	1.04±0.10	1.01±0.14	1.56±0.72	1.39±0.31
Pulmones	1.84±0.06	1.41±0.52	2.18±0.93	1.81±0.41
Bazo	0.75±0.13	0.47±0.25	1.40±0.49	3.39±1.71
Riñones	40.48±0.80	39.92±0.63	45.47±5.88	54.03±3.68
Tiroides	1.47±0.43	0.56±0.12	1.21±0.07	1.23±0.07
Músculo	1.06±0.52	1.10±0.31	0.42±0.16	0.36±0.05
Hueso	1.79±0.96	2.11±0.44	0.67±0.43	0.80±0.26
Estómago	1.19±0.26	0.84±0.18	0.75±0.05	2.54±0.41
TI	1.72±0.27	1.91±0.51	2.89±0.20	2.52±1.25
Tumor	-	-	2.38±0.72	1.06±0.18
Porcentaje de dosis inyectada (%DI)*				
Intestino	2.76±0.72	2.72±0.40	6.99±0.87	5.49±1.41
Orina+Vejiga	48.78±0.63	37.27±0.48	33.63±0.41	50.52±6.05
Relación de absorción tumor/tejido normal*				
Tumor/Sangre	-	-	0.76	0.38
Tumor/Músculo	-	-	5.68	2.94

Tabla 1. Estudios de biodistribución de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) en ratones Balb/C normales y portadores de tumores MM1S inducidos. Datos presentados como % DI/g (o % Act) \pm desviación estándar (DS) (n=5). TI=Tracto intestinal.

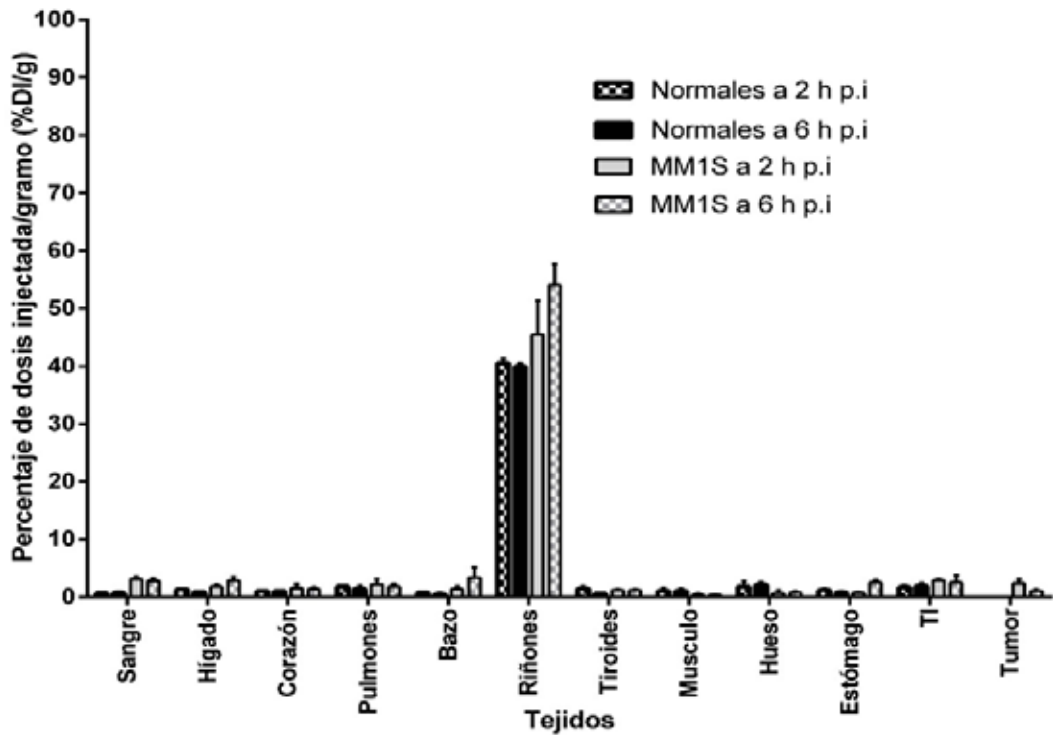


Figura 3. Biodistribución de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) en ratones Balb/C normales y portadores de tumores MM1S inducido (n=5% DI/g ± DS).

