INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Síntese e caracterização pré-clínica de um novo derivado de 2-nitroimidazol
como potencial traçador PET para imagem de hipóxia tumoral**

ARIAN PÉREZ NARIO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Emerson Soares Bernardes**

**São Paulo
2020**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Síntese e caracterização pré-clínica de um novo derivado de 2-nitroimidazol
como potencial traçador PET para imagem de hipóxia tumoral**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

ARIAN PÉREZ NARIO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Emerson Soares Bernardes**

**São Paulo
2020**

Fonte de Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

PÉREZ NARIO, A. ***Síntese e caracterização pré-clínica de um novo derivado de 2-nitroimidazol como potencial traçador PET para imagem de hipóxia tumoral.*** 2020. 160 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PÉREZ NARIO, Arian

Síntese e caracterização pré-clínica de um novo derivado de 2-nitroimidazol como potencial traçador PET para imagem de hipóxia tumoral / Arian PÉREZ NARIO; orientador Emerson Soares Bernardes. -- São Paulo, 2020.

160 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.

1.

[19/18F]N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida. 2. hipóxia. 3. síntese. 4. avaliação biológica. 5. imagem PET de câncer gástrico. I. Soares Bernardes, Emerson, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Arian Pérez Nario

Título: Síntese e caracterização pré-clínica de um novo derivado de 2-nitroimidazol como potencial traçador PET para imagem de hipóxia tumoral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

***Às minhas maiores fontes de inspiração e amor,
meus Pais. Essa conquista não é só minha, É NOSSA!***

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a meu orientador Dr. Emerson Soares Bernardes, o meu sincero agradecimento pela confiança, pelos ensinamentos transmitidos, pela amizade e sobretudo pela compreensão e conversa nas horas em que parece que nada está dando certo.

Aos meus pais, Orlando e Milagros, como exemplos de dignidade, força, por ser os melhores pais do mundo e meu exemplo a seguir sempre, são a base para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À minha única e querida irmã, a força e luz da minha vida sem ela impossível chegar até aqui, pela amizade, amor e companheirismo ao longo de nossas vidas. Eu não seria absolutamente nada sem você!

À minha namorada Yanexy Guerrero Pérez, por estar ao meu lado nesses últimos anos de tanto estresse, obrigado por muito amor, força, carinho e compreensão nos bons e maus momentos. Amo você!

À Dra. Sofia de Nascimento, pelo incentivo durante a realização deste trabalho, por sua ajuda em vários experimentos e sua valiosa contribuição para a análise e discussão dos resultados.

Aos amigos de pós-graduação, Dra. Martha Sahylí Ortega Pijeira, BSc. Yasniel Babí Araujo, BSc. Andy Gonzalez Rivera, BSc. Angela Pepe Carneiro, Jhonatas Pedrosa Marim Pereira, Dino Seigo Gushiken Junior, BSc. Andre Henrique Silva, MSc. Fábio Fernando Alves da Silva e Dra. Angélica Barbezán, pela ajuda em diversas experiências no IPEN, SP, Brasil!

À Dra. Vanessa Leiria Campo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil, por me permitir realizar parte da síntese orgânica a frio em seu laboratório, apoiar e supervisionar os resultados e discutir os dados comigo sempre que necessário. Gostaria também de agradecer à equipe do laboratório da Dra. Ivone Carvalho.

Aos funcionários do Centro de Radiofarmácia, em especial a Edivaldo Caetano Da Silva, Dr. Efraim Perini, MSc. Jair Mengatti, Rosana Herrerias, Wilson Bruzinga, Dr. Luis Alberto Pereira Dias, Dra. Lorena Pozzo e Dra. Regina Carneiro. Também para o departamento de controle de qualidade (MSc. Natanael

Gomes Da Silva e Carlos Farias Felgueiras), o departamento de proteção radiológica (Eduardo Gerulis, Olavo Pedro da Silva e Dra. Malvina Boni Mitake) e os assistentes administrativos.

Aos funcionários do Centro de Aceleradores de Ciclotron do IPEN, em especial a Décio Borges de Souza, Enocles Melo de Oliveira, Dr. André Luis Lapolli e Dr. Henrique Barcellos De Oliveira.

Ao Dr. Daniel Perez Vieira, e aos funcionários do Centro de Biotecnologia, por disponibilizar suas áreas para parte dos estudos celulares utilizados neste trabalho.

Aos funcionários e colaboradores do Biotério, em especial à, Ana Claudia e Dra. Nanci Nascimento (in memoriam), por todo o suporte dado em relação aos animais utilizados neste trabalho.

À Dra. Daniele Faria e Dra. Caroline Real Gregória da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil, por disponibilizar suas áreas para parte dos estudos com animais utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Frederick West e Dr. Frank Wuest dos Departamentos de Química e Oncologia Molecular, respectivamente, da Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá, juntamente com o Governo do Canadá (ELAP - Programa de Líderes Emergentes nas Américas 2017-2018), por apoiar minha pesquisa de cinco meses no laboratório e por compartilhar seus conhecimentos.

Aos estudantes e funcionários dos Departamentos de Química e Oncologia Molecular da Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá, especialmente: MSc. Cody Bergman, Dra. Melinda Wuest, Dra. Seyedeh Nargess Hosseini e Msc. Ahmed Hamdy Elmenoufy.

Aos amigos de todo o mundo pelo apoio, especialmente a Martha Sahylí Ortega Pijeira, Yasniel Babí Araujo, Andy Gonzalez Rivera, Ivón Oramas Polo, Maria Adelfa Abreu Zamora, Hector Acosta Pérez, Yanirys Pérez, Annaly Cruz Sotolongo, Kiki Rodriguez, Raul Morera, Roberto Frias e Nelson Felipe.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -, por financiar minha bolsa de estudos no Brasil.

À Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP) e ao Centro de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisa em Energia e Nuclear (IPEN / CNEN), no Brasil, por seu valioso apoio financeiro nesta pesquisa.

A todos que me ajudaram de maneiras diferentes, e eu não mencionei acima.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite, por suas opiniões e sugestões críticas, que melhoraram minha pesquisa e me tornaram um pesquisador melhor.

Aos funcionários da divisão de pós-graduação do IPEN.

Finalmente, um agradecimento especial a Deus por ter abençoado todos os dias da minha vida, por me guiar, iluminar, me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

MUITO OBRIGADO

“Não é porque as coisas são difíceis que não ousamos; são difíceis, precisamente, porque não ousamos...”

Lucio Anneo Sêneca

RESUMO

PÉREZ NARIO, A. ***Síntese e caracterização pré-clínica de um novo derivado de 2-nitroimidazol como potencial traçador PET para imagem de hipóxia tumoral.*** 2020. 160 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Hipóxia é uma condição patológica caracterizada pela redução no fornecimento de oxigênio para um determinado tecido ou célula. Em comparação com outros métodos de diagnóstico por imagem não invasivos, a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) é uma das modalidades mais utilizadas na detecção de hipóxia tumoral devido a sua maior especificidade e resolução espacial. Os objetivos desta tese foram sintetizar: 1) sintetizar e caracterizar um radiofármaco inédito marcado com ^{18}F , [^{18}F]N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida [^{18}F]FBNA, para a detecção de áreas de hipóxia no microambiente tumoral através de imagem molecular PET e; 2) comparar esse produto inédito com o radiofármaco [^{18}F]FAZA utilizado hoje em dia em estudos clínicos para detecção de hipóxia tumoral. A molécula FBNA foi sintetizada e caracterizada química e estruturalmente por técnicas espectroscópicas. Além disso, o FBNA foi eficientemente radiomarcado com ^{18}F ([^{18}F]FBNA) e obtido com alta pureza química e radioquímica (> 90%), com bons tempos de radio síntese, rendimento radioquímico e atividade molar. O novo radiofármaco [^{18}F]FBNA mostrou-se estável em salina e em soro por até 6 horas, mais hidrofílico que o [^{18}F]FMISO e menos hidrofílico que o [^{18}F]FAZA. Adicionalmente, foram realizados estudos de captação celular *in vitro* em duas linhagens tumorais de câncer gástrico humano, demonstrando que o [^{18}F]FBNA é captado especificamente por células em hipóxia e não em células em condições normóxicas. Com a imagem μPET , autoradiografia, e os estudos de biodistribuição *ex vivo*, verificou-se que o [^{18}F]FBNA foi captado mais rápido e apresentou valores das relações Tumor/Músculo e Tumor/Sangue mais favoráveis em comparação com o [^{18}F]FAZA, o que sugere uma eliminação mais rápida, menor captação por órgãos inespecíficos e maior qualidade de imagem do que o [^{18}F]FAZA. O composto inédito da presente tese apresentou resultados pré-clínicos superiores ao padrão [^{18}F]FAZA utilizado em ensaios clínicos hoje em dia, pelo que podemos concluir de nossos resultados preliminares que o radiofármaco [^{18}F]FBNA apresenta

condições favoráveis para ser o próximo radiotraçador para o diagnóstico de hipóxia na prática clínica.

Palavras-chave: $[^{19/18}\text{F}]$ N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida; hipóxia; síntese; avaliação biológica; imagem PET

ABSTRACT

PÉREZ NARIO, A. ***Synthesis and preclinical characterization of a new 2-nitroimidazole derivative as a potential PET tracer for tumor hypoxia imaging.*** 2020. 160 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Hypoxia is a pathological condition characterized by a reduced supply of oxygen to a given tissue or cell. In comparison with other non-invasive diagnostic methods, Positron Emission Tomography (PET) is one of the most used modalities in the detection of tumor hypoxia due to its greater specificity and spatial resolution. The purpose of this thesis is to synthesize, evaluate and quantify a new tracer, [^{18}F]N-(4-fluorobenzyl)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamide, [^{18}F]FBNA, for the detection of areas of hypoxia in the tumor microenvironment using a molecular PET image and to compare this product with the radiopharmaceutical [^{18}F]FAZA used today in clinical studies for the detection of tumor hypoxia. The FBNA molecule was synthesized and characterized chemically and structurally by spectroscopic techniques. In addition, the FBNA was efficiently radiolabeled with ^{18}F ([^{18}F]FBNA) and obtained with high chemical and radiochemical purity (> 90%), with good radiosynthesis times, radiochemical yield and molar activity. The new radiopharmaceutical [^{18}F]FBNA proved to be stable in saline and serum for up to 6 hours, more hydrophilic than [^{18}F]FMISO and less hydrophilic than [^{18}F]FAZA. In addition, *in vitro* cell uptake studies were carried out on two tumor lines of human gastric cancer demonstrating that [^{18}F]FBNA presented uptake specifically by cells in hypoxia and not in cells under normoxic conditions. With the μPET image, autoradiography, and *ex vivo* biodistribution studies, it was found that the [^{18}F]FBNA was captured faster and showed more favorable Tumor/Muscle and Tumor/Blood values compared to the [^{18}F]FAZA, which suggests faster elimination, less uptake by nonspecific organs and higher image quality than [^{18}F]FAZA. The novel compound of the present thesis presented pre-clinical results superior to the [^{18}F]FAZA standard used in clinical trials today, so we can conclude from our preliminary results that the radiopharmaceutical [^{18}F]FBNA presents favorable conditions to be the next radiotracer for the diagnosis of hypoxia in clinical practice.

Keywords: [$^{19/18}\text{F}$]N-(4-fluorobenzyl)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-yl)acetamide;
hypoxia; synthesis; biological evaluation; PET imaging

LISTA DE ABREVIATURAS

% DI/g	Porcentagem de dose injetada por grama
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATSM	Diacetil-bis (N4-metiltiossemicarbazona
β^+	Emissão de pósitrons; decaimento beta +
BOLD	Dependente do Nível de Oxigênio do Sangue
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CH ₃ CN	Acetonitrila
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	Tomografia computadorizada
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E _{1/2}	Potencial de redução
EDC	1-Etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
ESI-MS	Espectrometria de Massa de Alta Resolução
ESR	Ressonância Eletrônica de Spin
¹⁸ F	Flúor-18
[¹⁸ F]DiFA	1-(2,2-di-hidroximetil-3-[¹⁸ F]Fluoropropil)-2-nitroimidazol
[¹⁸ F]EF1	2-(2-nitroimidazol-1-il)-N-3-[¹⁸ F]Fluoropropil-acetamida
[¹⁸ F]EF3	2-(2-nitroimidazol-1-il)-N-(3 3,3-[¹⁸ F]Trifluoro-propil)-acetamida
[¹⁸ F]EF5	2-(2-nitro-1 Himidazol-1-il)-N-(2,2,3,3,3-[¹⁸ F]Pentafluoropropil)-acetamida
[¹⁸ F]FAZA	[¹⁸ F]Fluoroazomicina arabinosídeo
[¹⁸ F]FBA	[¹⁸ F]4-Fluorobenzilamina
[¹⁸ F]FBN	[¹⁸ F]fluorobenzonitrila

[¹⁸ F]FBNA	[¹⁸ F]-N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida
[¹⁸ F]FDG	2-desoxi-2-[¹⁸ F]Fluoro-D-glicose
[¹⁸ F]FETA	[¹⁸ F]fluoroetanidazol
[¹⁸ F]FETNIM	[¹⁸ F]Fluoroeritritroimidazol
[¹⁸ F]FMISO	[¹⁸ F]Fluoromisonidazol
[¹⁸ F]FNPFT	2-(2-nitro-imidazol-1-il)-etil ácido 2-fluoropropiônico
[¹⁸ F]FPA	Ácido 2-[¹⁸ F]Fluoropropiônico
[¹⁸ F]NEFA	(N-(2-(2-nitro-1Himidazol-1-yl)etil)-[¹⁸ F]Fluoroacetamida)
[¹⁸ F]NEFT	2-(2-nitroimidazol-1-il)etil)-[¹⁸ F]Fluoroacetato
[¹⁸ F]HX4	[¹⁸ F]3-fluoro-2-(4-((2-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propan-1-ol
[¹⁸ F]RP-170	[¹⁸ F]1-(2-1-(1H-metil)etoxi)-metil-2-nitroimidazol
FSC	Fluxo Sanguíneo Cerebral
g	Grama
GBq	Giga becquerel
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIF-1	Fator de Hipóxia Induzível
HIF-1α	Fator de Hipóxia Induzível, subunidade alfa
HIF-1β	Fator de Hipóxia Induzível, subunidade beta
HRE	Elemento de Resposta à Hipóxia
[¹²³ I]IAZA	1-(1-(5-desoxi-5-[¹²³ I]iodo-α-D-arabinosil)-2-nitroimidazol
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MBq	Mega becquerel
MEV	Mega eletrovolt
mm Hg	Milímetro de Mercúrio
MRI	Imagem por Ressonância Magnética
MRS	Espectroscopia de Ressonância Magnética
MS	Espectroscopia de Massa
NaCl 0,9 %	Solução salina fisiológica
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NHS	N-hidroxissuccinimida
NITTP	1-(2-nitro-10-imidazolil)-2-O-tetra-hidropiranil-3-O-toluenossulfonilpropano-diol

NO ₂	Grupo Nitro
O ₂ ⁻	Superóxido
OTf	Grupo triflato
P	Coeficiente de Partição em Octanol/Água
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
pH	Potencial hidrogeniônico
p.i.	Pós-injeção
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PTSM	Piruvaldeído-bis (N4-metiltiossemicarbazona)
Rf	Fator de retenção
RM	Ressonância Magnética
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Sn ₂	Substituição nucleofílica bimolecular
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fótons Únicos
SPF	Livre de Patógenos Específicos
SUV	Valores de Captação Padronizados
t _{1/2}	meia-vida
T/M	Relação tumor/músculo
T/S	Relação tumor/músculo
[^{99m} Tc]HMPAO	[^{99m} Tc]Hexametilpropileno amino oxima
THF	Tetraidrofurano
TSTU	N,N,N',N-tetrafluoroborato de tetrametilurônio
UV	Espectroscopia Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Câncer	22
3.1.1 Angiogênese	23
3.2 Hipóxia nos tecidos	25
3.2.1 Hipóxia cerebral.....	26
3.2.2 Hipóxia Tumoral.....	26
3.2.3 O Fator de Hipóxia Induzível (HIF-1).....	27
3.3 Métodos de detecção de hipóxia.....	29
3.3.1 Métodos invasivos	30
3.3.1.1 Microelétrodo de oxigênio polarográfico (agulha de Eppendorf)	30
3.3.1.2 Métodos imuno-histoquímicos	30
3.3.2 Métodos não invasivos	31
3.3.2.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET)	31
3.3.2.2 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fótons Únicos (SPECT)	35
3.3.2.3 Ressonância Magnética (RM)	36
3.3.2.4 Ressonância Eletrônica de Spin (ESR)	37
3.3.2.5 Métodos de imagem óptica para medições de hipóxia	38
3.4 Métodos de síntese de radiofármacos fluorados	39
3.4.1 Fluoração eletrofílica.....	40
3.4.2 Fluoração nucleofílica	41
3.5 Radiofármacos derivados de nitroimidazol para imagem de hipóxia	42
3.5.1 Metabolismo do grupo 2-nitroimidazol	44
3.5.2 Derivados de 2-nitroimidazol como radiofármacos de hipóxia.....	46
3.5.2.1 [¹⁸ F]FMISO	46
3.5.2.2 [¹⁸ F]FAZA.....	47
3.5.2.3 [¹⁸ F]EF5, [¹⁸ F]EF3 e [¹⁸ F]EF1	48
3.5.2.4 [¹⁸ F]FETNIM e [¹⁸ F]FETA.....	49

3.5.2.5 [^{18}F]NEFT e [^{18}F]NEFA	50
3.5.2.6 [^{18}F]HX4 e [^{18}F]RP-170	50
3.5.2.6 [^{18}F]DiFA e [^{18}F]-FNPFT	51
3.5.3 Novos radiofármacos de hipóxia com um segundo grupo nitroimidazol	52
3.6 Radiofármacos não relacionados com grupo nitroimidazol para imagem de hipóxia	53
3.6.1 [^{18}F]FDG (2-desoxi-2-[^{18}F]Fluoro-D-glicose)	54
3.6.2 Cu-ATSM	55
3.7 Considerações finais	56
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1 Reagentes e soluções, equipamentos e métodos gerais.....	58
4.2 Radiossíntese do [^{18}F]Fluoroazomicina arabinosídeo ([^{18}F]FAZA) e [^{18}F]Fluoromisonidazol ([^{18}F]FMISO)	59
4.2.1 Protocolo de radiossíntese.....	59
4.2.2 Controle de qualidade do [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO	60
4.3 Síntese do N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il) acetamida [FBNA]	61
4.3.1 Química	61
4.3.1.1 Síntese do material de partida, ácido 2-nitroimidazol acético	61
4.3.1.2 Síntese do precursor, 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato	62
4.3.1.3 Síntese do composto padrão, N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida [^{19}F]FBNA	63
4.3.2 Radioquímica	64
4.3.2.1 Radiossíntese do [^{18}F]4-Fluorobenzilamina ([^{18}F]FBA)	64
4.3.2.2 Radiossíntese do [^{18}F]N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida ([^{18}F]FBNA).....	65
4.3.3 Controle de qualidade	66
4.3.4 Análise da estabilidade <i>in vitro</i> do [^{18}F]FBNA em solução salina e soro	66
4.3.5 Determinação do coeficiente de partição dos radiofármacos (P e $\log P$).....	67
4.4 Ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	68
4.4.1 Quantificação dos radiometabólitos do [^{18}F]FBNA e sua distribuição no sangue	68
4.4.2 Modelo de câncer gástrico (AGS e MKN45)	68
4.4.2.1 Ensaios <i>in vitro</i>	68
4.4.2.2 Avaliação da captação celular do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA em normóxia e hipóxia ...	69

4.4.2.3 Ensaio <i>in vivo</i>	70
4.4.2.4 Modelo de camundongos portadores de tumor.....	70
4.4.2.5 Imagem μ PET.....	71
4.4.2.6 Autorradiografia dos tumores injetados com [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA.....	71
4.4.2.7 Estudos de biodistribuição <i>ex vivo</i>	72
5 RESULTADOS	73
5.1 [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO.....	73
5.2 Síntese do composto N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida [FBNA].....	76
5.2.1 Química.....	76
5.2.1.1 Síntese do ácido 2-nitroimidazol acético	76
5.2.1.2 Síntese do 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (2)	77
5.2.1.3 Síntese do [^{19}F]FBNA	78
5.2.2 Radioquímica	81
5.2.2.1 Radiossíntese do [^{18}F]4-Fluorobenzilamine [^{18}F]FBA	81
5.2.2.2 Radiossíntese do [^{18}F]-N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida [^{18}F]FBNA	85
5.2.3 Análise da estabilidade do [^{18}F]FBNA em solução salina e soro.....	87
5.2.4 Determinação do coeficiente de partição (P e log P)	91
5.3 Avaliação Biológica	92
5.3.1 Quantificação da distribuição e dos radiometabólitos do [^{18}F]FBNA no sangue.....	92
5.3.2 Estudo biológicos com os modelos celulares de câncer gástrico, AGS e MKN45	95
5.3.2.1 Avaliação da captação celular do [^{18}F]FBNA nas linhagens celulares de câncer gástrico, AGS e MKN45 em condições hipóxia.....	95
5.3.2.2 Avaliação <i>in vivo</i> da captação de [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA por imagem μ PET	98
5.3.2.3 Autorradiografia dos tumores injetados com [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA.....	102
5.3.2.4 Avaliação <i>ex vivo</i> do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA por biodistribuição	104
6 DISCUSSÃO	108
7 CONCLUSÕES	124
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Projeto N.154/15/CEUA-IPEN/USP)	148

ANEXO B – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) do Ácido 2-nitroimidazol acético (1) em CD_3OD	149
ANEXO C – Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) do Ácido 2-nitroimidazol acético (1)	150
ANEXO D – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) do 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (2) em CD_3OD	151
ANEXO E – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN) do 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (2) em CD_3OD	152
ANEXO F – Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (2)	153
ANEXO G – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) [^{19}F]FBNA (N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida) (3) em CD_3OD	154
ANEXO H – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN) do [^{19}F]FBNA (N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida) (3) em CD_3OD	155
ANEXO I – Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) [^{19}F]FBNA (N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida) (3)	156

1 INTRODUÇÃO

O Câncer é um processo degenerativo crônico que culmina na perda dos mecanismos que regulam o ciclo e/morte celular. Além do mais, é considerado um problema de saúde pública e, estima-se que o câncer seja a principal causa de morte e uma barreira à expectativa de vida em todos os países do mundo no século XXI (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte por doença e a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de aproximadamente 623 mil novos casos de câncer em 2020 (INCA, 2020).

A hipóxia é uma condição patológica que ocorre quando o suprimento de oxigênio não cobre adequadamente a demanda metabólica celular. Atualmente, sabe-se que até 60% dos tumores sólidos em estágios avançados apresentam áreas com oxigenação reduzida (hipóxia) ou suprimento de oxigênio quase ausente (anóxia) (LV *et al.*, 2017). A detecção deste fenômeno em tumores é de máxima relevância clínica pois o aumento da agressividade do tumor, da probabilidade de propagação metastática, da taxa de recorrência e o pior prognóstico estão todos associados à presença de hipóxia no microambiente tumoral (Dhani *et al.*, 2015).

A capacidade de identificar áreas de hipóxia tem implicações importantes na oncologia. Por um lado, possibilita a estratificação de pacientes para informações prognósticas mais precisas. Por outro lado, a identificação de tumores hipóxicos permite ajustar a dose de irradiação, permitindo um tratamento mais personalizado com terapias direcionadas (BUSSINK *et al.*, 2003).

Diferentes métodos estão em uso para a detecção e medição da hipóxia tumoral que podem ser categorizados como técnicas invasivas e técnicas não invasivas, como a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) usando radiofármacos principalmente marcados com Flúor-18 (^{18}F) (VAUPEL e MAYER, 2007; KRHON *et al.*, 2008). O ^{18}F é um radionuclídeo emissor β^+ que apresenta as propriedades físicas e nucleares mais favoráveis para a imagem PET: 97% de decaimento β^+ , baixa energia máxima do pósitron emitido (635 keV) e meia-vida relativamente curta de 109,7 min (Jacobson *et al.*, 2015). A baixa energia dos pósitrons resulta em uma penetração reduzida dos pósitrons no tecido

(aproximadamente 1 mm), o que favorece a resolução da imagem PET com menor dose de radiação para o paciente (RAHMIM e ZAIDI, 2008). Sua meia-vida ($t_{1/2}$) permite um maior tempo de análise *in vivo* em comparação com outros radionuclídeos β^+ como o carbono-11 (20 minutos). Dentre as modalidades de imagem para avaliação de hipóxia, PET é uma das mais amplamente investigadas com base nas diversas vantagens que ela oferece: (a) uma ampla variedade de radiofármacos; (b) boa resolução intrínseca (5 mm); (c) representação tridimensional do tumor (3D); (d) possibilidade de quantificação da área hipóxica; (e) facilidade de administração e manejo dos pacientes, e (f) facilidade de repetição (LOPCI *et al.*, 2014).

Entre os vários radiofármacos para o imageamento PET de hipóxia tumoral, os que contêm o grupo funcional 2-Nitroimidazol em sua estrutura são os que têm as características mais favoráveis para serem usados na identificação das áreas de hipóxia tumoral (MCCLELLAND *et al.*, 1987; WARDMAN *et al.*, 1990; TAKASAWA *et al.*, 2008). O [^{18}F]Fluoromisonidazol ([^{18}F]FMISO) foi um dos primeiros radiotraçadores PET derivados de 2-Nitroimidazol usados clinicamente (GRIERSON *et al.*, 1989). No entanto, o [^{18}F]FMISO acumula-se muito lentamente em tecido hipóxico e a sua eliminação lenta resulta em imagens diagnósticas com baixo contraste. Além disso, a sua eliminação predominantemente hepática resulta em uma alta dose de radiação liberada no fígado (PIERT, 2009). Para superar essas limitações, uma segunda geração de radiofármacos tem sido desenvolvida; entre eles o [^{18}F]Fluoroazomicina arabinosídeo ([^{18}F]FAZA) foi o radiofármaco que apresentou melhores resultados em estudos pré-clínicos e clínicos baseados em seu acúmulo seletivo em células tumorais hipóxicas (SORGER *et al.*, 2003). Apesar disso, a reprodutibilidade dos dados de PET para [^{18}F]FAZA ainda é muito variável, existe uma falta na correlação da captação desse radiofármaco em todos os tumores avaliados e, as evidências da sua superioridade em relação ao ([^{18}F]FMISO na radioterapia guiada por imagem de hipóxia ainda é limitada. Além disso, é necessário aguardar 3 horas após a injeção do radiofármaco para obter imagens ótimas em modelos pré-clínicos e em pacientes (POSTEMA *et al.*, 2009).

Até o momento, nenhum radiofármaco PET para hipóxia foi amplamente adotado para a prática clínica de rotina devido a essas limitações

(NAKATA *et al.*, 2019). Diante desta necessidade, nos propusemos a desenvolver um novo radiofármaco derivado do 2-Nitroimidazol para imagem hipóxica, [^{18}F]-N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida (**[^{18}F]FBNA**) e avaliar seu comportamento biológico em comparação com [^{18}F]FAZA em camundongos portadores de tumor. Esperamos no futuro poder disponibilizar à sociedade um potencial radiofármaco com características biológicas melhores que as reportadas para os radiofármacos utilizados em ensaios clínicos atualmente, contribuindo para um melhor diagnóstico da hipóxia tumoral que auxilie na gestão terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar um novo radiofármaco radiomarcado com Fluór-18, [^{18}F]-N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida ([^{18}F]FBNA), para a detecção de áreas de hipóxia no microambiente tumoral através de imagem molecular PET.

2.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar e caracterizar química e estruturalmente os intermediários sintéticos e os produtos finais padrão do [^{19}F]FBNA, utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massa (EM).
2. Determinar as condições ótimas de radiomarcagem do composto [^{18}F]FBNA.
3. Realizar o controle de qualidade do [^{18}F]FBNA.
4. Estudar a estabilidade do [^{18}F]FBNA em solução salina fisiológica (NaCl 0,9 %) e em soro de camundongo.
5. Determinar a lipofilicidade do [^{18}F]FBNA.
6. Quantificar os radiometabólitos do [^{18}F]FBNA e avaliar sua distribuição no sangue.
7. Avaliar e comparar a captação *in vitro* do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA em linhagens celulares de câncer humano em condições de normóxia e hipóxia.
8. Avaliar e comparar a captação *in vivo* do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA por imagem PET e, através de estudos de biodistribuição *ex-vivo* em um modelo tumoral de câncer gástrico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública em países com altas taxas de desenvolvimento (BRAY *et al.*, 2018). O câncer é geralmente definido como uma série de doenças de etiologia complexa que estão associadas ao envelhecimento celular e, que provêm da transformação maligna das células do corpo em que se originam (VISVADER, 2011). Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e colorretal entre os mais incidentes; entretanto, ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2020).

Considerando a fonte de origem do dano, o qual ocorre no ácido desoxirribonucleico (DNA), existem basicamente dois tipos de fatores: 1) fatores endógenos, que são provenientes de erros produzidos pela maquinaria replicativa durante o processo de cópia; 2) fatores exógenos, que são todos causados por agentes externos: como radiação ultravioleta ou ionizante; agentes químicos (que causam alquilação, desaminação, reação com radicais livres etc.) e agentes biológicos que interferem na replicação ou que alteram o genoma seja por inserção, edição ou exclusão (por exemplo, vírus) (NELSON *et al.*, 2008; LOEB e HARRIS, 2013).

O processo tumorigênico começa quando as mutações que afetam os genes envolvidos na edição de erros, apoptose, sinalização celular e / ou genes envolvidos no ciclo celular eventualmente progridem, irreversivelmente. O dano nesses genes vitais causa, inicialmente, crescimento e diferenciação atípicos que podem ser vistos, molecular e fenotipicamente, como simples alterações histológicas (displasia com ou sem hiperplasia associada) ou como tumores benignos. Esses tipos de tumores não malignos não crescem incontrolavelmente além da região onde são gerados e não invadem outros tecidos, embora em

alguns casos possam causar compressão de outros órgãos e, às vezes, sejam um indicador de um processo de malignização em andamento (VISSCHER *et al.*, 2014; IJSPEERT *et al.*, 2015).

Embora muitos tumores benignos não progridam para um tumor maligno ao longo da vida dos organismos, em alguns casos, o resultado do acúmulo de mais mutações com divisão parcialmente descontrolada causa um efeito aditivo capaz de levar à transformação maligna. Este efeito aditivo, por sua vez, pode levar a uma incompatibilidade na expressão gênica, no epigenoma, no equilíbrio das isoformas normais e / ou no número normal de cópias ou repetições de uma região do DNA (NIX *et al.*, 2018). Considera-se que um tumor benigno progrediu para maligno quando a célula tumoral adquiriu uma série de propriedades biológicas que se manifestam clinicamente. As propriedades biológicas essenciais de uma célula maligna são: proliferação descontrolada, capacidade invasiva sobre outros tecidos e órgãos anexos e distais, supressão de apoptose, evasão do sistema imunológico e imortalização (TABASSUM e POLYAK, 2015; YOUSEF e CARMEN, 2019).

3.1.1 Angiogênese

Outro passo essencial para a progressão do tumor é a **angiogênese**. Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos. Sem uma neovascularização adequada, os tumores não conseguem crescer além de alguns milímetros, de modo que as células tumorais devem adquirir a capacidade de promover o processo angiogênico. A angiogênese é realizada por células progenitoras, que são recrutadas e diferenciadas para células endoteliais em resposta a estímulos pró-angiogênicos. O estímulo pró-angiogênico é principalmente promovido pelo fator de crescimento endotelial vascular, embora várias proteínas com funções pró-angiogênicas tenham sido caracterizadas como importantes na progressão do tumor (fator de crescimento derivado de plaquetas, fator induzível por hipóxia, fator de crescimento de tecido conjuntivo, etc.) (FOLKMAN e KLAGSBRUN, 2017; RAMJIAWAN *et al.*, 2017). Existem também várias proteínas capazes de produzir o processo oposto e são comumente conhecidas como antiangiogênicas. Entre eles, encontramos trombospondina-1. O processo angiogênico, portanto, depende do equilíbrio entre fatores pró-

angiogênicos e antiangiogênicos, bem como outras quimiocinas que permitem o recrutamento de células e pericitos endoteliais, e sua diferenciação em vasos sanguíneos no nicho tumoral (MISHRA, 2016).

Nos tecidos tumorais, esse equilíbrio é perdido, e os vasos sanguíneos do microambiente tumoral possuem frequentemente uma arquitetura caótica, com pequeno calibre e com vazamentos. Esta arquitetura dificulta o aporte de oxigênio e nutrientes para as células tumorais. A condição de hipóxia, resultado da baixa oferta de oxigênio, regula a expressão de diversos genes sob o controle transcricional do fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α). Os genes metabólicos aumentados pelo HIF-1 α em resposta à hipóxia incluem muitos dos envolvidos na captação da glicose como o GLUT1. A hipóxia reduz a fosforilação oxidativa e favorece a glicólise, impedindo que o piruvato entre no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), via regulação positiva da piruvato desidrogenase quinase (PDK1) e inibição da piruvato desidrogenase (PDH). Como consequência, o microambiente tumoral hipóxico é ácido devido ao aumento da produção de ácidos metabólicos, CO₂ e ácido lático (da glicólise). As mudanças nos perfis metabólicos das células tumorais hipóxicas favorecem a sobrevivência no microambiente tumoral na falta de oxigênio e nutrientes. Nos tumores a principal causa da hipóxia é a isquemia, que ocorre em função do rápido crescimento da massa tumoral e diminuição ou obstrução dos vasos sanguíneos que irrigam o interior dos tumores. Nestes casos, além da diminuição da concentração de oxigênio, há ainda uma diminuição de fornecimento de nutrientes, hormônios, fatores de crescimento e dissipação de produtos transportados pelo sangue (GUO *et al.*, 2018).

As células tumorais malignas adquirem durante a progressão tumoral, a capacidade de modificar o estroma circundante, transformando-o em um estroma patológico que cresce próximo ao tumor e que, por sua vez, é capaz de modular as próprias células tumorais. O conjunto de tumor mais estroma patológico e sua vascularização é conhecido como nicho tumoral. O nicho tumoral ao atingir um determinado tamanho, e em resposta à estimulação fisiológica da hipóxia que ocorre dentro dele, aumenta a produção de fatores proangiogênicos e limita a produção de fatores antiangiogênicos. Essas alterações levam ao recrutamento e à diferenciação de células endoteliais circulantes e pericitos, formando uma neovascularização capaz de fornecer nutrientes e oxigênio ao

tumor e, assim, permitir seu crescimento, além de favorecer a disseminação metastática das células tumorais (MCALLISTER e WEINBERG, 2014; SEMENZA, 2015).

O último passo da progressão normal do tumor é a geração de metástases. O processo metastático depende da capacidade das células tumorais de produzir novos focos tumorais em órgãos distantes. A metástase primeiro exige que as células tumorais adquiram uma maior capacidade de movimento. Geralmente, a célula tumoral se move em favor de um gradiente de quimiocinas, fatores de crescimento que promovem sua proliferação. O aparecimento de metástases também requer que as células tumorais adquiram capacidade de extravasamento, para que sejam introduzidas na corrente sanguínea (células tumorais circulantes ou CTCs), e possam viajar através dela até os órgãos produtores de quimiocinas (MCALLISTER e WEINBERG, 2014; ZEESHAN, R.; MUTAHIR, 2017). O crescimento descontrolado de células tumorais causa danos aos tecidos e órgãos saudáveis por vários mecanismos: compressão, degradação da matriz extracelular promovida por proteases tumorais, inflamação pela liberação de citocinas e recrutamento de células da série branca, citotoxicidade pela destruição de células saudáveis e tumores que liberam seu conteúdo intracelular etc. A progressão do tumor termina com a destruição de tecidos e órgãos, que causa falência de órgãos, às vezes múltiplos, e finalmente morte (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; STEEG, 2016).

3.2 Hipóxia nos tecidos

A hipóxia define um estado metabólico no qual as concentrações de oxigênio estão entre os níveis fisiológicos normais de oxigenação (normóxia) e a completa falta de oxigênio (anóxia). Fala-se em hipóxia generalizada quando todo o organismo é privado do suprimento adequado de oxigênio, e hipóxia tecidual quando é uma região do corpo. Além disso, é conveniente diferenciar entre hipóxia e isquemia, uma vez que às vezes são intercambiáveis. A isquemia é chamada de estresse celular causado pela diminuição temporária ou permanente do suprimento sanguíneo para um órgão ou tecido, uma condição que pode ou não causar hipóxia. Existem diferentes patologias relacionadas à hipóxia, dentre elas: anemias, hemorragias e pneumonia, além de doenças pulmonares,

oncológicas, cardiovasculares e cerebrovasculares, diabetes, infecções, transplante de órgãos, cicatrização de feridas e outras patologias mucosas e cutâneas (BENSAAD e HARRIS, 2014).

3.2.1 Hipóxia cerebral

O órgão mais sensível à hipóxia é o cérebro que consome 20-25% das necessidades totais de oxigênio do corpo e 7-20% de glicose. O cérebro gasta entre 3 e 33 mL de oxigênio por 100 g de tecido cerebral por minuto, o que equivale a 40–50 mL por minuto para todo o cérebro (STILES e JERNIGAN, 2010). Hipóxia cerebral refere-se a um suprimento reduzido de oxigênio ao cérebro devido a causas extracerebrais ou intracerebrais. Entre os extracerebrais estão as hipoxias respiratórias, sejam pré-alveolares (diminuição da concentração de oxigênio no ar inspirado, vias aéreas, etc.) ou alveolares. A hipóxia pode depender do transporte inadequado de oxigênio através do sangue (anemia, envenenamento por monóxido de carbono, choque, insuficiência cardíaca etc.) ou pode resultar de uma obstrução dos grandes vasos cervicais. Entre as causas cerebrais, destacam-se tumores, lesões cranianas, embolia e hemorragia cerebral (PEARCE, 2018).

3.2.2 Hipóxia Tumoral

O microambiente tumoral compreende o fluxo sanguíneo, a microcirculação, o suprimento de oxigênio e nutrientes, o pH residual e o estado bioenergético e metabólico de um tumor. Esse microambiente influencia as características biológicas dos tumores, como a taxa de proliferação celular, a capacidade de reparar a lesão letal ou potencialmente letal, a indução de apoptose ou o potencial de invasão metastática e angiogênica, bem como a expressão de genes responsáveis de resistência a drogas. Existem estudos que mostram que no mesmo estadiamento e tamanho do tumor, pacientes com níveis elevados de hipóxia intratumoral têm pior controle de doença e sobrevida do que pacientes com tumores melhor oxigenados (QUARTUCCIO e ASSELIN, 2018).