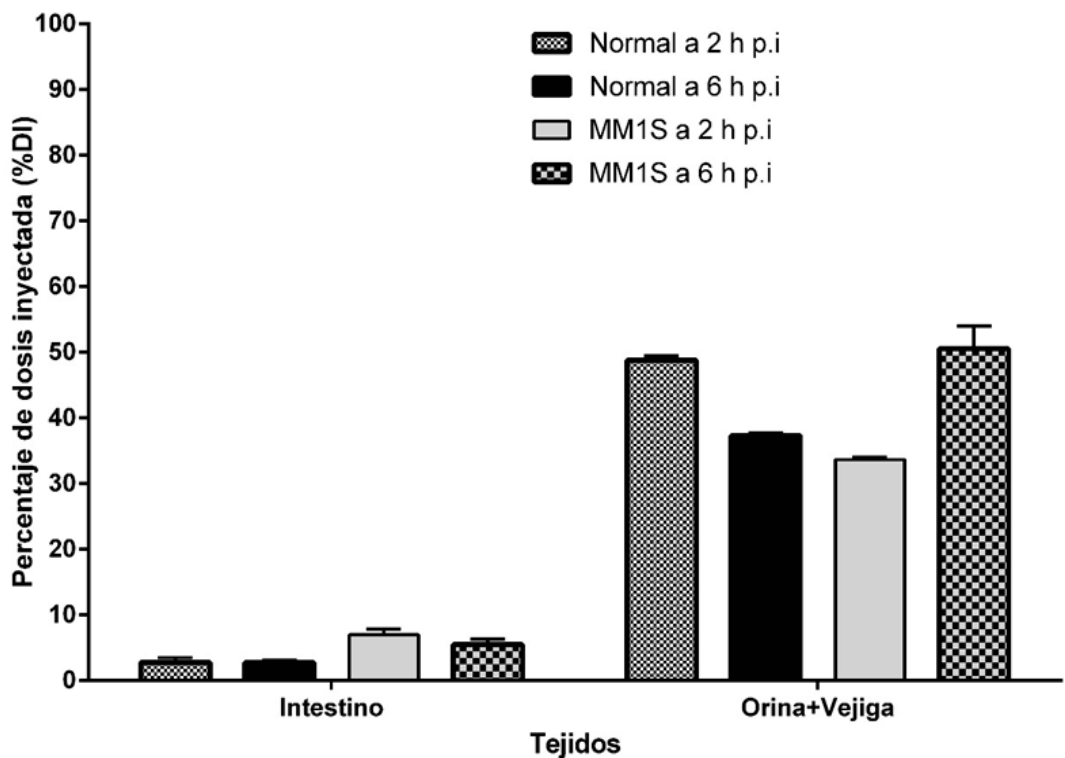


Figura 4. Biodistribución de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) en ratones Balb/C normales y portadores de tumores MM1S inducido (n=5, % DI ± DS).

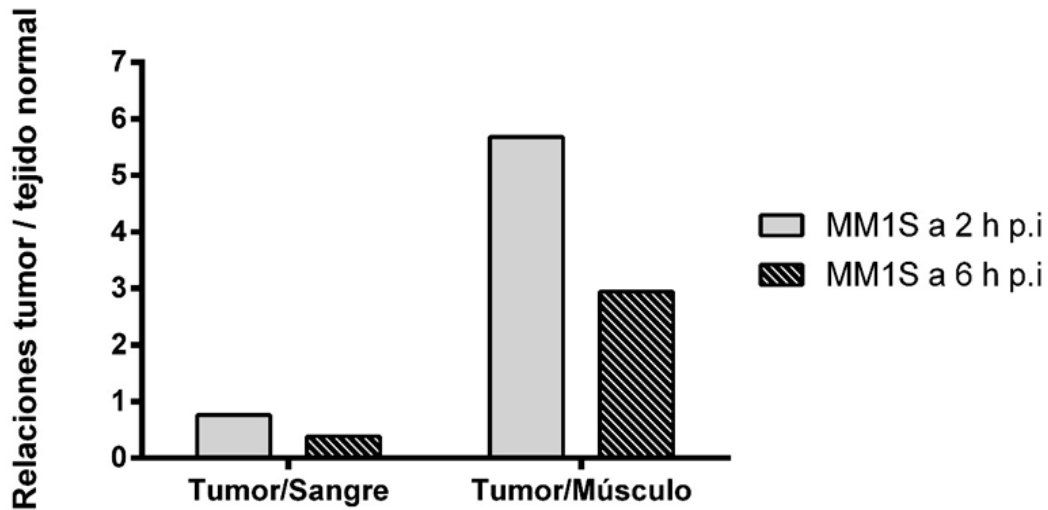


Figura 5. Relación Tumor/Músculo y Tumor/Sangre obtenidas de las biodistribuciones de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) en ratones Balb/c nude portadores de tumores MM1S inducidos (n = 5).