A hipóxia tumoral ocorre quando o tamanho do tumor excede a capacidade da microcirculação de fornecer o oxigênio necessário às células tumorais. Depende de fatores como o tamanho do tumor, seu tipo histológico, sua condição e a extensão da necrose e vários estudos mostram que o grau de

hipóxia é maior na área do tumor do que nos tecidos adjacentes normais (CLARKE e PALLISTER, 2005; VAUPEL e MAYER, 2007). Atualmente, sabe-se que até 60% dos tumores sólidos em estágios avançados apresentam áreas com oxigenação reduzida (hipóxia) ou suprimento de oxigênio quase ausente (anóxia) (LV *et al.*, 2017).

A relação entre hipóxia tumoral e evolução ou gravidade do processo neoplásico pode ser explicada por pelo menos três hipóteses: 1) A hipóxia pode induzir alterações na expressão de proteínas tumorais dependentes de oxigênio, estimulando a angiogênese e aumentando o potencial de crescimento do tumor e metástase; 2) A hipóxia impede a formação de espécies reativas do oxigênio durante a radioterapia, o que reduz os danos ao DNA das células tumorais e contribui para a resistência à radioterapia e; 3) A hipóxia pode causar crescimento acelerado de células tumorais resistentes à apoptose, dificultando a cura e o controle da doença (CLARKE e PALLISTER, 2005; CHALLAPALLI *et al.*, 2017). Por exemplo, o valor típico da faixa de pO_2 no tecido normal é de 20 a 80 Milímetro de Mercúrio (mm Hg), enquanto em alguns tumores sólidos aparecem valores muito mais baixos (<10 mm Hg) nos quais o ponto de resistência à radiação ionizante e à quimioterapia começa a se desenvolver (BEJOT, 2010).

O grau de hipóxia tumoral é um fator determinante da resposta ao tratamento, sobrevida sem recidiva e prognóstico geral, o que é independente da modalidade de tratamento utilizada no câncer dos pacientes (TATUM *et al.*, 2006; LEE e SCOTT, 2007). A hipóxia ativa o *fator de hipóxia induzível* (HIF-1, em inglês: Hypoxia Inducible Factor) e isso, por sua vez, inicia toda a família de genes angiogênicos, aumentando a densidade e a permeabilidade vascular e, portanto, o crescimento e a disseminação do tumor (QUINTERO *et al.*, 2004). O fator de indução da hipóxia, HIF-1, é o maior regulador da adaptação do tumor à hipóxia, induzindo a expressão de muitos genes que permitem que as células sobrevivam sob essas condições.

3.2.3 O Fator de Hipóxia Induzível (HIF-1)

O HIF-1 é um heterodímero que consiste em três subunidades α , HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α , além de um subconjunto β (WANG e SEMENZA, 1995). Há evidências crescentes de que o comportamento agressivo do tumor mediado por

hipóxia e resistência à terapia é controlada pelo HIF-1. O principal mecanismo da percepção celular de oxigênio parece ser mediado pela proteína HIF-1 α . Na presença de oxigênio suficiente, o HIF-1 α é hidroxilado nos resíduos de prolina por meio das enzimas prolil hidroxilase 1-3. Essas enzimas usam oxigênio, ferro e α -cetoglutarato (do ciclo de Krebs) como substratos, depois se ligam covalentemente à ubiquitina e são degradadas por proteassomas. No entanto, em condições de hipóxia, a baixa concentração de oxigênio impede a degradação do HIF-1 α , o que leva à seu acúmulo rapidamente. A proteína HIF-1 α passa para o núcleo, onde forma um heterodímero (HIF-1) com HIF-1 β , formando um complexo que se liga ao DNA em uma sequência conhecida como elemento de resposta à hipóxia (HRE, em inglês: Hypoxia Response Element). O HIF-1 é reconhecido por mais de 100 locais nos cromossomos que levam à expressão de muitas outras proteínas de resposta à hipóxia. Essas proteínas podem promover a expressão de genes relacionados ao crescimento e sobrevivência de células tumorais hipóxicas através de eventos moleculares como desregulação da glicólise, angiogênese e mutação p53, que permite a adaptação das células tumorais à hipóxia (POWIS e KIRKPATRICK, 2004; ZENG *et al.*, 2017). A proteína HIF-1 é superexpressa em vários tipos de câncer e em metástases regionais e distantes, embora não apareça em tumores benignos não invasivos. O HIF-1 ajuda a prevenir a apoptose e a morte ao expressar genes que induzem mutações. Ao mesmo tempo, a hipóxia induz a expressão de genes envolvidos em metástases e invasões. Essa cadeia de sobrevivência está ligada a alterações malignas do tumor, portanto o HIF-1 é um excelente marcador endógeno para tumores malignos e para hipóxia (LEE e SCOTT, 2007). Existem vários modelos que envolvem moléculas diferentes, como sensores de oxigênio. Entre eles, um tipo especial de hidroxilases, prolil hidroxilases contendo Fe (II) em seu centro catalítico, que é oxidado em Fe (III) pela interação do oxigênio molecular durante a reação de hidroxilação (Figura 1) (Kizaka e Konse, 2009). Um segundo tipo de regulação é atribuído a espécies reativas de oxigênio (ROS, em inglês: Reactive Oxygen Species), principalmente o radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), moléculas derivadas do oxigênio com grande capacidade de reação devido à sua alta instabilidade química. Eles são gerados durante a redução completa do oxigênio molecular na água, na qual quatro elétrons são

incorporados ao oxigênio em vários estágios, gerando radicais livres como moléculas intermediárias (Figura 1). Durante os períodos de hipóxia, a baixa concentração de oxigênio impede que o acúmulo de HIF-1 α se degrade e se acumule rapidamente. Por outro lado, concentrações fisiológicas de espécies reativas de oxigênio também podem oxidar prolil hidroxilases e promover o acúmulo de HIF-1 α (MANSFIELD *et al.*, 2005). As células que não possuem HIF-1 α e estão expostas a um ambiente hipóxico aumentam rapidamente seu conteúdo dessas espécies, levando à morte celular.

Figura 1 - Mecanismo de ação do HIF-1 α e formação de ROS.

Fonte: KIZAKA E KONSE, 2009.

3.3 Métodos de detecção de hipóxia

Existem alguns requisitos que um marcador precisa atender para ser ideal na detecção de tumores hipóxicos: 1) Deve ser específico para hipóxia e distinguir entre normoxia, hipóxia e anóxia ou necrose; 2) Deve diferenciar entre hipóxia aguda ou crônica; 3) Deve ser simples, não tóxico, rápido, fácil de preparar e reproduzível; 4) Deve ser lipofílico o suficiente para proporcionar uma biodistribuição homogênea em todos os tecidos, inclusive o tumor, mas por sua vez hidrofílico ter uma eliminação rápida, o que permite uma maior relação

marcadora entre o tumor e o tecido normal; 5) Deve apresentar baixa degradação in vivo, originando metabólitos inespecíficos e / ou ligados a tecidos inespecíficos, de modo que apenas mecanismos de retenção específicos de oxigênio determinem a quantidade de marcador temporariamente retido; 6) Deve refletir mais pressão parcial de oxigênio (pO_2) do que pressão arterial ou alguma consequência bioquímica; 7) Deve ser sensível aos níveis de pO_2 relevantes para a terapia tumoral; 8) Deve oferecer a capacidade de ser quantificado (MEES *et al.*, 2009). Infelizmente, nenhum dos marcadores disponíveis atualmente atende a todos esses requisitos (NAKATA *et al.*, 2019). Isso levou ao desenvolvimento de uma variedade de métodos invasivos e não invasivos para medir a oxigenação do tumor os quais serão descritos a seguir.

3.3.1 Métodos invasivos

3.3.1.1 Microeletrodo de oxigênio polarográfico (agulha de Eppendorf)

O uso de eletrodos sensíveis a oxigênio que permite a medição da pO_2 tem sido considerado o método de referência padrão para a avaliação do grau de hipóxia nos tecidos. É determinado com um microeletrodo polarográfico de oxigênio, uma agulha muito fina de 300 μm que é inserida no tumor e gera uma corrente de ionização que fornece uma concentração estimada de oxigênio no local de inserção. As medidas realizadas de acordo com esse método estão em boa correlação com os testes radiobiológicos de hipóxia, permitindo prever o potencial de metástases nos tumores (HOCKEL *et al.*, 1993; ZIMNY *et al.*, 2006). No entanto, esse método é invasivo e tecnicamente exigente, adequado apenas para tumores acessíveis, os resultados dependem do operador e não está mais disponível comercialmente (CHALLAPALLI *et al.*, 2017).

3.3.1.2 Métodos imuno-histoquímicos

Esses métodos são usados para detectar e quantificar hipóxia em biópsias de pacientes. Eles são baseados no uso de um anticorpo específico ligado a compostos que podem sofrer redução no meio biológico do tipo nitroimidazol (por exemplo, pimonidazol, Figura 2), que são administrados antes da biópsia. Este método permite avaliar se as áreas hipóxicas correspondem à necrose ou células viáveis. As principais desvantagens dessa técnica são a

invasividade, a limitação do tamanho da amostra e a incapacidade de realizar medições repetidas em um paciente para monitorar alterações na oxigenação após terapias (CHITNENI *et al.* 2011). Atualmente, o pimonidazol como método invasivo é considerado o marcador exógeno padrão da hipóxia, um indicador da hipóxia crônica que permite medir valores de pO_2 abaixo de 10 mmHg (KIZAKA *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2016).

Figura 2 – Estrutura química do Pimodinazol

Fonte: Autor da tese

3.3.2 Métodos não invasivos

Existem outros métodos não invasivos para detectar hipóxia, como tomografia por emissão de pósitrons (PET, em inglês: Positron Emission Tomography), tomografia computadorizada por emissão de fótons únicos (SPECT, em inglês: Single-Photon Emission Computed Tomography), espectroscopia de ressonância magnética e a imagem por ressonância magnética (MRS / MRI, em inglês: Magnetic Resonance Spectroscopy/Magnetic Resonance Imaging). Os métodos mais atraentes para medidas repetidas e exaustivas da hipóxia tumoral na clínica são PET e MRI (MINN *et al.*, 2008; CHALLAPALLI *et al.*, 2017).

3.3.2.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET)

A tomografia por emissão de pósitrons é uma técnica de diagnóstico não invasiva e de imagem *in vivo* capaz de medir a atividade metabólica do corpo humano. Essa técnica baseia-se na detecção e análise da distribuição tridimensional que adota dentro do corpo um radiofármaco de meia-vida curta, administrado através de uma injeção intravenosa. A imagem é obtida graças ao fato dos tomógrafos serem capazes de detectar os fótons gama emitidos pelo radiofármaco. Esses fótons gama de 511 Kev são o produto de uma aniquilação

entre um pósitron emitido pelo radiofármaco e um elétron cortical das moléculas do corpo do paciente, essa aniquilação resulta na emissão de dois fótons (Figura 3). Para que esses fótons acabem moldando a imagem, eles devem ser detectados simultaneamente em uma janela de tempo adequada (nanossegundos), devem vir em sentidos opostos e sua energia deve exceder um limite mínimo que atesta que não sofreu dispersões significativas de energia a caminho dos detectores. Os detectores de um tomógrafo PET estão dispostos em um anel ao redor do paciente e, graças ao fato de detectar simultaneamente os fótons gerados em cada aniquilação, permitem a formação da imagem. Para obter a imagem, esses fótons detectados são convertidos em sinais elétricos. Esta informação é posteriormente submetida a processos de filtragem e reconstrução, graças aos quais a imagem é obtida (SHOKEEN *et al.*, 2009). Diferentemente da tomografia convencional, na qual são obtidas somente imagens anatômicas de órgãos internos, a PET também permite o estudo de funções fisiológicas básicas como fluxo sanguíneo, transporte de membrana, farmacocinética de medicamentos e interações ligante-receptor em humanos e animais experimentais (FONTI *et al.*; 2019). Usando esta técnica, substratos naturais, gases, análogos de substratos e fármacos podem ser marcados com radioisótopos emissores de pósitrons (β^+) que são usados na concentração picomolar para identificar os tecidos de interesse.

Figura 3 - Esquema da imagem com tomografia por emissão de pósitrons (PET). Um pósitron e um elétron aniquilam-se produzindo dois fótons 511 keV que viajam em direções opostas **(A)**. O fóton de 511 keV registrado pelo detector circular de raios gama na câmara PET **(B)** e a imagem sendo reconstruída **(C)**.

Fonte: Adaptada, SHOKEEN *et al.*, 2009

O PET é um sistema de imagem altamente sensível devido à sua capacidade de detectar e registrar uma porcentagem maior de eventos emitidos em comparação com o SPECT. A sensibilidade da PET implica uma qualidade de imagem aprimorada, a possibilidade de realizar varreduras mais curtas e múltiplas de um paciente em diferentes campos de visão em um tempo razoável e uma capacidade aprimorada de estudar processos biológicos dinâmicos (RAHMIM e ZAIDI, 2008).

A fusão da Tomografia por Emissão de Pósitrons/Tomografia computadorizada (PET/CT) melhorou notavelmente os resultados de imagem e atualmente é amplamente utilizada em oncologia para: (1) identificar o (s) local (is) do tumor primário e metástase; (2) o estadiamento do câncer; (3) identificar qualquer doença residual após o tratamento; (4) detectar recorrências; (5) medir a resposta do tumor à terapia e; (6) orientar a terapia de radiação (Vallabhajosula, 2007). Portanto, a imagem PET / CT é um sistema poderoso para detectar hipóxia

nos tumores e monitorar a terapia anticâncer em comparação com outros métodos não invasivos.

3.3.2.1.1 Emissores de pósitrons. Flúor-18 [^{18}F]

A emissão de pósitrons resulta do decaimento radioativo de um nuclídeo rico em prótons. É conhecido como decaimento beta-plus (β^+), onde um próton (p) é convertido em nêutron (n), um pósitron (e^+) e um neutrino (ν) dentro do núcleo (Figura 4A). O núcleo filho tem o número de massa do núcleo pai, e o número atômico menos uma unidade (Figura 4B). O decaimento β^+ pode ocorrer apenas se a massa do núcleo pai for pelo menos duas massas de elétrons mais altas que a massa do núcleo filho (Lieser, 2001).

Figura 4 - Decaimento beta-plus (β^+). Esquema geral de decaimento **(A)**. Esquema de exemplo: decaimento (β^+) do Flúor-18 [^{18}F] **(B)**.

Fonte: Autor da tese.

As características dos emissores de pósitrons mais utilizados estão representadas na Tabela 1 (Conti e Eriksson, 2016).

Tabela 1 - Radioisótopos emissores de pósitrons

Radionuclídeo	Meia-vida (T $\frac{1}{2}$)	Decaimento (β^+)	Energia máx (MEV) - β^+	Alcance máx (mm) - β^+
^{15}O	2 min	99,9%	1,732	8,4
^{13}N	10 min	99,8%	1,199	5,5
^{11}C	20,4 min	99,8%	0,960	4,2
^{18}F	110 min	96,9%	0,634	2,4
^{64}Cu	12,7 h	17,5%	0,653	2,5
^{89}Zr	78,4 h	22,7%	0,902	3,8

Fonte: Adaptada, CONTI e ERIKSSON, 2016

Os emissores de pósitrons de meia vida curta, como ^{11}C , ^{13}N e ^{15}O são os marcadores mais utilizados, já que esses elementos são constituintes de

biomoléculas e sua incorporação em fármacos permitiria manter as mesmas propriedades físico-químicas e bioquímicas do composto “não radiomarcado”; evitando assim, modificações indesejáveis no comportamento do fármaco (SAHA, 2010). Porém, a utilização de radiofármacos que possuam esses radionuclídeos na formulação é limitada a locais próximos onde são produzidos, por possuírem o tempo de meia vida muito curto para sua distribuição e comercialização.

Atualmente, o radionuclídeo mais utilizado para marcar moléculas para hipóxia utilizado usando PET/CT é o **Flúor-18**. Seu tempo de meia vida é relativamente longo (110 minutos), se comparado aos demais radionuclídeos PET (^{11}C (20,4 min) e ^{15}O (2 min)). Isso permite um tempo maior de síntese química de marcação de moléculas, além de permitir investigações de processos biológicos com duração maior que 100 minutos sejam realizadas. O ^{18}F apresenta pósitrons de baixa energia (β máximo de 0,634 MeV) com curto alcance nos tecidos (alcance máximo 2,4 mm), o que gera imagens com maior resolução. Ele pode ser sintetizado com alta atividade molar, produzido em grandes quantidades em ciclotron e apresenta síntese com alto rendimento na marcação dos traçadores (VALLABHAJOSULA, 2017; STIEB *et al.*, 2018).

Apesar do ^{18}F não ser constituinte do organismo vivo, ele é capaz de incorporar as moléculas orgânicas como um substituinte para o hidrogênio, hidroxila ou algum outro grupo funcional. Mais uma vantagem do ^{18}F na marcação de moléculas biológicas é o bloqueio dos sítios metabólicos da molécula. A molécula radiomarcada funciona no organismo como uma molécula normal até certo ponto de sua via metabólica, onde as reações de metabolização são interrompidas e ficam acumuladas no organismo, permitindo uma melhor detecção pela PET (KÄMÄRÄINEN, 2007).

3.3.2.2 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fótons Únicos (SPECT)

É uma técnica de tomografia que se baseia na detecção de raios gama. As imagens obtidas são bidimensionais, mas muitas imagens tiradas de diferentes posições ao redor do paciente podem ser combinadas para obter uma imagem tridimensional. O SPECT detecta raios gama produzidos pelo decaimento de isótopos radioativos como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (tecnécio metaestável) ou ^{123}I . Esses isótopos

são introduzidos no corpo humano como parte de moléculas biologicamente ativas. O procedimento é semelhante ao PET, mas no SPECT é o isótopo que produz diretamente o raio gama, enquanto no PET o isótopo produz um pósitron que é então aniquilado com um elétron para produzir os dois raios gama. Esses dois raios gama partem em direções opostas e sua detecção simultânea permite que o isótopo seja localizado com mais precisão do que no SPECT (BUCK *et al.*, 2008). Na década de 1990, Parliament *et al.* descreveram uma síntese de um novo análogo do misonidazol, 1-(1-(5-desoxi-5-[^{123}I]iodo- α -D-arabinosil)-2-nitroimidazol ([^{123}I]IAZA) (Figura 5), marcado com o Iodo-123, o qual pode ser detectado tanto pela cintilografia (imagem plana) quanto pelo SPECT. Este composto para células tumorais demonstrou ser altamente dependente do grau de hipóxia (PARLIAMENT *et al.*, 1992). O tempo de meia vida de 13 horas de ^{123}I contra 110 minutos de ^{18}F permite a obtenção de imagens em períodos de tempo maiores (STYPINSKI *et al.*, 2018). Outro radioisótopo usado frequentemente na SPECT é o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, que oferece características físicas ideais, como a meia-vida mais curta (6 horas) e baixa energia de seus fótons monoenergéticos (140 KeV). Como exemplo de molécula marcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ cita-se o [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]HMPAO ([$^{99\text{m}}\text{Tc}$]hexametilpropileno amino oxima), utilizado para o estudo da perfusão cerebral. Em estudos comparativos entre o [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]HMPAO e o ([^{123}I]IAZA, o [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]HMPAO apresenta a desvantagem de permanecer armazenado no tecido hipóxico e necrótico sem distinção (LYTHGOE *et al.*, 1997).

Figura 5 – Estrutura química do [^{123}I]IAZA

Fonte: Autor da tese

3.3.2.3 Ressonância Magnética (RM)

A espectroscopia de ressonância magnética (RM) é um método não invasivo que pode examinar um órgão *in vivo*, o metabolismo do órgão e as alterações bioquímicas que ocorrem. A RM fornece informações bioquímicas que

auxilian no diagnóstico de tumores ou na distinção entre tumores malignos de tumores benignos. A RM oferece um bom contraste entre os diferentes tecidos moles do corpo, o que a torna especialmente útil para a geração de imagens do cérebro, músculos, coração e câncer, em comparação com outras técnicas de imagem médica, como a tomografia computadorizada (TC) ou raios-X. Ao contrário destes, a RM não usa radiação ionizante. Ele usa um poderoso campo magnético para alinhar a magnetização de alguns núcleos atômicos no corpo e os campos de radiofrequência para alterar sistematicamente o alinhamento dessa magnetização. Isso faz com que os núcleos produzam um campo magnético rotativo detectável pelo scanner, e essas informações são registradas para criar uma imagem da área digitalizada do corpo (QI *et al.*, 2009; O'CONNOR *et al.*, 2018).

A ressonância magnética também é usada para registrar alterações no nível de oxigênio no sangue. Esse princípio baseia-se na obtenção de imagens com contraste dependente do nível de oxigênio do sangue (BOLD, em inglês: Blood Oxygen Level Dependent), onde o sinal BOLD-RM está relacionado à oxigenação vascular e permite estimativas diretas de pO_2 (NIELD *et al.*, 2005; FLEMING *et al.*, 2015). Baudelet e Gallez investigaram rigorosamente as correlações entre a estimativa de pO_2 usando sondas de fibra ótica e alterações no sinal BOLD, onde foram encontradas alterações de pO_2 (BAUDELET e GALLEZ, 2002). A vantagem da técnica de BOLD-RM é que ela oferece uma resolução espacial e temporal alta e reproduzível, sendo particularmente atraente para os pacientes. No entanto, a correlação se torna difícil para pequenos vasos sanguíneos. O BOLD pode ser confundido com os efeitos do fluxo, embora sequências de pulso apropriadas possam ser usadas para minimizar esses efeitos (AL-HALLAQ *et al.*, 1998; CHALLAPALLI *et al.*, 2017).

3.3.2.4 Ressonância Eletrônica de Spin (ESR)

A ressonância eletrônica de spin (ESR, em inglês: Electron Spin Resonance), também chamada de ressonância paramagnética eletrônica (EPR, em inglês Electron Paramagnetic Resonance), é um método para detectar, caracterizar e quantificar radicais livres em sistemas biológicos. O desenvolvimento da baixa frequência de instrumentos de EPR permite obter

medições em amostras biológicas *in vivo*. Estudos que requerem medições da distribuição espacial de radicais livres da amostra podem ser realizados por imagem usando campos apropriados. Essa técnica requer a administração de agentes de contraste paramagnéticos, como nitróxidos e radicais triarilmetil. As aplicações mais importantes do EPR com imagem são as medidas dos estados de pO_2 , pH e estados redox (RICKARD, *et al.*, 2019). O principal objetivo de continuar desenvolvendo essa técnica é alcançar as seguintes características: sensibilidade, localização, reprodutibilidade, velocidade, não invasividade e biocompatibilidade do método. Duas técnicas diferentes são usadas: 1) Injeção direta de materiais paramagnéticos com propriedades espectroscópicas ideais (com sinais únicos e uma grande capacidade de responder a alterações na pO_2). Alguns desses materiais podem ter interações indesejáveis com os tecidos, causando reações e perdendo a capacidade de resposta ao oxigênio. Exemplos de tais materiais são ftalocianinas e India Ink (suspensões de nanopartículas de negro de carbono em soluções aquosas). Esta técnica foi estudada em tecido tumoral do cérebro, coração e músculo esquelético; 2) Infusão intravenosa de agentes solúveis em água, que atravessam para o tumor (WEAVER *et al.*, 2014; BOŚ-LIEDKE *et al.*, 2018).

Imagens tridimensionais da distribuição de oxigênio no tumor foram descritas por ESR. Atualmente, estudos foram feitos em células tumorais em cultura com complexos de lítio, permitindo medições de pO_2 por alguns dias (QIAO, *et al.*, 2015). Esta técnica pode ser combinada com a RM (ESR/RM) dando o sinal de próton que ocorre por transferência de polarização por radicais livres após irradiação eletromagnética. A ESR é promissora, mas atualmente não possui instrumentação adequada (RICKARD, *et al.*, 2019).

3.3.2.5 Métodos de imagem óptica para medições de hipóxia

A imagem óptica abrange uma ampla variedade de métodos capazes de medir a hipóxia. Comprimentos de onda entre 100 nm e 1 mm descrevem a faixa do espectro óptico, e os pesquisadores desenvolveram muitos métodos para aproveitar a detecção de oxigênio nessa faixa, incluindo eletrodos sensores de oxigênio, sensores de vida útil fluorescente, espectroscopia de refletância difusa,

imagem hiperespectral, topografia óptica difusa e tomografia , fotoacústica, iluminação estruturada etc (LOPCI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018).

Essas tecnologias compartilham um método comum: elas obtêm medições de oxigênio quantificando fontes intrínsecas de absorção óptica, dispersão e fluorescência no tecido. Imagem óptica ou espectroscopia são vantajosas em sua alta resolução espacial e temporal. As limitações nos métodos ópticos estão principalmente nas restrições de profundidade de penetração devido à absorção e dispersão relativamente alta dos tecidos (RICKARD *et al.*, 2019).

3.4 Métodos de síntese de radiofármacos fluorados

O [^{18}F]-flúor pode ser produzido por diferentes reações nucleares (Tabela 2).

Tabela 2 - Métodos para a produção de [^{18}F]-flúor.

Método	Reação nuclear	Alvo	Produto	Atividade molar (GBq/ μmol)
1	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	H_2^{18}O	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$	10–7000
2	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}_2$, Kr (50 $\mu\text{mol F}_2$)	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	0.6
3	$^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$	H_2O	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$	50
4	$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$	0.1% F_2 / Ne	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	0.030–0.370
5	$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$	15% H_2 / Ne	$[^{18}\text{F}]\text{HF}$	100–1000

Fonte: Adaptada, LASNE, 2002.

No entanto, os dois métodos mais usados são $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ e $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$, pois ambos requerem energias moderadas das partículas e um bombardeio a baixa corrente para obter rendimentos aceitáveis, podendo ser formulado em duas formas químicas: na forma de $^{18}\text{F}_2$, estando positivamente carregado (eletrofílico), ou na forma de fluoreto $[^{18}\text{F}]^-$, rico em elétrons (nucleofílico). Dessa forma, a marcação das moléculas biológicas com ^{18}F pode ocorrer tanto por reação eletrofílica quanto por reação nucleofílica (JACOBSON *et al.*, 2015). O reagente isotopicamente marcado reage com o precursor de modo que em uma ou algumas etapas sintéticas o radiofármaco é formado, purificado e injetado. No campo da radioquímica, a síntese é realizada com um grande

excesso de precursor e reagentes em relação ao radioligante. Por esse motivo, a eficiência das reações geralmente é dada no desempenho radioquímico em vez de químico e pode ser expressa com decaimento corrigido ou não.

Na síntese de compostos marcados com [^{18}F]-flúor, uma das características mais importantes é a medição da atividade molar para obter radiofármacos com uma atividade molar apropriada para uso *in vivo*. A atividade molar é definida como a radioatividade medida por mol de composto, expressa em Bq/mol ou GBq/ μmol . Essa medição é analisada usando diferentes técnicas, como cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta pressão (CLAE), espectroscopia ultravioleta (UV, em inglês: Ultraviolet–visible spectroscopy) ou espectroscopia de massa (MS, em inglês: Mass spectrometry). Essas medições podem variar por razões relacionadas à qualidade do reagente marcado usado na síntese e à precisão e exatidão das análises cromatográficas. Considerando a concentração relativamente baixa de receptores (nos tecidos-alvo em torno de 10 pmol/mg de tecido), a atividade molar deve ser a mais alta possível para evitar a saturação e garantir a ligação máxima do radioligante ao receptor (Elsinga, 2002). A adição de um transportador aumenta a massa do radiofármaco final, que pode saturar o receptor alvo com o ligante não radioativo, reduzindo assim o sinal PET (Cai *et al.*, 2008; Jacobson *et al.*, 2015). Além disso, os radiofármacos com alta atividade molar permitem sua administração a pacientes sem efeitos tóxicos ou farmacológicos (Cai *et al.*, 2008). Portanto, a maioria dos traçadores ^{18}F relatados foi sintetizada usando [^{18}F] F^- como nucleofílico produzido pela irradiação de prótons do H_2^{18}O .

3.4.1 Fluoração eletrofílica

Embora a maioria dos radiofármacos marcados com ^{18}F foram preparados por reações de substituição nucleofílica, em alguns casos a radiosíntese por substituição eletrofílica é mais apropriada. A obtenção de [^{18}F] F_2 pode ser obtida de duas maneiras: a) por reações nucleares $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ com a adição de pequenas quantidades de gás portador ($^{19}\text{F}_2$) (c.a. em inglês: carrier added). Portanto, do flúor inicialmente obtido no alvo, apenas uma parte será ^{18}F , uma vez que ^{18}F e ^{19}F são quimicamente indistinguíveis (COLE *et al.*, 2014); b) por reações nucleares $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ (um método com maior rendimento para a

produção de [^{18}F]-flúor) seguido de uma segunda irradiação de uma mistura gasosa com a adição de gás carreador (c.a.) para iniciar a troca de átomos de flúor (JACOBSON *et al.*, 2015).

A razão para a adição de flúor molecular não radioativo no recipiente onde é introduzido o material a ser irradiado é porque [^{18}F] F_2 é muito reativo e pode ser adsorvido nas paredes do recipiente e nas linhas de transferência. Essa etapa é chamada passivação e é fundamental para obter bons rendimentos. O reagente é geralmente usado na forma de [^{18}F] F_2 (reagente levemente regioselectivo) ou é transformado em [^{18}F]hipofluorito de acetil (CH_3CO [^{18}F]F), que é menos reativo (OGAWA *et al.*, 2003). A radiofluoração eletrofílica requer estruturas eletronicamente enriquecidas, como grupos vinílicos ou derivados aromáticos. A limitação mais significativa das [^{18}F]-fluorações eletrofílicas é a baixa atividade molar (inferior a 10 Ci/mmol) obtida nos produtos finais. Uma segunda desvantagem desse tipo de reação é que o rendimento radioquímico máximo que pode ser obtido é de 50%, uma vez que apenas um dos dois átomos de gás flúor pode ser introduzido no produto (LASNE, 2002).

3.4.2 Fluoração nucleofílica

A maioria dos [^{18}F]-fluoro traçadores são sintetizados por reações de fluoração nucleofílica. Este é o método mais usual de introduzir um fluoreto em uma cadeia alifática por deslocamento nucleofílico do correspondente sulfonato ou halogeneto pelo íon flúor. Embora para esse fim os fluoretos de metais alcalinos tenham sido utilizados, a fluorinação com esses compostos só é alcançada sob condições vigorosas devido à sua solubilidade limitada em solventes orgânicos e baixa nucleofílicidade (KIM *et al.*, 2006). A geração de ^{18}F é realizada por bombardeio de [^{18}O] H_2O com prótons, de acordo com a reação nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ em solução aquosa com alta radioatividade molar (185 GBq μmol^{-1}) e sem a adição de fluoreto molecular. Trata-se de um método de preparação de radioisótopos livres de isótopos estáveis do elemento, o que não significa que eles estejam livres da presença de [^{19}F]flúor, mas simplesmente que nenhum flúor de ^{19}F foi adicionado deliberadamente durante a geração do radionuclídeo ou durante a radiosíntese (LASNE, 2002).

O ânion fluoreto [^{18}F]⁻ obtido (o cátion é adicionado passando a solução através de um cartucho de carbonato de potássio) é transformado em espécies nucleofílicas por remoção de H_2O . Um catalizador de transferência de fase (Kryptofix 2.2.2) é adicionado para reforçar a nucleofílicidade do flúor. A etapa de secagem pode ser evitada pela adição de um líquido iônico como reagente ao meio (COLE *et al.*, 2014). A substituição nucleofílica geralmente é realizada em solventes polares apróticos como dimetilsulfóxido (DMSO) ou acetonitrila (CH_3CN), sob aquecimento convencional a 100-150 °C ou por microondas (100 W) por um curto período de tempo (1-2 minutos). Os rendimentos radioquímicos dependem dos substratos iniciais, mas podem atingir 70%. A maioria dos radiofármacos marcados com ^{18}F são geralmente sintetizados por substituição nucleofílica em séries alifáticas ou homoaromáticas. Nas séries alifáticas, normalmente são utilizados derivados halogenados ou sulfonatos (mesilato, tosilato, nosilato ou triflato) (JACOBSON *et al.*, 2015).

3.5 Radiofármacos derivados de nitroimidazol para imagem de hipóxia

Os radiofármacos são substâncias formadas pela junção de um átomo radioativo e um substrato que tem propriedades bioquímicas (que irá determinar a distribuição e o comportamento fisiológico do radiofármaco). Não possuem ação farmacológica e, dependendo da sua forma farmacêutica, tipo de radiação emitida, e valor da sua radioatividade, têm como finalidade diagnosticar patologias e disfunções do organismo e/ou também serem aplicados nas terapias de doenças, por exemplo, em tumores radiosensíveis (SAHA, 2010). Devem possuir afinidade por determinados órgãos ou tecidos tumorais de interesse. É grande a busca por radiofármacos com baixa captação em órgãos não alvo, pois a captação nesses órgãos atrapalha o diagnóstico mascarando possíveis detalhes, além de submeter, desnecessariamente, partes do corpo à exposição à radiação. O radiofármaco deve ainda apresentar rápida eliminação daquilo que não foi captado, de modo a aumentar o contraste da imagem e reduzir a dose de radiação absorvida pelo paciente (DECRISTOFORO, 2012). Um radiofármaco deve ser de fácil produção, custo razoável e facilmente acessível aos serviços de medicina nuclear.

Embora nenhum dos radiotraçadores atualmente disponíveis apresentem todas as propriedades de um agente de imagem de hipóxia ideal, a seleção é baseada, em grande parte, no tipo de tumor, facilidade de síntese e disponibilidade de radioisótopo. Os compostos derivados do nitroimidazol receberam atenção especial como novos traçadores de imagem para a detecção de hipóxia devido à fácil redução biológica em condições hipóxicas. Em 1955, foi descrito que o 2-nitroimidazol (azomicina) tinha propriedades como antibiótico contra bactérias anaeróbias e protozoárias (SHOSHIRO, 1955). Essa toxicidade seletiva foi determinada por sua capacidade de sofrer redução em espécies reativas na ausência de oxigênio. No final do século 20, os compostos nitroaromáticos com deficiência de elétrons foram investigados para uso no tratamento do câncer como modificadores químicos que aumentam a sensibilidade do tecido hipóxico à radiação ou a agentes quimioterapêuticos, bem como a pró-fármacos bioredutores ou citotoxinas seletivas para hipóxia (KIZAKA *et al.*, 2009; MIRABELLO *et al.*, 2018.).

A primeira autorradiografia para detectar hipóxia com um radiofármaco foi realizada em 1981 com o [^{14}C]Misonidazol. Posteriormente, o [^{18}F]Fluoromisonidazol foi proposto como o primeiro radiotraçador não invasivo derivado do grupo 2-nitroimidazol para imagens PET de tumores hipóxicos (Figura 6) (CHAPMAN *et al.*, 1981 e GRIERSON *et al.*, 1989).

Figura 6 – Estrutura química do [^{14}C]Misonidazol e [^{18}F]Fluoromisonidazol

Fonte: Autor da tese

Desde então, muitos outros radiotraçadores foram avaliados para esse fim (FRANK e WUEST, 2012; CHALLAPALLI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Os radiofármacos derivados mais comuns de nitroimidazol radiomarcados com Flúor-18 usados como marcadores para hipóxia são os listados na Figura 7.

Figura 7 - Estruturas de compostos derivados do grupo 2-Nitroimidazol marcados com [^{18}F] usados para hipóxia.

Fonte: Adaptada, FRANK e WUEST, 2012; ZHANG *et al.*, 2019.

3.5.1 Metabolismo do grupo 2-nitroimidazol

Em todas as moléculas contendo o grupo nitroimidazol utilizadas como marcadores de hipóxia, o grupo nitroarilo é um fragmento essencial para seu funcionamento como agente bio redutor, ligando-se seletivamente a moléculas do

tecido hipóxico. Os compostos nitroaromáticos são reduzidos seletivamente pelas enzimas nitroredutases, como xantina oxidase, lipoxigenase e oxidases dependentes de Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), sob condições hipóxicas para formar produtos reativos que podem se ligar irreversivelmente aos nucleófilos das macromoléculas celulares. O derivado 2-nitroimidazol entra nas células por difusão passiva, sendo homogeneamente distribuído no corpo. O grupo nitro tem uma grande afinidade por elétrons, embora seja menor que O_2 e pode aceitar um elétron reduzindo no meio o ânion radical - NO_2 . Na presença de O_2 , o ânion radical nitro é reoxidado e o marcador pode deixar a célula. No entanto, em condições hipóxicas em que os níveis de oxigênio são baixos, o ânion radical nitro é reduzido em um segundo estágio, onde não é mais possível reverter o processo. O radioligante se torna um agente alquilante que reage indiscriminadamente com macromoléculas intracelulares, ficando irreversivelmente retido (Figura 8) (MCCLELLAND *et al.*, 1987; WARDMAN *et al.*, 1990; TAKASAWA *et al.*, 2008).

Figura 8 - Esquema representativo do mecanismo intracelular de compostos marcados com nitroimidazóis.

Fonte: TAKASAWA *et al.*, 2008

Os compostos nitroaromáticos mais investigados contêm 2-nitroimidazol, que tem um potencial de redução de -0,39 V ($E[RNO_2/RNO_2^-]$) com referência ao elétron normal de hidrogênio na água a pH 7, superior ao 4-nitroimidazol (-0,56 V) e 5-nitroimidazol (-0,47 V) (WARDMAN, 1985).

No entanto, não apenas o grupo nitroaril é importante no composto, uma vez que o tamanho da cadeia lateral e os diferentes grupos funcionais que ela contém são necessários para o controle de outras propriedades farmacocinéticas, bem como sua toxicidade, distribuição, acumulação, duração da retenção do marcador no local hipóxico e rápida depuração das células normóxicas. A farmacocinética e as taxas de acumulação dependem da presença ou ausência de grupos dissociáveis e da lipofilicidade. A lipofilicidade de uma molécula é sua capacidade de passar através da bicamada lipídica da célula por difusão passiva e é quantificada através do coeficiente de partição em octanol/água (P ou $\log P$) (WORKMAN e BROWN, 1981). Em geral, quanto maior o valor de P , maior a lipofilicidade e maior será a quantidade de radiotraçador que atravessará a bicamada lipídica. Quando o valor do $\log P$ é negativo, indica hidrofilicidade, enquanto que quando positivo, falamos de lipofilicidade. Uma das limitações e características comuns dos marcadores do tipo 2-nitroimidazol é sua lenta acumulação no tecido hipóxico, mostrando sinais de hipóxia inespecífica até 1,5 - 2 horas após a injeção e em alguns modelos animais, o tempo ideal pode ser de 4 - 18 horas (KIZAKA e KONSE, 2009; TAMAKI e HIRATA, 2016).