3.3 Conjugación Cy7-Fab(Bevacizumab)

La concentración de Cy7-Fab(Bevacizumab) obtenida fue 1.25 mg/mL y la relación de moles Cy7/moles Fab(Bevacizumab) fue 2.25.

3.4 Imagenología molecular

3.4.1 Imágenes SPECT/CT y PET

Las imágenes SPECT-CT de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) en ratones BALB/c normales mostraron una elevada captación a nivel renal a 2 h, la cual concuerda con los estudios de biodistribución (figura 6.A). Luego de 24 h posterior a la realización de la imagen PET se realizaron las imágenes SPECT-CT de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) a 0.5, 2 h y 6 h al Ratón 1 (figura 6.B). Las imágenes de ^{18}F -FDG en tres ratones Balb/C nude portadores de tumores MM1S inducido revelaron un aumento de la captación a nivel de los linfonodos axilares (figura 7). Las imágenes de SPECT-CT hasta 6 h en el ratón 1 portador de tumores MM1S inducido, revelaron una apreciable captación a nivel de los linfonodos axilares, verificando de esta forma la captación que fuera observada en las imágenes de ^{18}F -FDG.

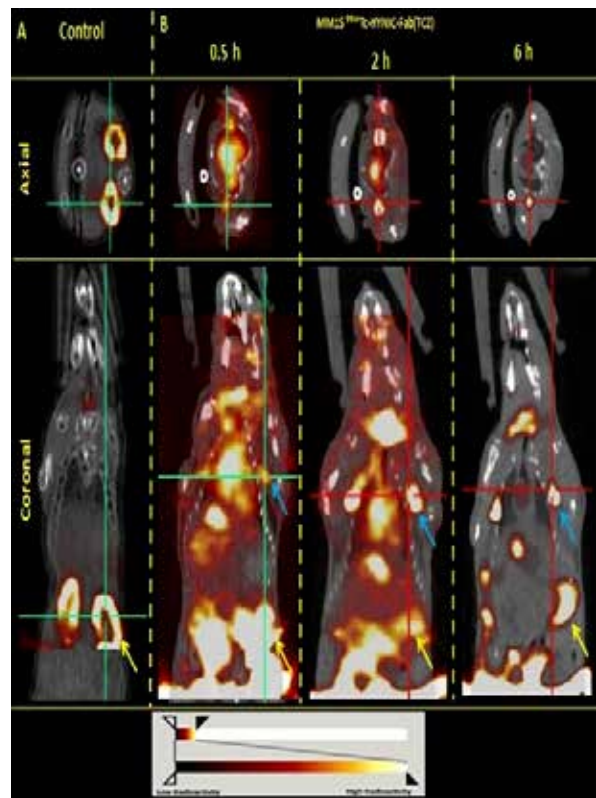


Figura 6. A) Imagen SPECT/CT de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) en ratón Balb/C normal (control) a 2 h post-inyección. B) Imagen SPECT/CT de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) en ratón BALB/c Nude portador de tumor MM1S inducido a 0.5, 2 y 6 h post-inyección. Se observó una remarcable captación a nivel renal (flechas amarillas) que concuerda con los estudios de biodistribución; como también una apreciable captación del Fab(Bevacizumab) radiomarcado a nivel de los linfonodos axilares (flechas celestes).

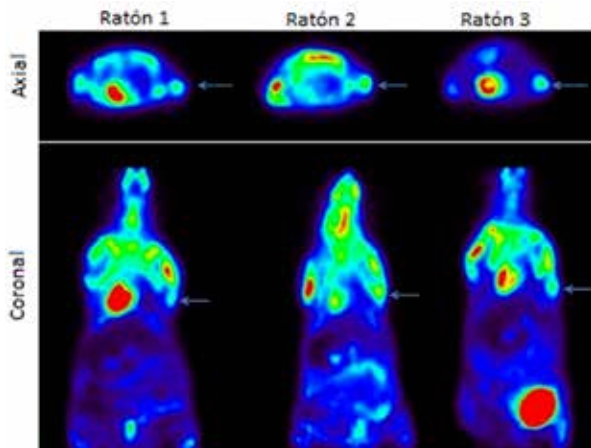


Figura 7. Imágenes PET axiales y coronales a 1 h post-inyección de ¹⁸F-FDG en 3 ratones BALB/c Nude portadores de tumores MM1S inducidos. Se observa un área de captación de ¹⁸F-FDG a nivel de los linfonodos axilares (flechas azules).

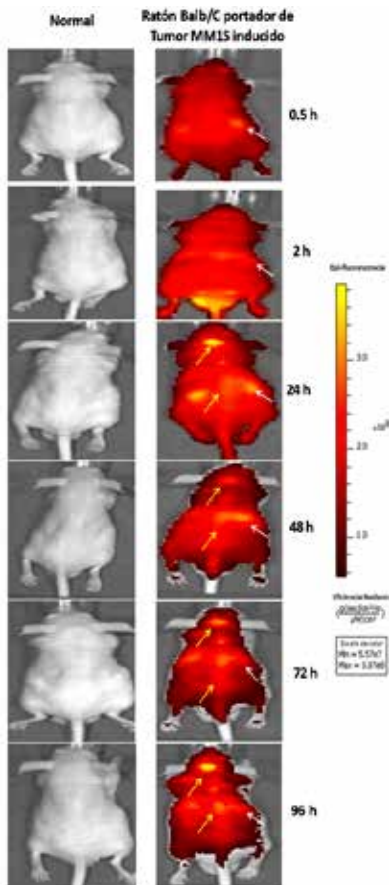


Figura 8. Imágenes iVis hasta 96 h (iVis Spectrum *In Vivo* Imaging System, Perkin Elmer) en ratón normal Balb/C nude (usado como control) y en ratón Balb/C nude portadores de tumor de MM inducido, inyectado con 100 µg de Cy7-Fab(Bevacizumab). Se observa una apreciable captación a nivel renal (flechas blancas) y a nivel tanto de la zona interescapular (sitio de inoculación de las células MM1S) como a nivel de la médula espinal (flechas amarillas).

3.4.2 Imágenes por Fluorescencia

Los datos de las imágenes por fluorescencia de Cy7-Fab(Tocilizumab) se muestran en la Figura 8. Las imágenes fueron realizadas hasta 96 h p.i. de 100 µg/100 µL de Cy7-Fab (Bevacizumab), revelando una clara fluorescencia en el dorso del animal, en la zona interescapular (sitio denominado cruz del animal), hasta 96 h p.i. y que aumenta con el tiempo.

4. DISCUSIÓN

Actualmente se sabe que el proceso angiogénico posee un rol fundamental para el desarrollo del MM mediante su estrecha relación entre las células tumorales y su microambiente. Se ha demostrado que, en MM, las células tumorales son capaces de interactuar con células del microambiente provocando la producción de factores de crecimiento que favorecen su supervivencia, en especial el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Nuestro objetivo fue sintetizar y caracterizar potenciales agentes de imagen moleculares anti-VEGF basados en la marcación del fragmento de unión al antígeno (Fab), empleando tanto un emisor gamma (como el ^{99m}Tc) como un emisor de fluorescencia (como el Cy7) debido a nuestra experiencia en el marcado de anticuerpos y Fab con ambos emisores (25-28,34,35,37,38), los cuales se podrían emplear como métodos diagnósticos para la evaluación de los niveles de expresión de VEGF en MM. Se ha descrito que la línea celular de mieloma múltiple MM1S expresa VEGF (40-42), por lo que esta línea celular fue empleada para la caracterización *in vitro* de Fab(Bevacizumab) marcado con FITC a fin de confirmar su afinidad y especificidad de unión al VEGF. Los análisis de citometría de flujo realizados con FITC-Fab(Bevacizumab) revelaron diferencias en el nivel de expresión entre el VEGF unido a membrana y el intracelular, demostrando claramente que en esta línea celular analizada este factor se expresa