3.5.2 Derivados de 2-nitroimidazol como radiofármacos de hipóxia

3.5.2.1 [^{18}F]FMISO

Ao longo dos anos, vários marcadores à base de 2- nitroimidazol fluorados foram desenvolvidos para imagens PET. Destes, o [^{18}F]FMISO é atualmente o radiotraçador clinicamente mais utilizado na imagem PET como marcador *in vivo* que permite a avaliação não invasiva da hipóxia. A natureza lipofílica ($P = 0.40$) desse composto garante a penetração e a difusão fácil da membrana celular no tecido. Vários estudos correlacionando medições diretas de oxigênio com o acúmulo de [^{18}F]FMISO *in vivo* demonstram que geralmente é necessário um nível mediano de oxigênio de ≤ 10 mmHg para retenção específica de hipóxia (FLEMING *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2017). A captação do [^{18}F]FMISO está intimamente correlacionada com a imuno-histoquímica do pimonidazol e atualmente apresenta aplicações clínicas para hipóxia no câncer de cabeça e pescoço (HENDRICKSON *et al.*, 2011; GRKOVSKI *et al.*, 2017), glioma (QUARTUCCIO *et al.*, 2018; HIRATA, *et al.*, 2019), câncer colorretal (PURI *et al.*,

2018; ZHANG *et al.*, 2019), câncer de mama (CHENG *et al.*, 2013; ASANO *et al.*, 2018), câncer de pulmão (VERA *et al.*, 2019; MCGOWAN *et al.*, 2017), e carcinoma de células renais (MURAKAMI *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2017). Em vista da lenta depuração plasmática do [^{18}F]FMISO, a obtenção da imagem geralmente requer um intervalo superior a 2 h (idealmente 4 h) após a administração para obter um bom contraste (PIERT, 2009). Os valores máximos de captação padronizados para esse radiofármaco foram definidos por um $\text{SUV}_{\text{máx}}$ ($\text{SUV}_{\text{máx}}$, em inglês: Maximum Standard Uptake Value) de 1,5 ou relação tumor:músculo de 1,4 (FLEMING *et al.*, 2015). Embora suas propriedades de biodistribuição não resultem em imagens de alto contraste, a imagem de 2 h reflete inequivocamente a pO_2 regional na faixa em que ele é clinicamente significativo. No entanto, devido a preocupações percebidas em relação à estabilidade do FMISO *in vivo*, formação de metabólitos, propriedades de depuração lenta (MEES *et al.*, 2009) e falha em obter intensidades de imagem em humanos comparáveis às obtidas em modelos animais, traçadores PET de hipóxia alternativos com depuração diferente e melhores características de hidrofiliidade foram desenvolvidas na tentativa de superar essas limitações.

3.5.2.2 [^{18}F]FAZA

O [^{18}F]FAZA (fluoroazomicina-arabinofuranosídeo) é mais hidrofílico que o FMISO, sendo o valor do coeficiente de partição octanol/água de cada um deles 0,40 e 0,24, respectivamente (RAJENDRAN e KROHN, 2015). Consequentemente, possui uma cinética de depuração mais rápida, resultando em melhores razões de tumor:tecido e, portanto, um melhor contraste de hipóxia-para-normoxia (SORGER *et al.*, 2003). As comparações entre FAZA, [^{124}I]IAZA e FMISO em estudos pré-clínicos em animais, com imagens três horas após a administração do radiofármaco, demonstraram uma depuração vascular mais rápida do FAZA, resultando em um aumento da razão tumor:sangue (5,19) em relação ao de [^{18}F]FMISO (3,98) (REISCHL *et al.*, 2007).

Mais recentemente, estudos clínicos avaliaram com sucesso a viabilidade do [^{18}F]FAZA para imagem de hipóxia em gliomas (MAPELLI *et al.*, 2017b), linfomas (POSTEMA *et al.*, 2009), pulmão (MAPELLI *et al.*, 2017a; MAPELLI *et al.*, 2018), cabeça e pescoço (GRAVES *et al.*, 2016; IMAIZUMI *et al.*,

2019), cervical (HAN *et al.*, 2018) e tumores retais (HAVELUND *et al.*, 2013), e os resultados foram comparados favoravelmente com dados equivalentes ao [^{18}F]FMISO. Os altos valores da captação do [^{18}F]FAZA têm sido associados à redução da sobrevida-livre da doença e têm demonstrado o potencial prognóstico na detecção de hipóxia em paciente com tumores como, por exemplo, de cabeça e pescoço (MORTENSEN *et al.*, 2012). Devido às maiores proporções do tecido tumoral/referência em comparação com o [^{18}F]FMISO e melhor farmacocinética, o [^{18}F]FAZA está ganhando popularidade na imagem PET da hipóxia tumoral. Apesar do fato que o [^{18}F]FAZA não está amplamente disponível no momento em comparação com o [^{18}F]FMISO, o aumento da demanda da pesquisa pode convencer mais locais para produzi-lo. No entanto, foi demonstrado que a hidrofiliidade facilita a depuração em tecidos bem oxigenados, enquanto a lipofiliidade aumenta o acúmulo em tecidos hipóxicos (CHALLAPALLI *et al.*, 2017). Na busca de ótimos agentes de imagem para hipóxia, é fundamental alcançar um equilíbrio delicado entre essas propriedades contrastantes.

3.5.2.3 [^{18}F]EF5, [^{18}F]EF3 e [^{18}F]EF1

Em comparação com [^{18}F]FMISO e [^{18}F]FAZA, um 2-nitroimidazol marcado com ^{18}F significativamente mais lipofílico é o 2- (2-nitro-1Himidazol-1-il) - N- (2,2,3,3,3 - [^{18}F]Pentafluoropropil) -acetamida ([^{18}F]EF5). Outros exemplos de derivados de fluoroalquil acetamida lipofílicos são 2- (2-nitroimidazol-1-il)-N-3- [^{18}F]Fluoropropil acetamida [^{18}F]EF1 e 2- (2-nitroimidazol-1-il) -N- (3,3,3- [^{18}F]Trifluoro-propil) acetamida [^{18}F]EF3 (FRANK e WUEST, 2009). Em contraste com muitos dos traçadores de hipóxia de segunda geração, o EF5 é altamente lipofílico, resultando em maior permeabilidade da membrana celular e depuração mais lenta do sangue (KOCH *et al.*, 2010), melhorando assim as taxas de captação de tumores e homogeneidade da distribuição do traçador. A maioria das pesquisas sobre esse radiotraçador foi limitada a estudos pré-clínicos (ALI *et al.*, 2015). Em um estudo clínico recente descobriu-se que a imagem PET obtida com [^{18}F]EF5 era capaz de detectar hipóxia em 40% dos pacientes com câncer de pulmão e, que os tumores hipóxicos se correlacionavam com um aumento na recorrência local do tumor após radioterapia. Imagens em 30% dos pacientes com tumores hipóxicos sofreram recorrência local em 12 meses versus 0% de

recorrência em pacientes sem tumores hipóxicos ($p < 0,01$) (QIAN *et al.*, 2018). No entanto, as principais desvantagens do EF5 são sua depuração lenta do sangue o que implica uma maior dose de radiação para o paciente e a química complexa da marcação em comparação com as reações simples de deslocamento nucleofílico usadas para os 2-nitroimidazoles mono-fluorados (CHALLAPALLI *et al.*, 2017).

3.5.2.4 [^{18}F]FETNIM e [^{18}F]FETA

Exemplos adicionais de radiofármacos derivados de 2-nitroimidazóis marcados com ^{18}F são [^{18}F]Fluoroetanidazol ([^{18}F]FETA) e [^{18}F]Fluoroeritritroimidazol ([^{18}F]FETNIM). Ambos compostos mostraram taxas metabólicas reduzidas *in vivo* e menos retenção no fígado em comparação com o [^{18}F]FMISO de primeira geração (IMAM, 2010).

A maior diferença entre [^{18}F]FMISO e [^{18}F]FETNIM é sua lipofilicidade. O valor do coeficiente de partição octanol/água de cada um deles é 0,40 e 0,17, respectivamente, onde o mais hidrofílico é [^{18}F]FETNIM, o que resulta na sua rápida depuração renal e baixa captação hepática, em comparação com o FMISO (GRÖNROOS *et al.*, 2001). Isso também pode explicar a correlação positiva entre o fluxo sanguíneo do tumor e a captação inicial de FETNIM do tumor (LEHTIO *et al.*, 2001). Estudos clínicos recentes em câncer de cabeça e pescoço (GRÖNROOS *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2019), pulmão (WEI *et al.*, 2016), câncer cervical (VERCELLINO *et al.*, 2012) e câncer de esôfago (YUE *et al.*, 2012) mostraram que a alta captação tecidual de FETNIM era indicativa de redução na progressão livre de doença e na sobrevida global dos pacientes avaliados. No entanto, não está claro se o uso do radiofármaco apresenta vantagens sobre os protocolos de imagem em comparação com o FMISO, pelo que é necessária uma maior pesquisa para determinar suas perspectivas de aplicações clínica.

O [^{18}F]FETA foi preparado através de uma reação de acoplamento de éster ativo entre o éster 2,3,5,6-tetrafluorofenil do ácido 2-nitroimidazol acético e a [^{18}F]Fluoroetilamina. Em estudos *in vitro* foi determinada a biodistribuição e metabolismo do [^{18}F]FETA, concluindo que o radiofármaco possui propriedades físico-químicas adequadas, elevada estabilidade metabólica e capacidade bastante elevada para imagem de hipóxia tumoral em momentos iniciais de imagem (~ 1 h pós-injeção (p.i.) em comparação com ~ 3 h p.i. com [^{18}F]FMISO,

[^{18}F]FAZA e [^{18}F]EF5 (BARTHEL *et al.*, 2004). No entanto, apesar dos benefícios potenciais, a difusão desse marcador nos tecidos tumorais parece limitada e, até o momento, [^{18}F]FETA ainda não foi utilizado em ensaios clínicos (RICKARD *et al.*, 2019).

3.5.2.5 [^{18}F]NEFT e [^{18}F]NEFA

Em 2011, Zha *et al.* sintetizaram e avaliaram dois novos derivados do 2-nitroimidazol como radiofármacos para tumores: [^{18}F]NEFA (N-(2-(2-nitro-1Himidazol-1-yl)etil)-[^{18}F]Fluoroacetamida) e [^{18}F]NEFT (2-(2-nitroimidazol-1-il)etil)-[^{18}F]fluoroacetato). Ambos foram preparados com rendimentos de 7% e 10% (decaimento não corrigido), respectivamente, com purezas radioquímicas superiores a 98%. Os estudos de biodistribuição em tumores injetados em camundongos indicaram uma proporção de biodistribuição em tumor/sangue e tumor/fígado de 0,96 e 0,61 para NEFA e 0,98 e 1,10 para NEFT em 30 minutos, respectivamente. Esses valores são superiores aos observados para o FMISO (0,91 e 0,59). A baixa acumulação em tecidos normais é provavelmente devido à rápida metabolização *in vivo* dos referidos radiofármacos, uma vez que eles contêm grupos éster e amida muito lábeis. Ambos compostos provaram ser metabolicamente instáveis *in vivo*, e [^{18}F]-NEFT mostrou radiodesfluoração substancial *in vivo* (ZHA *et al.*, 2011).

3.5.2.6 [^{18}F]HX4 e [^{18}F]RP-170

[^{18}F] 3-fluoro-2- (4 - ((2-nitro-1H-imidazol-1-il) metil) -1H-1,2,3-triazol-1-il) propan-1-ol ([^{18}F]HX4), um radiofármaco derivado do 2-nitroimidazol de última geração contém uma porção 1,2,3-anti-triazol (como uma conveniência sintética), tornando-o mais hidrofílico do que o FMISO, projetado especificamente para maximizar as propriedades farmacocinéticas e de depuração. Estudos iniciais em humanos demonstram rápida depuração renal e excreção urinária de HX4, com um perfil de dosimetria favorável semelhante ao do FMISO (VAN LOON *et al.*, 2010). Estudos pré-clínicos validaram que a captação do marcador era de fato dependente de oxigênio, embora as relações tumor-fundo parecessem semelhantes às relatadas para o FMISO em estudos usando o mesmo modelo tumoral (DUBOIS *et al.*, 2004). Nos tumores de cabeça e pescoço, o HX4

produziu valores de tecido tumor-para-referência semelhante ao FMISO e ao FAZA para tempos iniciais após a injeção, indicando a vantagem potencial de menores tempos de aquisição (WACK *et al.*, 2015). Um estudo mais recente em pacientes com câncer de pulmão (DE BRUYCKER *et al.*, 2019) sugeriu que tempos de imagens posteriores (2 a 4 h p.i.) podem melhorar ainda mais o sinal hipóxico para normóxico. No entanto, ele ainda apresenta os inconvenientes clínicos do baixo contraste de imagem no momento da aquisição e da reprodutibilidade limitada em comparação com o FMISO (WATANABE *et al.*, 2019).

O 1-(2-1-(1H-metil)etoxi)-metil-2-nitroimidazol foi desenvolvido como um radiotraçador paranhipóxia marcado com flúor-18 ($[^{18}\text{F}]$ RP-170) à base de 2-nitroimidazol. A seletividade hipóxica do RP-170 foi demonstrada em pacientes com glioma com base em correlações significativas entre captação, medidas de tensão de oxigênio e imunocoloração HIF-1 α (BEPPU *et al.*, 2014). Estudos em tumores cerebrais (BEPPU *et al.*, 2014; OIKAWA *et al.*, 2019) e de pulmão (KANETA *et al.*, 2007) indicaram $\text{SUV}_{\text{máx}}$ mais alto (calculado 1 hora após a injeção), para tecidos hipóxicos do que para tecido normal. O intervalo mais curto antes da imagem, combinado com o contraste hipóxico aprimorado comparado com o FMISO, poderia torná-lo atraente para imagens clínicas.

3.5.2.6 $[^{18}\text{F}]$ DiFA e $[^{18}\text{F}]$ -FNPFT

Os compostos 1-(2,2-di-hidroximetil-3- $[^{18}\text{F}]$ Fluoropropil)-2-nitroimidazol ($[^{18}\text{F}]$ DiFA) e o éster 2-(2-nitro-imidazol-1-il)-etil ácido 2-fluoropropiônico ($[^{18}\text{F}]$ FNPFT) são os últimos radiofármacos desenvolvidos para a imagem da hipóxia tumoral (ZHANG *et al.*, 2019; SHIMIZU *et al.*, 2019b). O $[^{18}\text{F}]$ DiFA tem lipofilicidade mais baixa que o $[^{18}\text{F}]$ FMISO e, portanto, é excretado mais rapidamente pelo sistema urinário. Um estudo clínico usando $[^{18}\text{F}]$ DiFA para a imagem de indivíduos normais e pacientes com câncer de cabeça e pescoço (WATANABE *et al.*, 2019) demonstrou que o radiotraçador é bem tolerado e sua dose de radiação é comparável à de outros radiofármacos para hipóxia.

Zhang *et al.* demonstraram a avaliação da potencialidade como agente de imagem hipóxica do $[^{18}\text{F}]$ FNPFT medindo sua estabilidade *in vitro*, coeficiente de partição e captação em camundongos portadores de tumor EMT-6. No

entanto, os resultados da biodistribuição *in vivo* sugeriram que o radiofármaco provavelmente refletia a predominância do metabólito produzido *in vivo*, Ácido 2- ^{18}F Fluoropropiônico (^{18}F FPA), que pode não estar relacionado à condição hipóxica do tumor (ZHANG *et al.*, 2019).

3.5.3 Novos radiofármacos de hipóxia com um segundo grupo nitroimidazol

Em 2012, Huang *et al.* estudaram a influência de mais de um centro redox de nitroimidazol na molécula (Figura 9). Eles sintetizaram compostos contendo: 1) um único grupo 2-nitroimidazol **I** ($\log P = 1,59$); 2) dois grupos 2-nitroimidazol **II** ($\log P = 1,10$); um grupo 4-nitroimidazol **III** ($\log P = 1,54$); 4) dois grupos 4-nitroimidazol **IV** ($\log P = 1,23$) e; 5) um grupo 2-nitroimidazol juntamente com um grupo 4 nitroimidazol **V** ($\log P = 1,29$). Estes compostos foram complexados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e avaliados como marcadores de hipóxia *in vitro*. Os resultados obtidos com **III** e **IV** não apresentaram diferenças entre as células anóxicas e normóxicas; no entanto, o resultado obtido com **I** apresentou boa acumulação, que foi aumentada em 1,3 vezes com a introdução de um fragmento de 4- nitroimidazol **V** e 2,4 vezes mais quando um 2-nitroimidazol **II** foi introduzido. A diferença pode ser atribuída a um menor potencial de redução para o 4-nitroimidazol (- 0,56 V) do que para o 2-nitroimidazol (-0,39 V) (HUANG *et al.*, 2012).

Figura 9 - Influência de centros redox em derivados de nitroimidazol.

Fonte: HUANG *et al.*, 2012.

A maioria dos marcadores de hipóxia contém um único centro redox de nitroimidazol. Em 2009, Mukai *et al.* sintetizaram ^{67}Ga -2,2' [4,10-bis(2-[2-(2-

metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]amino}-oxoetil)-1,4,7,10 ácido-tetraazaciclododecano-1,7-diil]diacético ($[^{67}\text{Ga}]\text{DOTA-MN2}$), um composto que contém dois fragmentos de 5-nitroimidazol (Figura 10). Os experimentos de biodistribuição mostraram uma captação significativa do marcador no tumor, uma rápida depuração de sangue e pequenas acumulações em outros tecidos, resultando em um bom candidato como marcador (MUKAI *et al.*, 2009). Até o momento, no entanto, os radiofármacos com essa estrutura não se mostraram superiores a os principais representantes do nitroimidazol, o $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$, para imagens de hipóxia. Como consequência, sua aplicação ainda é limitada a estudos pré-clínicos (LOPCI *et al.*, 2014; RICKARD *et al.*, 2019).

Figura 10 - Estrutura química do radiofármaco bifuncional, DOTA-MN2.

Fonte: MUKAI *et al.*, 2009

3.6 Radiofármacos não relacionados com grupo nitroimidazol para imagem de hipóxia

Outros agentes de imagem PET que não contêm um anel de nitroimidazol foram utilizados em estudos clínicos para hipóxia tumoral, como 2-desoxi-2- $[^{18}\text{F}]$ Fluoro-D-glicose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) e Diacetil-bis(N4-metiltiossemi carbazona Cu-ATSM (Figura 11).

Figura 11 - Estrutura química dos marcadores PET de hipóxia FDG (esquerda) e Cu-ATSM (direita)

Fonte: CHALLAPALLI *et al.*, 2016

3.6.1 [^{18}F]FDG (2-desoxi-2-[^{18}F]Fluoro-D-glicose)

[^{18}F]FDG é sem dúvida o radiofármaco PET mais importante para avaliação de tumores, avaliação de respostas e prognóstico de doenças, mas requer manuseio cuidadoso ao tentar representar o tecido hipóxico. O fato da alta taxa glicólise tumoral ser controlada pela indução de HIF-1 α (DIERCKX e VAN DE WIELE, 2008; FONTI *et al.*, 2019) oferece alguma justificativa para o uso de [^{18}F]FDG como marcador substituto de hipóxia. Além disso, sabemos que sob níveis reduzidos de oxigênio ($\downarrow\text{pO}_2$), as células vivas trocam sua via metabólica para a produção de Adenosina trifosfato, ATP, para glicólise anaeróbica, também conhecida como efeito Pasteur (BUSK *et al.*, 2008).