principalmente de forma intracelular. Mediante estos estudios fue por lo que nos decidimos emplear la línea celular MM1S para ser inyectada en ratones BALB/c Nude y de esta forma que sea empleado como modelo para los ensayos biológicos *in vivo*. La estabilidad *in vivo* fue verificada a través de estudios de biodistribución e imagenológicos en ratones BALB/c normales y BALB/C Nude portadores de tumores inducidos mediante la inoculación de células de MM, MM1S. Los estudios de biodistribución que llevamos a cabo empleando ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) en ratones BALB/C Nude portadores de tumores MM1S, se observó una rápida depuración sanguínea, con eliminación renal principalmente, y ausencia de captación apreciable en otros órganos. La eliminación renal, se puede explicar en base a que los productos de metabolización de los Fab (con un peso molecular aproximado de 50 kDa) pueden ser filtrados por el glomérulo renal unido al radionucleido. Se observó que aproximadamente el 50% de la radioactividad inyectada fue eliminada en la orina y vejiga a 2 h p.i. Los estudios de biodistribución y las imágenes SPECT/CT realizadas en ratones BALB/c Nude portadores de tumores MM1S inducidos, nos permitieron apreciar una significativa captación tumoral. Estos resultados nos hacen considerar que a 2 h post-inyección sería el mejor momento para la realización de imágenes SPECT/CT en ratones portadores de tumores MM1S inducidos, debido a que se obtienen las mayores relaciones tumor-vs-músculo (relación 5.68 a 2 h p.i) del complejo del fragmento radiomarcado. Al realizar la comparación entre las imágenes ^{18}F -FDG y SPECT/CT en ratones MM1S, se observó la misma área de captación a nivel de los linfonodos empleando ambas técnicas, pero las imágenes SPECT/CT empleando ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) revelaron una mejor resolución. La conjugación del fragmento Fab con Cy7, se realizó de forma rápida y sencilla, obteniendo

un adecuado rendimiento de conjugación que se encuentra dentro del rango esperado para dichos compuestos y proteínas. Las imágenes en el iVIS obtenidas en ratones con MM inducidos verificaron, al igual a lo observado en los estudios de biodistribución e imágenes SPECT/CT empleando un emisor gamma, los mismos perfiles de eliminación de los compuestos marcados como también la efectiva retención a nivel tumoral como de su diseminación hacia los linfonodos axilares. Dichas retenciones fueron verificadas hasta 96 h posteriores a la inyección del fragmento marcado con Cy7, respectivamente, tanto a nivel del sitio de inoculación de las células como a nivel de los linfonodos axilares. Dichas captaciones a nivel de los linfonodos axilares se podría deber a que son lugares de muy alta probabilidad de migración de células tumorales para su posterior diseminación hacia otros sitios. Estas nuevas sondas fluorescentes podrían ser emplear para guiar la extirpación quirúrgica de tumores que sobreexpresen VEGF.

El VEGF, molécula blanco del anticuerpo monoclonal Bevacizumab, no sólo es el regulador central de la angiogénesis tumoral sino también juega un rol importante en la fisiología de la vasculatura normal. Su expresión se ha observado en el parénquima de varios órganos de animales sanos, los que incluyen riñones, hígado, pulmones y bazo (43); y, por lo tanto, es esperado que agentes cuyo blanco sea el VEGF se unan también a tales tejidos no tumorales de forma inespecífica. Estos resultados nos permitirían creer que el fragmento de unión al antígeno (Fab) del Bevacizumab podría ser utilizado como un nuevo agente de imagen molecular. Siendo útiles a la hora de proporcionar información relevante del nivel de expresión del VEGF antes y después de realizada una quimioterapia, lo que podría mejorar las terapias antitumorales actuales. El empleo de la imagenología molecular nos permite monitorear a tiempo real la respuesta tumoral a la terapia de una forma no invasiva, benefi-

ciando nuestra comprensión de los mecanismos que subyacen el crecimiento del tumor, su microambiente y su respuesta a la quimioterapia. Por todo lo anterior, es claro que el fragmento Fab del Bevacizumab configura una potencial herramienta como estrategias de imagen molecular de la expresión del VEGF en tumores oncohematológicos de una forma no invasiva. Creemos que estos fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales fluorescentes y radiomarcados tienen un gran potencial diagnóstico y terapéutico que todavía no se ha explorado.

5. CONCLUSIONES

El MM es una enfermedad frecuente y mortal, y la imagenología molecular es empleada para monitorear su progresión.

Nuevos agentes de imágenes para MM nos podrían ayudar a comprender mejor el rol del microambiente en esta enfermedad. Teniendo en cuenta este hecho, hemos desarrollado con éxito agentes de imagen basados en el empleo del fragmento de unión al antígeno (Fab) del Bevacizumab marcado con ^{99m}Tc y Cy7 para su uso como blancos de la expresión de VEGF *in vivo* en MM. Esperamos que estos nuevos agentes de imagen moleculares abran el camino hacia nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas de MM; pudiendo contribuir a la decisión de seguir o no con los tratamientos quimioterapéuticos o radioterapéuticos dados el alto costo que el uso de éstos conlleva.

Estos nuevos trazadores desarrollados podrían ser vistos como herramientas clínicas para la realización de estudios de screening del VEGF en tumores que podrían responder a la quimioterapia asociada al uso de Bevacizumab. A su vez, la imagenología óptica de estos trazadores podría mejorar tanto el muestreo tumoral como también guiar la extirpación quirúrgica.

Aprobación ética y consentimiento de participación

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Animal de la Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (número de aprobación del procedimiento 279/12), Brasil, y por el Comité Uruguayo de Ética en Experimentación Animal (número de aprobación del procedimiento 240011-002308-14), Uruguay.

FINANCIACIÓN

Este trabajo contó con el apoyo de la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (Uruguay) [POS_NAC_2015_1_109490] y la Comisión Sectorial de Investigación Científica-Universidad de la República (Uruguay) [240600-000148-18].

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Pro.In.Bio (Uruguay), PEDECIBA Química (Uruguay), Agencia Nacional de Innovación e Investigación (Uruguay) y Comisión Sectorial de Investigación Científica - Universidad de la República (Uruguay).

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores no reportan ningún conflicto de interés. El estudio se realizó con recursos propios de los autores y/o la institución a la que representan.

REFERENCIAS

- (1) Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2007 Aug; 7(8):585-98. doi: 10.1038/nrc2189.



- (2) Katzel JA, Hari P, Vesole DH. Multiple myeloma: charging toward a bright future. *CA Cancer J Clin* 2007 Sep-Oct; 57(5):301-18. doi: 10.3322/CA.57.5.301.
- (3) Pratt G. Molecular aspects of multiple myeloma. *Mol Pathol* 2002 Oct; 55(5):273-83. doi: 10.1136/mp.55.5.273.
- (4) Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* 2009 Jul 25; 374(9686):324-39. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60221-X.
- (5) Malpas JS, Carroll JJ. Myeloma: clinical presentation and diagnosis. In: Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle RA, eds.; *Myeloma: Biology and Management*: New York, NY: Oxford University Press; 1995, pp. 169-190.
- (6) Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol* 2011; 6:249-74. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130249.
- (7) Kumar S, Witzig TE, Timm M, Haug J, Wellik L, Fonseca R, *et al.* Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia* 2003 Oct; 17(10):2025-31. doi: 10.1038/sj.leu.2403084.
- (8) Asosingh K, De Raeve H, Menu E, Van Riet I, Van Marck E, Van Camp B, *et al.* Angiogenic switch during 5T2MM murine myeloma tumorigenesis: role of CD45 heterogeneity. *Blood* 2004 Apr 15; 103(8):3131-7. doi: 10.1182/blood-2003-08-2946.
- (9) Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, *et al.* Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994 Jul; 87(3):503-8. doi: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb08304.x.
- (10) Lawson MA, McDonald MM, Kovacic N, Hua Khoo W, Terry RL, Down J, *et al.* Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat Commun* 2015 Dec 3; 6:8983. doi: 10.1038/ncomms9983.
- (11) Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, Mansouri T, Gidel C, Keating M, *et al.* Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999 Dec 1; 94(11):3717-21.
- (12) Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, *et al.* Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 2001 Dec; 15(12):1950-61. doi: 10.1038/sj.leu.2402295.
- (13) Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999 Sep 20; 18(38):5356-62. doi: 10.1038/sj.onc.1203035.
- (14) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- (15) Ria R, Melaccio A, Racanelli V, Vacca A. Anti-VEGF Drugs in the Treatment of Multiple Myeloma Patients. *J Clin Med* 2020 Jun 6; 9(6):1765. doi: 10.3390/jcm9061765.
- (16) Palta A, Kaur M, Tahlan A, Dimri K. Evaluation of Angiogenesis in Multiple Myeloma by VEGF Immunoexpression and Microvessel Density. *J Lab Physicians* 2020 Mar; 12(1):38-43. doi: 10.1055/s-0040-1714933.
- (17) Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, *et al.* Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001 Jul 15; 98(2):428-35. doi: 10.1182/blood.v98.2.428.