No entanto, no caso de células tumorais hipóxicas, existe uma grande sobreposição entre a captação de [^{18}F]FDG devido à glicólise aeróbica, o chamado efeito de Warburg e a glicólise anaeróbica (BUSK *et al.*, 2008) (ou seja, condições normóxicas e hipóxicas, respectivamente). O fato de que a expressão de HIF-1 α também pode ser observada em regiões tumorais não hipóxicas (AIRLEY e MOBASHERI, 2007) sugere que outros fatores podem influenciar indiretamente o metabolismo da glicose e a captação do [^{18}F]FDG nessas áreas (DIERCKX e VAN DE WIELE, 2008). Portanto, parece compreensível o motivo pelo qual, em muitos experimentos, a correlação entre a captação de [^{18}F]FDG e o nível de hipóxia tumoral não foi confirmada ou resultados conflitantes foram obtidos (MEES *et al.*, 2009; ALBIACH *et al.*, 2010). O [^{18}F]FDG em combinação com radiofármacos específicos para diagnosticar hipóxia tem sido utilizado recentemente para a análise por imagem de uma variedade de tipos de tumores, incluindo carcinoma de cabeça e pescoço (MÖNNICH *et al.*, 2017), câncer de pulmão (THUREAU *et al.*, 2019), sarcomas (EARLY *et al.*, 2011), câncer de mama (ANDRZEJEWSKI *et al.*, 2019) e tumores cerebrais (SHIMIZU *et al.*, 2019a). Em resumo, as limitações na aplicação específica de [^{18}F]FDG para a detecção de hipóxia persistem e, no caso de imagens de tumores, é aconselhável combinar esse traçador com outros que são específicos para hipóxia, a fim de obter uma avaliação abrangente das características do tumor.

3.6.2 Cu-ATSM

O Cu-ATSM, um complexo de cobre radioativo com ATSM (Diacetil-bis (N4-metiltiossemicarbazona)) tem sido utilizado com uma alternativa para detectar hipóxia por imagem PET. O Cu(II)-ATSM é um complexo neutro lipofílico, altamente permeável à membrana. As ditionossemicarbazonas têm propriedades antitumorais que aumentam quando formam um complexo com Cu, o que fez com que vários laboratórios desenvolvessem ligantes de ditionossemicarbazona substituídos como potenciais agentes PET. O primeiro complexo descrito foi Cu-PTSM (piruvaldeído-bis (N4-metiltiossemicarbazona)) de cobre (II) que foi promovido como um agente para o fluxo sanguíneo (LAPI *et al.*, 2015). Logo após, o Cu-ASTM foi descrito como um bom agente para a detecção de hipóxia miocárdica. Nesse caso, o grupo metil adicional tem um pequeno efeito no log P, mas tem uma influência importante no potencial de redução ($E_{1/2}$), para a redução $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$. Testes em várias linhagens celulares tumorais mostraram um aumento de três vezes na captação do tumor em comparação com o Cu-PSTM. Infelizmente, o efeito hipóxico não foi mostrado em todas as linhas celulares e algumas delas não mostraram seletividade hipóxica (DEARLING *et al.*, 2010; CHALLAPALLI *et al.*, 2017). O mecanismo de redução de Cu(II)-ATSM para $[\text{Cu(I)-ATSM}]^-$ ocorre em células hipóxicas e normóxicas, mas na presença de oxigênio intracelular o cobre é rapidamente reoxidado para Cu(II)-ATSM. Sob condições hipóxicas, a reoxidação é lenta, de modo que se acredita que o complexo $[\text{Cu(I)-ATSM}]^-$ protona, o Cu dissocia-se e é transferido para outras macromoléculas intracelulares (DEARLING e PACKARD, 2010). Embora este seja um mecanismo quimicamente atraente, no entanto, não há variabilidade com diferentes tipos de tumor.

Existem quatro isótopos de cobre diferentes, emissores de pósitrons, cuja meia-vida são: ^{60}Cu ($t_{1/2} = 0,40$ horas), ^{61}Cu ($t_{1/2} = 3,32$ horas), ^{63}Cu ($t_{1/2} = 0,16$ horas) e ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12,7$ horas). Yuan *et al.* demonstraram a validade do ^{64}Cu ATSM como marcador de hipóxia na maioria dos tumores, mas não em todos, o que suscita preocupações quanto ao seu uso para identificar hipóxia com grande certeza (YUAN *et al.*, 2006). Além disso, Lewis *et al.* realizaram um estudo comparativo entre imagens obtidas com ^{60}Cu ATSM e ^{64}Cu ATSM em câncer do colo do útero, onde observaram que a qualidade com ^{64}Cu era superior à de ^{60}Cu .

devido ao menor ruído do sinal; entretanto, a extensão de absorção tumoral foi semelhante para ambos (LEWIS *et al.*, 2008). O uso do [^{64}Cu]ATSM tem algumas vantagens conhecidas em relação a outros radiofármacos usados para hipóxia, incluindo um método mais simples de síntese, com uma taxa de remoção mais rápida em tecidos normóxicos, permitindo um curto período de tempo entre a injeção e a imagem. Isso faz com que seja um marcador muito atraente no futuro para a hipóxia tumoral (RICKARD *et al.*, 2019).

3.7 Considerações finais

Diversos estudos têm demonstrado consistentemente que os tumores que apresentam hipóxia estão associados a um mau prognóstico, incluindo uma pior resposta à radioterapia. Imagens com radiotraçadores PET, particularmente os nitroimidazóis, representam um método reproduzível de visualização de áreas de hipóxia tumoral que podem ser usadas para selecionar pacientes para diferentes métodos de escalonamento ou adaptação da dose de radiação. Entretanto, nenhum dos marcadores disponíveis atualmente atende os requisitos que um radiofármaco precisa ter para ser ideal na detecção de tumores hipóxicos (NAKATA *et al.*, 2019).

A radioterapia é hoje utilizada para o tratamento de diversos tumores sólidos tais como: tumores de cabeça e pescoço, cérebro, mama, pulmão, próstata, útero, linfoma, pele do tipo não melanoma e cólon (CITRIN, 2017). Já se encontra bem descrito na literatura que cerca de 31% dos tumores de mama (ASANO *et al.*, 2018), uma média de 52% dos tumores de pulmão (MCGOWAN *et al.*, 2017; VERA *et al.*, 2019), 78% dos tumores de cabeça e pescoço (GRKOVSKI *et al.*, 2017; IMAIZUMI *et al.*, 2019), cerca de 55% dos tumores cerebrais (MAPELLI *et al.*, 2017; HIRATA *et al.*, 2019), 33% dos cânceres cervicais (HAN *et al.*, 2018), 53% dos cânceres colorretais (PURI *et al.*, 2018) e 33% dos linfomas (POSTEMA *et al.*, 2009) desenvolvem áreas de hipóxia tumoral (áreas com oxigenação reduzida) e podem ser diagnosticados em pacientes com recurso aos radiofármacos para hipóxia ([^{18}F]FMISO, [^{18}F]FAZA ou [^{64}Cu]ATSM).

O desenvolvimento de derivados de 2-nitroimidazol com grupos fluoroalquil acetamida comparativamente a outros grupos de cadeias laterais ligadas ao 2-nitroimidazol, esses compostos oferecem várias vantagens tais

como: 1) têm uma ligação mais específica às células hipóxicas; 2) sua ligação não depende do nível intracelular dos sistemas de redutase; 3) sua ligação é oxigênio-dependente e; 4) apresentam uma toxicidade reduzida comparativamente a outros radiotraçadores (JOSSE *et al.*, 2001). Tendo em vista a alta sensibilidade e especificidade desses marcadores, no presente estudo propusemos o desenvolvimento de um novo radiofármaco hidrofílico com o grupo 2-Nitroimidazol e derivado da fluoroalquil acetamida para imagem de hipóxia: [^{18}F]-N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida (**[^{18}F]FBNA**). Essa nova molécula foi avaliada e teve suas características biológicas comparadas com [^{18}F]FAZA tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Devido à relevância clínica da hipóxia em pacientes com câncer, o uso do radiofármaco **[^{18}F]FBNA** permitirá não só prever o nível de progressão da doença como também a escolha do método e dose de tratamento a ser utilizado, podendo aumentar significativamente o efeito do tratamento e sobrevida do paciente. Além do mais, o estudo concentra-se numa área na qual já existe uma demanda clínica por novos agentes de imagem molecular em oncologia, demonstrando um grande potencial translacional para a clínica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções, equipamentos e métodos gerais

Todos os produtos químicos e solventes foram adquiridos com qualidade analítica da TCI América (Brasil, EUA), Merck (Radeberg, Alemanha), Sigma Aldrich (Brasil, Canadá), Fisher Scientific (EUA) e FutureChem (Coreia do Sul) utilizados sem purificação adicional.

Os experimentos de Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS, Ionização por Electrospray) e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C) foram registrados em um espectrômetro Bruker Daltonics micrOTOF-Q II ESI-Qq-TOF e equipamentos Bruker Avance DRX 300, DPX 400, DPX 500. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano, utilizado como padrão interno, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s= singleto, d= duplete, t= tripleto, dd= duplo duplete, m= multiplete), a constante de acoplamento (J), dada em Hertz (Hz), e o número de hidrogênios deduzidos a partir da integral relativa. As amostras foram dissolvidas em metanol deuterado (CD_3OD).

O ^{18}F -Fluoreto [^{18}F] F^- foi produzido pela reação nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ em um ciclotron de 18 MeV (IBA, Bélgica) usando o alvo H_2^{18}O . Os cartuchos Sep-Pak Light QMA (Waters, Brasil) foram pré-condicionados com 10 mL de K_2CO_3 0,5M, seguidos de 20 mL de água Milli-Q e purgados com ar. Os cartuchos Sep-Pak C18 Plus foram obtidos da Waters (Brasil) e pré-condicionados com 5 mL de etanol e 10 mL de água Milli-Q. A medição da radioatividade do ^{18}F foi realizada usando um calibrador de dose Capintec (CRC-15R, Nova Jersey, EUA). O sistema Agilent de cromatografia líquida de alta pressão (CLAE em inglês, High-Pressure Liquid Chromatography) (EUA) foi usado para o controle de qualidade dos compostos marcados com ^{18}F . O sistema CLAE está equipado com uma bomba quaternária modelo 1260, um detector de absorvância UV modelo 1260 e um detector de radioatividade (Raytest, Alemanha). O software Agilent Chem Station foi usado para operar os sistemas Agilent CLAE.

Para os modelos tumorais de câncer gástrico, a radioatividade das amostras dos ensaios de captação *in vitro* e estudos de biodistribuição *ex vivo* foram contados com um contador gama Cobra II (Packard, EUA) e para os

ensaios de captação *in vitro* em hipóxia, a câmara Whitley H35 Hypoxystation (Don Whitley Scientific Ltd Shipley, Inglaterra) foi utilizada e as células mantidas a 37° C com 5 % CO₂ e 1% de O₂. Os estudos de avaliação biológica da imagem PET e autorradiografia foram realizados usando um sistema de imagem μ PET dedicado a pequenos animais, (Triumph™ LabPET 4 - Gamma Medica-Ideas, Northridge, CA, U.S.A) e a leitura da placa de fósforo em equipamento de autorradiografia (GE Healthcare Life Sciences - Typhoon FLA 9500, EUA) com resolução de 50 μ m pixels, respectivamente.

4.2 Radiossíntese do [¹⁸F]Fluoroazomicina arabinosídeo ([¹⁸F]FAZA) e [¹⁸F]Fluoromisonidazol ([¹⁸F]FMISO)

Para efeito de comparação com o radiofármaco inédito proposto, foram preparados seguindo os processos de marcações não automatizadas os radiofármacos [¹⁸F]FAZA (Esquema 1) e [¹⁸F]FMISO (Esquema 2) (SORGER *et al.*, 2003; HAYASHI *et al.*, 2011; KURIHARA *et al* 2012).

Esquema 1 – Radiossíntese do [¹⁸F]FAZA

Fonte: Autor da tese

Esquema 2 – Radiossíntese do [¹⁸F]FMISO

Fonte: Autor da tese

4.2.1 Protocolo de radiossíntese

Em geral, para ambos radiofármacos, uma amostra de 1,5 mL do íon ¹⁸F-Fluoreto [¹⁸F]⁻ (proveniente do Cíclotron), foi passada através de uma coluna de troca iônica (SEP-PAK light, QMA). Em média, uma atividade de 2,96 GBq do

[^{18}F] ficou adsorvido no pequeno cartucho QMA. Em seguida, o [^{18}F] foi eluído do cartucho QMA lentamente com uma mistura de Kryptofix 2.2.2 (11,0 mg; 29,2 mmol) em 800 μL de acetonitrila e K_2CO_3 (2,2 mg; 15,9 mmol) em 200 μL de água Milli Q. Após este passo, a solução de [^{18}F]-F $^-$ / K 2.2.2 K^+ foi seca sob uma corrente de gás de N_2 a 100°C. Para garantir a eliminação de água residual, a solução foi submetida a três ciclos de destilação azeotrópica com acetonitrila (1mL) a 100 °C.

Para o [^{18}F]FAZA, foi adicionado ao frasco uma solução do precursor 1-(2,3-Diacetil-5-tosil-(α -D-arabinofuranosil)-2-nitroimidazol (5 mg; 10,3 mmol) em 400 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a mistura foi aquecida por 10 minutos a 100 °C. Após resfriamento do frasco da reação, a mistura foi então diluída com 20 mL de água Milli Q e passada através de um cartucho de fase reversa Plus C-18. O cartucho C18 foi eluído com 1 mL de etanol, e o [^{18}F]FAZA acetilado foi nitrogenado por 20 min num novo frasco a 100 °C para a eliminação total do etanol. Após a secagem e resfriamento, em seguida foi adicionada uma solução de NaOH 0,1 M (0,5 mL) e a reação de desproteção (desacetilação) ocorreu por 3 minutos à temperatura ambiente. Por último, foi realizada a neutralização acrescentando-se 0,5 mL de HCl 0,1 M, e obtendo-se finalmente o [^{18}F]FAZA.

Para o [^{18}F]FMISO, uma solução de 4 mg (9,4 mmol) de precursor 1-(2-nitro-10-imidazolil)-2-O-tetra-hidropiraniol-3-O-toluenossulfonilpropano-diol (NITTP) em 1 mL de acetonitrila anidro foi adicionado ao resíduo da evaporação, e a mistura foi aquecida a 100 °C por 10 min, seguida por hidrólise com 1 M HCl (1 mL) a 100 °C por 3 min. Após resfriamento até à temperatura ambiente, foi adicionado NaOH 1 M (1 mL) para neutralizar. A mistura de reação bruta foi passada por um cartucho de fase reversa Sep-Pak C18 Plus para purificação; o [^{18}F]FMISO foi retido no cartucho e eluído com 1 mL de etanol.

O produtos puros [^{18}F]FMISO e [^{18}F]FAZA foram diluídos com salina/ etanol a 10% e depois esterilizados com membrana estéril de 0,22 μm .

4.2.2 Controle de qualidade do [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO

Os produtos obtidos das reações descritas anteriormente ([^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO) foram submetidos a análise por CLAE para determinar a pureza radioquímica em coluna analítica:

- Fase estacionária: Agilent C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μ , 100 Å.
- Fase móvel: Solvente (A) Água Milli Q + 0,1%TFA, Solvente (B) 100% Acetonitrila
- Corrida: de 10% a 100% de Acetonitrila em 20 min.
- Fluxo: 1 mL/min.
- Comprimento de onda: 300 nm.

Os produtos foram monitorados por detector UV e de radioatividade, e os produtos padrões não radioativos foram utilizados como referência no processo cromatográfico.

1- Preparo das amostras dos produtos padrões não radioativos para análise por CLAE:

Previamente foram preparadas uma solução dos compostos “frios” padrões [^{19}F]FAZA e [^{19}F]FMISO de concentração 10 mg/mL em DMSO e Acetonitrila, respectivamente. Em seguida, foram tomadas 25 μL (contendo 250 μg) destas soluções e acrescentados um volume de 475 μL de água Milli Q nos frascos de CLAE para cada composto. Dos 500 μL preparados no frasco do CLAE, foram injetados um volume de 10 μL (5 μg dos compostos) para a obtenção do cromatogramas padrões.

2- Preparo das amostras dos produtos radioativos para análise por CLAE:

Dos volumes finais obtidos de [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO, foi retirada uma alíquota para cada composto e transferida para o frasco do CLAE que já continha água milli Q. Para determinação da pureza radioquímica dos produtos foram injetadas atividades de 0.74 MBq para cada radiofármaco.

4.3 Síntese do N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il) acetamida [FBNA]

4.3.1 Química

4.3.1.1 Síntese do material de partida, ácido 2-nitroimidazol acético

O ácido 2-nitroimidazol acético (**1**) foi preparado seguindo-se o esquema de síntese representado pelo esquema 3.

Esquema 3 - Síntese do derivado ácido 2-nitroimidazol acético (**1**)

Fonte: Autor da tese

A uma solução de 2-nitromidazol (200 mg; 1,76 mmol) em 10 mL de acetonitrila anidra, adicionou-se bromoacetato de etila (216 μL ; 1,32 mmol) e K_2CO_3 (741 mg; 5,36 mmol). A mistura foi mantida sob agitação durante 21 horas à temperatura ambiente, uma vez terminada a reação, a qual foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD). O precipitado resultante foi filtrado e lavado com acetona (3 x 10 mL). A evaporação da fase orgânica sob pressão reduzida forneceu um óleo amarelo (310 mg; 1,56 mmol). A CCD analítica revelou um produto puro como óleo amarelado; Fator de retenção (R_f) = 0,4 (acetato de etila (AcOEt) / hexano , 7: 3).

A uma solução do produto anterior (310 mg; 1,56 mmol) em 2 mL de H_2O e 2 mL de MeOH adicionou-se gota a gota NaOH 4M (377 μL ; 1,56 mmol). A mistura foi mantida sob agitação durante 3 horas à temperatura ambiente e, uma vez terminada a reação, a qual foi verificada por CCD, a mistura foi tratada com uma Resina Dowex e lavada com metanol para diminuir o pH da solução. O produto foi extraído com Acetato de Etila (3x5 mL), as fases orgânicas foram combinadas e a solução foi seca com MgSO_4 anidro. O óleo obtido foi concentrado e purificado em coluna cromatográfica em sílica-gel (AcOEt : Hexano 1:1 v:v, 100 mL), fornecendo o produto **1**, como um sólido amarelo.

4.3.1.2 Síntese do precursor, 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato

O precursor para a futura radiosíntese, o composto 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (**2**), foi preparado segundo o esquema de síntese representado pelo esquema 4.

Esquema 4 - Síntese do precursor 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato

Fonte: Autor da tese

Uma mistura de **1** (41 mg; 0,23 mmol) e Na_2CO_3 (25,4 mg; 0,23 mmol) em 5 mL de acetonitrila anidra foi agitada por 5 min à temperatura ambiente, a seguir N,N,N',N'-tetrafluoroborato de tetrametilurônio (TSTU) (72,2 mg, 0,23 mmol) foi adicionado. A mistura foi mantida sobre agitação durante 3 horas com refluxo a 50 °C; uma vez terminada a reação, a qual foi verificada por CCD, o produto foi extraído com AcOEt : H_2O 1:1 v:v (3x5 mL), as fases orgânicas foram combinadas e a solução foi seca com MgSO_4 anidro. O óleo obtido foi concentrado e purificado em coluna cromatográfica em sílica-gel (DCM : MeOH 9:1 v:v, 100 mL), fornecendo o produto **2**, como um óleo amarelo.

4.3.1.3 Síntese do composto padrão, N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida [^{19}F]FBNA

O composto padrão (frio) N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida [^{19}F]FBNA, (**3**), foi preparado segundo o esquema de síntese representado pelo esquema 5.