- (18) Dmoszyńska A, Bojarska-Junak A, Domański D, Roliński J, Hus M, Soroka-Wojtaszko M. Production of proangiogenic cytokines during thalidomide treatment of multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2002 Feb; 43(2):401-6. doi: 10.1080/10428190290006224.
- (19) Kumar S, Witzig TE, Dispenzieri A, Lacy MQ, Wellik LE, Fonseca R, *et al.* Effect of thalidomide therapy on bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* 2004 Mar; 18(3):624-7. doi: 10.1038/sj.leu.2403285.
- (20) Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, *et al.* Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997 Oct 15; 57(20):4593-9. PMID: 9377574.
- (21) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 Jun 3; 350(23):2335-42. doi: 10.1056/NEJMoa032691. PMID: 15175435.
- (22) Desar IM, Stillebroer AB, Oosterwijk E, Leenders WP, van Herpen CM, van der Graaf WT, *et al.* ¹¹¹In-bevacizumab imaging of renal cell cancer and evaluation of neoadjuvant treatment with the vascular endothelial growth factor receptor inhibitor sorafenib. *J Nucl Med* 2010 Nov; 51(11):1707-15. doi: 10.2967/jnumed.110.078030. Epub 2010 Oct 18. PMID: 20956472.
- (23) Chang AJ, Sohn R, Lu ZH, Arbeit JM, Lapi SE. Detection of rapalog-mediated therapeutic response in renal cancer xenografts using ⁶⁴Cu-bevacizumab immunoPET. *PLoS One* 2013; 8(3):e58949. doi: 10.1371/journal.pone.0058949.
- (24) Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, Mulder NH, de Jong JR, Hollema H, *et al.* In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J Nucl Med* 2007 Aug; 48(8):1313-9. doi: 10.2967/jnumed.107.041301.
- (25) Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Porcal W, Alonso O, *et al.* Synthesis and evaluation of (^{99m}Tc) chelate-conjugated bevacizumab. *Curr Radiopharm* 2013 Mar; 6(1):12-9. doi: 10.2174/1874471011306010003.
- (26) Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Chabalgoity JA, Moreno M, *et al.* [(^{99m}Tc)(CO)(3)]-radiolabeled bevacizumab: in vitro and *in vivo* evaluation in a melanoma model. *Oncology* 2013; 84(4):200-9. doi: 10.1159/000338961.
- (27) Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Alonso O, J Gambini JP, *et al.* ^{99m}Tc-Labeled Bevacizumab via HYNIC for Imaging of Melanoma. *J Analytical Oncol* 2014; 3(1):53-64. doi:10.6000/1927-7229.2014.03.01.9.
- (28) Camacho X, Perroni C, Carneiro CG, Junqueira MS, Machado CL, Faria D, *et al.* Molecular Imaging of VEGF Expression in Multiple Myeloma and Non-Hodgkin Lymphoma. *J Mol Biol & Mol Imaging* 2022; 7(1):1033.
- (29) Cohen R, Stammes MA, de Roos IH, Stigter-van Walsum M, Visser GW, van Dongen GA. Inert coupling of IRDye800CW to monoclonal antibodies for clinical optical imaging of tumor targets. *EJNMMI Res* 2011 Dec 1; 1(1):31. doi: 10.1186/2191-219X-1-31.
- (30) Cohen R, Vugts DJ, Stigter-van Walsum M, Visser GW, van Dongen GA. Inert coupling of IRDye800CW and zirconium-89 to monoclonal antibodies for single- or dual-mode fluorescence and PET imaging. *Nat Protoc* 2013 May; 8(5):1010-8. doi: 10.1038/nprot.2013.054.