Esquema 5 - Síntese do [^{19}F]FBNA

Fonte: Autor da tese

Uma mistura de **1** (30 mg; 0,16 mmol), 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) (4,88 mg; 0,033 mmol) e 1-Etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (36,81 mg; 0,156 mmol) foi dissolvida DMF 0,1M (1,5 mL) e agitada por 5 min à temperatura ambiente, a seguir 4-Fluorobenzilamina (20,68 μ L; 0,13 mmol) foi adicionada gota a gota. A mistura foi mantida sobre agitação durante 5 horas à temperatura ambiente. Uma vez terminada a reação, a qual foi verificada por CCD, o solvente foi retirado e posteriormente o produto foi extraído com AcOEt : H₂O 1:1 v:v (3x5 mL), as fases orgânicas foram combinadas e a solução foi seca com MgSO₄ anidro. O óleo obtido foi concentrado e purificado em coluna cromatográfica em sílica-gel (DCM : MeOH 9:1 v:v, 100 mL), fornecendo o produto padrão **3** como um sólido amarelo (20,1 mg; 0,07 mmol). ; R_f = 0,3 (Diclometano (DCM) : Metanol , 9: 1 v:v).

4.3.2 Radioquímica

4.3.2.1 Radiossíntese do [¹⁸F]4-Fluorobenzilamina ([¹⁸F]FBA)

O composto [¹⁸F]FBA foi preparado com algumas modificações, segundo os procedimentos descritos na literatura para um processo de marcação não automatizado (BETTIO *et al.*, 2006; WAY e WUEST, 2013), representado pelo esquema 6.

Esquema 6 – Radiossíntese do [¹⁸F]FBA

Fonte: Autor da tese

Uma amostra de 1,5 mL do íon fluoreto ([¹⁸F]F⁻) foi passada através de uma coluna de troca iônica Sep-Pak Light QMA. Em média, uma atividade de 2,39 GBq do ¹⁸F-fluoreto ficou adsorvido no pequeno cartucho QMA. Em seguida, o íon ¹⁸F⁻ foi eluído do cartucho QMA lentamente com uma mistura de Kryptofix 2.2.2 (15 mg; 40 mmol) em 800 μ L de acetonitrila (CH₃CN) e K₂CO₃ (2,8 mg; 20 mmol) em 200 μ L de água Milli Q. Após este passo, a solução de [¹⁸F]F⁻, foi seca sob uma corrente de gás de N₂ a 100°C. Para garantir a eliminação de água residual,

a solução foi submetida a três ciclos de destilação azeotrópica com acetonitrila (1 mL) a 100 °C. Em seguida, foi adicionado ao frasco uma solução do precursor trifluorometanossulfonato de 4-ciano-N, N, N-trimetilanilínio (5 mg, 16,1 mmol) em 500 µL de CH₃CN, e a mistura foi aquecida por 10 minutos a 100 °C. Após resfriamento do frasco da reação, a mistura foi diluída com 20 mL de água Milli Q e passada através de um cartucho de fase reversa Plus C-18. O cartucho foi lavado com mais 10 mL de H₂O e o produto intermediário, o [¹⁸F]4-fluorobenzonitrilo ([¹⁸F]FBN), ficou retido no cartucho. Em seguida, vários frascos contendo diferentes quantidades de Boro-hidreto de Sódio (NaBH₄) e Cloreto de Níquel(II) (NiCl₂) em 1 mL de H₂O foram deixados em repouso por 3 min. Em seguida, o cartucho contendo o [¹⁸F]FBN foi eluído com 1 mL de Tetraidrofurano (THF) nos frascos com NaBH₄ e NiCl₂ e a reação foi mantida sob a agitação, para completar a redução, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Para a purificação do produto final, a solução reduzida foi diluída em 10 mL de H₂O e passada para um segundo cartucho Sep-Pak Plus C18. Finalmente, o [¹⁸F]FBA foi eluído usando 1 mL de THF no frasco final desejado.

4.3.2.2 Radiossíntese do [¹⁸F]-N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida ([¹⁸F]FBNA)

O radiofármaco inédito para hipóxia [¹⁸F]FBNA foi preparado seguindo os processos de marcações não automatizadas e representado pelo esquema 7.

Esquema 7 – Radiossíntese do [¹⁸F]FBNA

Fonte: Autor da tese

Uma solução (500 µL de DMSO) do precursor **2** (2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (5 mg; 18,6 µmol) contendo 50 µL de N-metil-morfolina foi adicionada em frasco contendo o [¹⁸F]FBA (~ 740 MBq). Todas as condições experimentais foram realizadas durante 10 minutos com diferentes condições de temperatura num bloco de aquecimento com agitação. Para a

purificação do produto final, a solução foi diluída em 10 mL de H₂O e passada por um cartucho Sep-Pak Plus C18. O produto final ([¹⁸F]FBNA) foi eluído com 1 mL de etanol e obtido após evaporação, sob uma corrente de gás de N₂ a 50°C, para eliminação do etanol. Após a secagem, o produto foi solubilizado em uma solução de 300 µL de PBS para a avaliação biológica.

4.3.3 Controle de qualidade

Alíquotas da formulação final dos compostos marcados ([¹⁸F]FBA e [¹⁸F]FBNA) e compostos padrões (frios) ([¹⁹F]FBA e [¹⁹F]FBNA) foram analisadas por CLAE para determinar a pureza química, a pureza radioquímica, a atividade molar e confirmar a identidade química. Os compostos [¹⁸F]FBA, [¹⁹F]FBA, [¹⁸F]FBNA e [¹⁹F]FBNA foram analisados com as seguintes condições de análises:

- Fase estacionária: Agilent C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 µm, 100 Å.
- Fase móvel: Solvente (A) Água Milli Q + 0,1%TFA, Solvente (B) 100% Acetonitrila
- Corrida: Isocrático 70(A) : 30 % de B por 30 min.
- Injeção: 5 µCi para os radiofármacos e 5 µg para os compostos padrões.
- Fluxo: 1 mL/min.
- Comprimento de onda: 280 e 300 nm.

O pH da solução final foi determinado utilizando fitas teste de pH; uma alíquota da amostra foi depositada na região de teste da fita indicadora e, após 1 minuto, foi feita a comparação colorimétrica com o padrão fornecido pelo fabricante. A atividade molar (específica) foi calculada no final da radiosíntese usando uma curva de calibração (nmol do composto frio vs. área sob a curva registrada no perfil analítico por CLAE). Para calcular a atividade molar, a atividade injetada do composto marcado no CLAE foi dividida pelas quantidades frias (nmol) que foram extrapoladas da curva de calibração. As identidades químicas dos compostos marcados foram determinadas por co-injeção com seus compostos padrões (frios), respectivamente, em CLAE analítico.

4.3.4 Análise da estabilidade *in vitro* do [¹⁸F]FBNA em solução salina e soro

Uma vez determinadas as melhores condições de radiosíntese, a estabilidade do composto foi avaliada à temperatura ambiente em solução salina fisiológica (NaCl 0,9 %) e pH=7,0. As amostras tinham atividade de 3,7 MBq em

um volume final de 500 µL. A estabilidade do composto foi acompanhada por 6 horas de estudo (imediato (tempo 0), 3 e 6 horas após a radiosíntese), e o resultado analisado por CLAE conforme foi descrito na seção anterior.

A estabilidade da formulação final também foi estudada em soro de camundongo a fim de avaliar a adequabilidade da formulação para uso pré-clínico. Para isso, uma alíquota de 45 µL (3,7 MBq) do radiofármaco foi adicionada a 450 µL de soro de camundongo recém separado, e a mistura permaneceu incubada a 37 °C por até 6 horas. Alíquotas de 20 µL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (imediato (tempo 0), 1 e 6 horas após a síntese) e 20 µL de acetonitrila foi adicionado para precipitação de proteínas séricas. Em seguida, a mistura foi centrifugada (5000 g, por 10 min) e o sobrenadante foi analisado por CLAE como foi descrito na seção anterior.

4.3.5 Determinação do coeficiente de partição dos radiofármacos (*P* e log *P*)

O coeficiente de partição do [¹⁸F]FBNA e a comparação com os resultados na literatura para o [¹⁸F]FAZA e [¹⁸F]FMISO (RAJENDRAN e KROHN, 2015) foi determinado pela extração no sistema tampão fosfato (PBS, pH=7,4): n-octanol, como fase aquosa e fase orgânica, respectivamente (WILSON *et al.*, 2001). Brevemente, a um tubo LoBind Eppendorf que continha 500 µL de cada fase foram adicionados 50 µL (<1 MBq) da solução dos compostos marcados. O frasco foi tampado e agitado vigorosamente durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após agitação, a mistura foi então centrifugada a 2000 g por 2 min para permitir que as camadas se separassem. Alíquotas de 100 µL foram removidas de cada fase, e a quantidade dos compostos marcados presente em cada fase foi medida por um contador gama Wizard. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores do coeficiente de partição (*P*) foram determinado pela seguinte fórmula:

$$P = \frac{c(fase.org)}{c(SSF)}$$

onde,

c (fase.org): corresponde à atividade de contagens na amostra de n-octanol.

c (SSF): corresponde à atividade de contagens na amostra de solução salina fisiológica (0,9% NaCl).

O logaritmo decimal desse parâmetro ($\log P$) também foi calculado.

4.4 Ensaios *in vitro* e *in vivo*

4.4.1 Quantificação dos radiometabólitos do [^{18}F]FBNA e sua distribuição no sangue

A solução de radiotraçador (~20 MBq [^{18}F]FBNA) em ~ 7% EtOH/solução salina foi injetada intravenosamente em camundongos BALB/c fêmeas saudáveis sob anestesia com isoflurano (1-1,8%). Amostras de sangue da veia da cauda (20-40 μL) foram coletadas aos 5, 15, 30, 45 e 60 min após a injeção. O soro foi separado das células do sangue por centrifugação (5 min, 13000g) e coletado para um tubo novo. Em seguida, as proteínas plasmáticas foram precipitadas do soro usando metanol (100 μL) e uma segunda etapa de centrifugação (5 min, 13000 g) foi realizada. O plasma (sobrenadante) foi então separado das proteínas plasmáticas (precipitadas) e coletado para um novo tubo.

Para a análise da compartimentalização do [^{18}F]FBNA no sangue, a radioatividade (MBq) do plasma, das proteínas plasmáticas e das células do sangue foram quantificadas utilizando um contador gama WIZARD2 Automatic (PerkinElmer; Waltham, MA, EUA). Os dados foram apresentados como porcentagem de radioatividade total.

Para a análise dos radiometabólitos do [^{18}F]FBNA, o plasma obtido ao longo dos diferentes tempos (5, 15, 30, 45 e 60 min) foi analisado por CCD utilizando placas de sílica gel HF254 (Sigma Aldrich, Canada). As CCD foram desenvolvidas em 50% de AcOEt / hexano e analisadas usando um leitor BAS-5000 (FUJIFILM, Canada). [^{18}F]FBNA tem um valor de R_f de 0,25 neste sistema solvente.

4.4.2 Modelo de câncer gástrico (AGS e MKN45)

4.4.2.1 Ensaios *in vitro*

As linhagens celulares de câncer gástrico MKN45 (American Type Culture Collection (ATCC): Manassas, VALLC e AGS (ATCC CRL-1739) (TAMURA *et al.*, 1996) foram cultivadas em garrafas plásticas de 175 cm^2 , contendo 25 mL de meio de cultura RPMI (Invitrogen). Todas as linhagens foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e uma solução de

antibiótico e antimicótico (Sigma) contendo penicilina (100 U/mL), Streptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (0,025 µg/mL) e mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. As células foram mantidas obedecendo ao seu tempo de crescimento e expansão. Para os ensaios com células foram utilizadas garrafas com confluência de aproximadamente 80-90 %, onde as células foram lavadas com 5 mL de solução PBS, desprendidas com o uso de 5 mL de solução ATV (associação de tripsina versene) e levadas a estufa 37 °C por 3 minutos. Após esse período a solução ATV foi inativada utilizando 5 mL de meio RPMI suplementado. A suspensão de células foi aspirada com o auxílio de uma pipeta sorológica de 10 mL e foi transferida para um tubo do tipo Falcon de 50 mL. Esse tubo, devidamente fechado, foi levado para centrifugação por 3 minutos a 500 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* resultante foi desprendido com leves batidas no tubo e ressuspensionado em meio RPMI. Foram misturados 10 µL da suspensão de células com 10 µL de solução de Tripán Blue 0,4 %, e a mistura transferida a um hemocítômetro para a contagem das células e determinação da viabilidade celular, com o auxílio de um microscópio óptico. Apenas as células refringentes foram consideradas viáveis, e somente amostras com viabilidade superior a 90 % foram utilizadas. O resultado da contagem foi corrigido para o volume total da suspensão, e assim, calculado para o ensaio desejado.

4.4.2.2 Avaliação da captação celular do [¹⁸F]FBNA e [¹⁸F]FAZA em normóxia e hipóxia

Após a contagem do número de células, as linhagens tumorais MKN45 e AGS foram plaqueadas em triplicata a uma densidade de 2 x10⁵ células/poço em uma placa de 6 poços, já com o volume de meio de 2 mL por poço ao final. As placas foram homogeneizadas através de movimentos circulares, a fim de que as células se espalhassem pela área do poço, e levadas à estufa a 37 °C, durante a noite, para aderência das mesmas.

Após o período de adesão, as células foram colocadas em condições de normóxia (21% O₂) mantidas em estufa a 37 °C e, para mimetizar a condição de hipóxia, as células foram mantidas a 37° C com 94% de N₂, 5 % de CO₂ e 1% de O₂ por 48 horas em câmara de hipóxia (Whitley H35 Hypoxystation, Don

Whitley Scientific Ltd, Shipley). Ao final desse tempo de incubação, 0,37 MBq dos radiofármacos [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FBNA foram adicionados a cada poço em um volume de 1 mL. Ao final de 1 e 3 horas de incubação, todas as placas foram processadas da mesma forma, a saber: o meio de cada poço foi retirado com o auxílio de uma micropipeta, e transferido para um tubo de contagem. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e o sobrenadante foi recolhido para um tubo de contador de poços gama. As lavagens também foram recolhidas para o mesmo tubo de contador de poços gama. Em seguida foi adicionado 1 mL de NaOH 0,1 M a cada poço, e as células recolhidas para um novo tubo de contador gama. A atividade em cada tubo foi medida num contador gama Cobra II (Packard, EUA) e os dados obtidos, na forma de contagens por minuto, foram processados em planilha eletrônica do software GraphPad Prism 7.01.

4.4.2.3 Ensaios *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos Balb/c/Nude, de sete a doze semanas de idade e pesando cerca de 23 gramas. Os camundongos foram fornecidos pelo biotério do IPEN - CNEN/SP. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Projeto N.154/15/CEUA-IPEN/USP) (ANEXO A), e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

Os animais foram mantidos no biotério em SPF (Livre de Patógenos Específicos), trocados duas vezes por semana e mantidos sob as seguintes condições experimentais:

- Temperatura ambiente: $22 \pm 2^\circ \text{C}$;
- Iluminação artificial com ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de escuridão;
- Ração e água *ad libitum*.

4.4.2.4 Modelo de camundongos portadores de tumor

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IPEN - CNEN/SP (Projeto N.154/15/CEUA-IPEN/USP).

Os ensaios *in vivo* com [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FBNA foram realizados utilizando o modelo tumoral de câncer gástrico. Para isso, os animais foram inoculados subcutaneamente com 1×10^6 células MKN45 diluídas em PBS no flanco esquerdo. Quando o tumor atingiu cerca de 300 mm^3 (aproximadamente 15 dias), os animais foram separados para estudos de imagem μPET ou de biodistribuição *ex vivo*.

4.4.2.5 Imagem μPET

As imagens para cada radiofármaco (animais, $n=4$) foram realizadas no mesmo animal. Os animais foram anestesiados (isoflurano 2-3% em oxigênio 100%) e posicionados com o tumor no centro do campo de visão do equipamento. A aquisição das imagens foi iniciada após a administração dos radiofármacos por via endovenosa na concentração de $\sim 20 \text{ MBq}/100 \mu\text{L}$ de [^{18}F]FAZA ou [^{18}F]FBNA diluído em solução salina (0.9% NaCl). As imagens PET foram adquiridas aos 10, 30, 60, 120 e 180 minutos após injeção, e registradas usando um campo de visão de 60 mm. Após a aquisição das imagens os animais foram eutanasiados para análise por autorradiografia, conforme detalhado abaixo.

As imagens foram reconstruídas com algoritmo OSEM 3D, 20 iterações e 4 subgrupos. As imagens PET foram analisadas utilizando software pMOD (PMOD[®] Technologies, Zurich). Os dados foram corrigidos e expressos em valores máximos de captação padronizados ($\text{SUV}_{\text{máx}}$).

4.4.2.6 Autorradiografia dos tumores injetados com [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA

Logo após a aquisição de imagem PET (uma, duas e três horas), os animais foram eutanasiados e o tumor coletado. Os tumores foram cortados em criostato (cortes de $40 \mu\text{m}$) e coletados em lâminas histológicas pré-preparadas para receber criocortes. Em seguida, as lâminas com os cortes foram posicionadas sobre uma placa de fósforo e fechados dentro de um cassete para filmes radiológicos por 3 horas, sem exposição à luz. Em seguida foi realizada a leitura da placa de fósforo em equipamento de autorradiografia (GE Healthcare Life Sciences - Typhoon FLA 9500, Alemanha) com resolução de $50 \mu\text{m}$ pixels e

as imagens foram processadas utilizando o programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, EUA).

4.4.2.7 Estudos de biodistribuição *ex vivo*

Células da linhagem tumoral MKN-45 (1×10^6) foram injetadas subcutaneamente em camundongos Balb/c NUDE. Um total de 6 camundongos (3 para [^{18}F]FAZA e 3 para [^{18}F]FBNA) foram utilizados nesse estudo. Os animais foram monitorados e, quando o tamanho dos tumores atingiu cerca de 300 mm^3 (aproximadamente 15 dias), os animais foram injetados na veia da cauda com 20 MBq dos radiofármacos. Após 60 minutos da administração, o sangue, o tumor e os principais órgãos foram removidos, pesados em balança analítica e a atividade foi medida num contador gama. A porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) foi determinada para cada amostra e a radioatividade das amostras dos órgãos foi calibrada utilizando uma alíquota do radiofármaco de concentração conhecida.

5 RESULTADOS

5.1 [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO

Inicialmente, procedeu-se à radiosíntese e caracterização dos radiofármacos [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO para servirem como padrão de comparação com o novo radiofármaco a ser estudado, o ^{18}F -FBNA. Ambos [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO foram preparados, com algumas modificações, segundo o procedimento descrito na literatura (SORGER *et al.*, 2003; HAYASHI *et al.*, 2011; KURIHARA *et al.*, 2012). A rota de radiosíntese para a obtenção do [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO estão representadas no esquema 1 e 2 respectivamente, descrito na seção 4.2.1. Os produtos [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO foram purificados utilizando um cartucho de fase reversa C18 Plus. Após a eluição dos produtos com etanol (1 mL) e a evaporação do solvente, a obtenção dos compostos foi confirmada após análise por CLAE comparando os resultados com os tempos de retenção dos respectivos compostos padrões. O [^{18}F]FAZA apresentou um tempo de retenção (T_r) de $5,91 \pm 0,7$ min (Figura 12), semelhante ao seu padrão com $T_r = 5,96 \pm 0,9$ min (Figura 13) e o [^{18}F]FMISO apresentou um $T_r = 8,47 \pm 0,7$ min (Figura 14) e o seu padrão um $T_r = 8,68 \pm 0,6$ min (Figura 15), resultados esperados confirmando a identidade dos compostos marcados com seus respectivos compostos padrões

A pureza radioquímica dos radiofármacos [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO também foi analisada e mostrou ser superior a 95% para ambos radiofármacos. O pH da solução final em 1 mL de volume foi de 7,2. O rendimento radioquímico do [^{18}F]FAZA ao final da reação foi de $40,1 \pm 7,2$ %, com um tempo total da radiosíntese de 90 minutos. Em um experimento típico, cerca de 3,9 GBq de fluoreto [^{18}F] obtido antes da reação com o precursor foram convertidos em 0,7 GBq de [^{18}F]FAZA dentro de um tempo de radiosíntese total de cerca de 90 min.