- (31) Zhang Y, Hong H, Engle JW, Yang Y, Barnhart TE, Cai W. Positron Emission Tomography and Near-Infrared Fluorescence Imaging of Vascular Endothelial Growth Factor with Dual-Labeled Bevacizumab. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2012 Jan 1; 2(1):1-13. PMID: 22229128; PMCID: PMC3249831.
- (32) Te Velde EA, Veerman T, Subramaniam V, Ruers T. The use of fluorescent dyes and probes in surgical oncology. *Eur J Surg Oncol* 2010 Jan; 36(1):6-15. doi: 10.1016/j.ejso.2009.10.014.
- (33) Frangioni JV. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2003 Oct; 7(5):626-34. doi: 10.1016/j.cbpa.2003.08.007.
- (34) Perroni C, Camacho X, García MF, Fernández M, Cerecetto H, Gambini JP, *et al.* ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab): potencial agente de imagen para diagnóstico de Linfoma No Hodgkin. *Salud Militar* 2017 Dic; 36(2):14-24. <https://doi.org/10.35954/SM2017.36.2.2>
- (35) Camacho X, Perroni C, Machado CL, de Godoi Carneiro C, de Souza Junqueira M, Faria D, *et al.* ^{99m}Technetium- or Cy7-Labeled Fab(Tocilizumab) as Potential Multiple Myeloma Imaging Agents. *Anticancer Agents Med Chem* 2021; 21(14):1883-1893. doi: 10.2174/1871520621999210104181238.
- (36) Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 1989 Nov 1; 182(2):319-26. doi: 10.1016/0003-2697(89)90602-7. Erratum in: *Anal Biochem* 1990 Sep; 189(2):283. PMID: 2610349.
- (37) Camacho X, Machado CL, García MF, Gambini JP, Banchemo A, Fernández M, *et al.* Technetium-99m- or Cy7-Labeled Rituximab as an Imaging Agent for Non-Hodgkin Lymphoma. *Oncology* 2017; 92(4):229-242. doi: 10.1159/000452419.
- (38) Camacho X, Machado CL, García MF, Fernández M, Oddone N, Benech J, *et al.* Tocilizumab Labeling with ^{99m}Technetium via HYNIC as a Molecular Diagnostic Agent for Multiple Myeloma. *Anticancer Agents Med Chem* 2017; 17(9):1267-1277. doi: 10.2174/1871520617666170213144917.
- (39) Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Mol Imaging* 2003 Jul; 2(3):131-7. doi: 10.1162/15353500200303133.
- (40) Kumar S, Witzig TE, Timm M, Haug J, Wellik L, Fonseca R, *et al.* Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia* 2003 Oct; 17(10):2025-31. doi: 10.1038/sj.leu.2403084. PMID: 14513053.
- (41) Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, *et al.* Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 2001 Dec; 15(12):1950-61. doi: 10.1038/sj.leu.2402295.
- (42) Wang J, Chen J, Qiu D, Zeng Z. Regulatory role of DEPTOR mediated cellular autophagy and mitochondrial reactive oxygen species in angiogenesis in multiple myeloma. *Int J Mol Med* 2021 Feb; 47(2):643-658. doi: 10.3892/ijmm.2020.4831.
- (43) Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993 Apr; 264(4 Pt 1):C995-1002. doi: 10.1152/ajpcell.1993.264.4.C995.

CONTRIBUCIONES AL MANUSCRITO:

- (a) Concepción, diseño, adquisición de datos, análisis de datos, interpretación y discusión de resultados, redacción y revisión crítica, y aprobación de la versión final.
- (b) Diseño, adquisición de datos.
- (c) Diseño, adquisición de datos.
- (d) Diseño, adquisición de datos, análisis de datos.
- (e) Diseño, adquisición de datos.
- (f) Diseño, adquisición de datos.
- (g) Diseño, adquisición de datos.
- (h) Diseño, adquisición de datos, análisis de datos, interpretación y discusión de resultados.
- (i) Diseño, adquisición de datos.
- (j) Diseño, adquisición de datos.
- (k) Diseño, adquisición de datos.
- (l) Diseño, interpretación y discusión de resultados.
- (m) Diseño, análisis de datos, interpretación y discusión de resultados.
- (n) Diseño, análisis de datos; interpretación y discusión de resultados.
- (o) Diseño, análisis de datos; interpretación y discusión de resultados; redacción y revisión crítica.
- (p) Concepción, diseño, análisis de datos, interpretación y discusión de resultados, redacción y revisión crítica.

NOTA: este artículo fue aprobado por el Comité Editorial.