Para o [^{18}F]FMISO o rendimento radioquímico foi de $33,7 \pm 7,2$ %, com um tempo total da radiosíntese de 100 minutos. Em um experimento típico, cerca de 3,7 GBq de fluoreto [^{18}F] foram convertidos em 0,5 GBq de [^{18}F]FMISO com um tempo de radiosíntese total de cerca de 100 min. A atividade molar de ambos radiofármacos variou de 2,8 a 3,7 GBq/ μmol .

Figura 12 - Perfil de análise por CLAE do [^{19}F]FAZA (padrão). O cromatograma do [^{19}F]FAZA obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), gradiente 10-100% (B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 20 min e monitorado por um detector de UV com comprimento de onda de 300 nm. Tr de [^{19}F]FAZA = 5,91 $\pm$ 0,7 min.

Fonte: Autor da tese

Figura 13 - Perfil de análise por CLAE do [^{18}F]FAZA purificado. O radiocromatograma do [^{18}F]FAZA obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), gradiente 10-100% (B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 20 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de [^{18}F]FAZA = Tr. 5,96 $\pm$ 0,9 min.

Fonte: Autor da tese

Figura 14 - Perfil de análise por CLAE do [^{19}F]FMISO (padrão). O cromatograma do [^{19}F]FMISO obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), gradiente 10-100% (B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 20 min e monitorado por um detector de UV com comprimento de onda de 300 nm. Tr de [^{19}F]FMISO = $8,47 \pm 0,7$ min.

Fonte: Autor da tese

Figura 15 - Perfil de análise por CLAE do [^{18}F]FMISO purificado. O radiocromatograma do [^{18}F]FMISO obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), gradiente 10-100% (B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 20 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de [^{18}F]FMISO = Tr. $8,68 \pm 0,6$ min.

Fonte: Autor da tese

Apesar da radiossíntese ter sido manual, os dados obtidos para o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ foram bons, com purezas radioquímicas > 95 % obtido em um curto tempo de radiossíntese (menor que duas horas). Os valores de atividades molares, tendo o método manual para a preparação destes radiofármacos, foram aceitáveis e os rendimentos radioquímicos obtidos foram acima de 30%. As quantidades de $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ obtidos foram suficientes para os estudos biológicos posteriores.

5.2 Síntese do composto N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida [FBNA]

5.2.1 Química

5.2.1.1 Síntese do ácido 2-nitroimidazol acético

Inicialmente começamos com a síntese do material de partida, o ácido 2-nitroimidazol acético **1** (Figura 16). Esse produto foi obtido pela reação de adição nucleofílica entre o etil-2-bromoacetato e o 2-nitroimidazol na presença da base K_2CO_3 , seguido de uma segunda etapa de clivagem do éster etílico intermediário, com a utilização de NaOH (Esquema 1). A reação resultou na formação de um produto sólido amarelo, o qual foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) (ANEXO B) e Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) (ANEXO C) que confirmaram a estrutura química do composto. Os dados do ^1H -RMN e ESI-MS são reportados abaixo.

Composto 1: Rendimento 69,5 % (210 mg; 1,23 mmol); Rf 0,2 (DCM: MeOH 9: 1 v:v). **^1H -RMN**; δ_{H} (CD_3OD , 300 MHz,) 7,4 (s, 1H, CH -imidazol), 7,1 (s, 1H, CH -imidazol), 3,3 (s, 2H, OCH_2 -imidazol), 11,9 (s, 1H, OH). **ESI-MS**, calculado para $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_4\text{H} \cdot [\text{M}+\text{H}]^+$: 170,0207, encontrado: 170,0206.

Os resultados obtidos estão de acordo com os reportados por outros autores para este composto (GARIÉPY *et al.*, 2002), evidenciado por um singlete (Hidrogênio ligado ao oxigênio do grupo Hidroxila) pela análise de ^1H -RMN em 11,9 ppm, e característico para este tipo de composto.

Figura 16- Estrutura química do ácido 2-nitroimidazol acético **1**.

Fonte: Autor da tese

5.2.1.2 Síntese do 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (**2**)

Com o objetivo de obter um novo precursor para a futura radiossíntese, partindo do material de partida **1**, foi sintetizado e caracterizado o composto 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato, **2** (Figura 17). No final da reação foi obtido o NHS-éster, nomeadamente N-hidroxissuccinimida, por uma adição nucleofílica entre o derivado do ácido carboxílico **1** e o derivado N-succinimidil na presença de TSTU, amplamente utilizada na literatura para a obtenção deste tipo de compostos (WILCHEK *et al.*, 1994). A reação ocorreu na presença de Na_2CO_3 e refluxo a 50 °C durante 3 horas, e levou à obtenção do produto puro como um óleo amarelo após purificação por coluna. O composto teve sua estrutura química confirmada por Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) (ANEXO D), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN) (ANEXO E), e Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) (ANEXO F). Os dados do ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e ESI-MS são reportados a seguir:

Composto 2: Rendimento 65,5% (42 mg; 0,16 mmol) ; $R_f = 0,5$ (DCM: MeOH 9:1 v:v). ^1H -RMN, $\delta_H(\text{CD}_3\text{OD}, 300 \text{ MHz})$ 7,4 (d, $J = 1,0 \text{ Hz}$, 1 H, CH-imidazol), 7,1 (d, $J = 1,1 \text{ Hz}$, 1 H, CH-imidazol), 4,9 (s, 2 H, $\text{OCH}_2\text{-imidazol}$), 2,6 (s, 4 H NHS(grupo)). ^{13}C -RMN, $\delta_C(\text{CD}_3\text{OD}, 100 \text{ MHz})$, 178,8 (C quat. $\text{C=OCH}_2\text{-imidazol}$), 172,5 (C quat. C=O NHS(grupo)), 128,7 (CH-imidazol), 127,5 (CH-imidazol), 52,5 (C quat. C-NO_2), 38,6 ($\text{CH}_2\text{-imidazol}$), 25,8 (CH NHS(grupo)). **ESI-MS** calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_6\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 290,0336, encontrado: 290,0334.

Figura 17- Estrutura química do 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato, **2**.

Fonte: Autor da tese

O composto **2** foi obtido com um rendimento químico > 60 % em um curto tempo de síntese, cerca de três horas. No espectro de ^1H -RMN, foram mostrados grupos de sinais que integram todos os prótons na molécula. Na região alifática (4,5-5,2 ppm), a não equivalência dos hidrogênios do grupo succinimido foi observada como um singlete a 4,9 ppm, e no grupo 2-Nitroimidazol(-NO₂) (7,1-7,4 ppm) são observados os dois hidrogênios correspondentes ao grupo -NO₂. No espectro de ^{13}C -RMN, a estrutura do composto foi corroborada pela detecção de todos os sinais dos átomos de carbono da molécula. O sinal a 178,8 ppm corresponde aos átomos de carbono carbonil do grupo succinimido e o de 25,8 ppm corresponde aos dois átomos de carbono metileno do grupo succinimido. Finalmente, a estrutura foi verificada através do seu espectro de massa ESI-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 290 \text{ m/z}$. A caracterização do composto utilizando as três técnicas de análises químicas permitiu sua utilização como precursor para radiossíntese do novo radiofármaco.

5.2.1.3 Síntese do [^{19}F]FBNA

O composto padrão “frio” do novo radiotraçador para hipóxia, [^{19}F]FBNA (N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida) (**3**) (Figura 18), foi sintetizado pela reação de amidação do reagente comercial 4-fluorobenzil amina e o derivado de ácido carboxílico, material de partida **1**. O EDC (cuja função é ativar o grupo carboxila do ácido carboxílico e para ajudar no acoplamento ao grupo amino) e o DMAP (catalisador orgânico de baixo peso molecular) foram usados na obtenção do composto final. Após 5 horas de reação, o produto foi purificado em coluna cromatográfica em sílica-gel e obtido como um sólido amarelo. A estrutura química do composto [^{19}F]FBNA foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) (ANEXO G), Ressonância

Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN) (ANEXO H), e Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) (ANEXO I). Os dados do ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e ESI-MS são reportados a seguir:

Composto 3: Rendimento 41,3% (20,1 mg; 0,07 mmol) ; Rf = 0,3 (DCM: MeOH 9: 1 v:v). **^1H -RMN.** δ_{H} (CD_3OD , 300 MHz,) 8,8 (s, 1 H, *NH*), 7,6 (dd, $J = 1,1$ Hz, 2,3 Hz, 1H, *CH*-imidazol), 7,3 (ddd, $J = 2,7$ Hz, 5,1 Hz, 8,0 Hz, 2H, *Ph*), 7,1 (m, 3 H, *Ph*, *CH*-imidazol), 5,2 (s, 2H, OCH_2 -imidazol), 4,2 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$). **^{13}C -RMN.** δ_{C} (CD_3OD , 100 MHz), 166,2 (Cquat. C=O), 162,5 (Cquat. C-F), 160,9 (Cquat. *C*-imidazol), 135,5 (*CH*-imidazol), 129,7 (*CH*-*Ph*), 129,3 (*CH*-*Ph*), 127,9 (*CH*-*Ph*), 115,6 (*CH*-*Ph*), 52,1($-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 42,1($-\text{CH}_2\text{-imidazol}$). **ESI-MS** calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{O}_3[\text{M}+\text{H}]^+$: 279,0815, encontrado: 279,0886.

Figura 18- Estrutura química do N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida, [^{19}F]FBNA (**3**)

Fonte: Autor da tese

O composto **3** foi obtido com um tempo de síntese de 5 horas e com um rendimento químico maior que 40% correspondendo a uma quantidade total de 10 mg. Essa quantidade foi o suficiente para estudos radioquímicos posteriores, considerando que, ao caracterizar qualquer composto marcado com seu padrão, as quantidades necessárias deste último foram muito pequenas (~ 1 mg) em termos de massa. A caracterização química do **3** no espectro ^1H -RMN, mostraram todos os sinais dos hidrogênios correspondentes ao composto. Entre eles, destacou-se o sinal do grupo a 8,1 ppm correspondente ao próton do grupo amino. Os diferentes sinais dos grupos metileno da região alifática, na forma de dupletos, apareceram nos intervalos de 5,2 a 4,2 ppm. Na região aromática e do imidazol (7,1-7,6 ppm) os quatro hidrogênios correspondentes ao anel aromático e ao 2-Nitroimidazol foram observados. No espectro de ^{13}C -RMN todos os sinais dos átomos de carbono da molécula apareceram. Os sinais mais relevantes que corroboram a estrutura foram aqueles que correspondem aos grupos metileno do

composto, assim a 42,1 ppm aqueles pertencentes a $-CH_2\text{-imidazol}$ e a 52,1 ppm apareceram os correspondentes a $CH_2\text{-Ph}$. O sinal correspondente à ligação carbono-flúor foi encontrado a 162,5 ppm. Finalmente, a estrutura foi verificada através do espectro de massa ESI-MS $[M+H]^+ = 279$ m/z.

Após a síntese, além da identificação e caracterização do composto por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e ESI-MS, também foi estudada a pureza química por CLAE em fase reversa, conforme descrito na seção 4.4 (Figura 19).

Figura 19- Perfil de análise por CLAE do $[^{19}\text{F}]$ FBNA (padrão). O cromatograma do $[^{19}\text{F}]$ FBNA obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30 % (B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de UV com comprimento de onda de 300 nm. Tr de $[^{19}\text{F}]$ FBNA = $15,21 \pm 0,3$ min.

Fonte: Autor da tese

O resultado do cromatograma mostrou uma pureza química de $97,2 \pm 1,2\%$ com um $\text{Tr} = 15,21 \pm 0,3$ min. Além disso, o tempo de retenção na fase móvel utilizada foi estabelecido para servir de comparação com o composto radiomarcado $[^{18}\text{F}]$ FBNA. Os compostos foram sintetizados e caracterizados por diferentes técnicas analíticas com elevados valores de pureza química, rendimento químico e em quantidades suficientes para os posteriores estudos radioquímicos e biológicos.

5.2.2 Radioquímica

5.2.2.1 Radiossíntese do [^{18}F]4-Fluorobenzilamine [^{18}F]FBA

Com o objetivo de obter o novo radiofármaco para hipóxia, contendo o grupo 2-Nitroimidazol, o [^{18}F]FBA, iniciaram-se os estudos de padronização da radiossíntese do [^{18}F]FBA, conforme representado no esquema 6, descrito na seção 4.3.2.1.

O primeiro passo para a radiossíntese do [^{18}F]FBA envolveu a radiossíntese do 4-[^{18}F]fluorobenzonitrila [^{18}F]FBN, que foi facilmente preparado pela reação do precursor trifluorometanossulfonato de 4-ciano-N, N, N-trimetilanilínio com o agente de radiofluoração nucleofílica [^{18}F]KF (gerado pelo tratamento do fluoreto [^{18}F] produzido em ciclotron com Kryptofix 2.2.2/ K_2CO_3) em CH_3CN . Após a adição de água (20 mL), a mistura de reação foi purificada através de um cartucho de fase reversa Plus C-18 Sep-Pak por extração em fase sólida. O [^{18}F]FBN foi obtido com altos rendimentos radioquímicos (> 80%, corrigido por decaimento) e alta pureza radioquímica (superior a 95%). Em seguida, o boro-hidreto de sódio, em combinação com NiCl_2 (utilizado como sal de metal de transição), foram usados para reduzir o grupo nitrila do [^{18}F]FBN gerando o [^{18}F]FBA. Para este propósito, o [^{18}F]FBN foi eluído com 1 mL de THF do cartucho Plus C-18 em vários frascos de reações contendo diferentes quantidades de NaBH_4 e NiCl_2 . As reações foram realizadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Diferentes concentrações de NaBH_4 e NiCl_2 antes da purificação do produto foram utilizados para padronizar a reação de redução de [^{18}F]FBN para [^{18}F]FBA e as quantidade testadas assim como o rendimento radioquímico, determinado por CLAE, do [^{18}F]FBA encontram-se resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 – Quantidades de NaBH_4 e NiCl_2 testadas para a redução de $[^{18}\text{F}]\text{FBN}$ para $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$. O rendimento radioquímico do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ foi calculado através dos radiocromatogramas obtidos por CLAE e são representativos de ($n=3$). A CLAE foi realizada utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30 %(B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ = Tr. $6,59 \pm 0,3$ min

Experimento (n=3)	NaBH_4 (mg)	NiCl_2 (mg)	Relação Molar ($n(\text{NaBH}_4) / n(\text{NiCl}_2)$)	Rendimento radioquímico do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ (%)
1	5	5	3,4	79,2
2	10	5	6,8	56,1
3	5	10	1,7	41,5
4	20	10	6,8	53,9
5	25	20	4,3	61,7

Fonte: Autor da tese

A condição testada que melhor reduziu o $[^{18}\text{F}]\text{FBN}$ para $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$, foi obtida usando 5 mg de NaBH_4 e 5 mg de NiCl_2 (relação molar 3,4) (experimento 1, Tabela 3) em um tempo de reação de 10 minutos à temperatura ambiente em 1 mL de THF. Nesta condição, obteve-se um rendimento radioquímico de $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ acima do 75 % ($79,2 \pm 1,4$ %) (Tabela 3 e Figura 20). Por outro lado, uma redução da relação molar para 1,7 (experimento 3, Tabela 3) resultou em uma queda significativa no rendimento radioquímico ($< 47,6$ %) em comparação com o experimento 1 da Tabela 3, indicando que a redução do $[^{18}\text{F}]\text{FBN}$ foi incompleta. Uma explicação possível para a reação incompleta na presença de grandes quantidades de NiCl_2 (experimentos 2 e 5, Tabela 3) é a fixação de grandes quantidades da sal NiCl_2 formada nas paredes de vidro que o torna indisponível para a reação de redução do $[^{18}\text{F}]\text{FBN}$ para $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$.

Figura 20 - Perfil de radioatividade obtido da análise por CLAE da mistura bruta antes da purificação do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ ($n=3$), usando 5 mg do $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$ (relação molar 3,4) por 10 minutos à temperatura ambiente em 1 mL de THF. A CLAE foi realizada utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30 %(B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ = Tr. $6,59 \pm 0,3$ min.

Fonte: Autor da tese

Após padronização das melhores condições de redução do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$, a radiosíntese prosseguiu com a purificação do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ através de um cartucho de fase reversa Plus C-18 Sep-Pak por extração em fase sólida, eluído do cartucho com THF (1,0 mL). O produto final ($[^{18}\text{F}]\text{FBA}$) foi identificado por CLAE através da comparação do perfil de eluição (mesmo tempo de retenção) com o composto padrão $[^{19}\text{F}]\text{FBA}$ (Figura 21, Tr. = $6,56 \pm 0,3$ min). O rendimento radioquímico total da radiosíntese foi de $62,6\% \pm 12\%$ ($n = 5$), corrigido com base no decaimento do $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. A pureza radioquímica do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ foi determinada por CLAE e verificou-se ser maior que 90% (Figura 22, Tr. = $6,71 \pm 0,3$ min). A atividade molar de $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ foi determinada pela injeção de 0,37 MBq (quantidade limite de atividade de detecção em nosso sistema de CLAE) de atividade no sistema de CLAE, e não foi detectado nenhum pico UV de 4-fluorobenzilamina correspondente. Em nosso sistema de CLAE, o limite de detecção para 4-fluorobenzilamina foi determinado em 5 μg e o resultado da atividade molar estimada para o $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ foi de pelo menos $3,5 \pm 1,2$ % GBq/ μmol . Em um experimento típico, foram comumente utilizados 5,6 GBq de

fluoreto $[^{18}\text{F}]^-$ que deram origem a 1,8 GBq de $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$, em um tempo de radiosíntese total de cerca de 60 min.

Figura 21 – Perfil de análise por CLAE do $[^{19}\text{F}]\text{FBA}$ (padrão). O cromatograma do $[^{19}\text{F}]\text{FBA}$ obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 ($5\ \mu\text{m}$, $4.6 \times 250\ \text{mm}$). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30 %(B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de UV com comprimento de onda de 300 nm. Tr de $[^{19}\text{F}]\text{FBA} = 6,56 \pm 0,3\ \text{min}$.

Fonte: Autor da tese

Figura 22 – Perfil de análise por CLAE do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ purificado. O radiocromatograma do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 ($5\ \mu\text{m}$, $4.6 \times 250\ \text{mm}$). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30 %(B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de $[^{18}\text{F}]\text{FBA} = \text{Tr. } 6,71 \pm 0,3\ \text{min}$.

Fonte: Autor da tese

5.2.2.2 Radiossíntese do [^{18}F]-N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida [^{18}F]FBNA

Como reportado até agora, a radiossíntese do [^{18}F]FBNA iniciou-se com a radiossíntese de [^{18}F]FBA, de acordo com a redução de NaBH_4 assistida com NiCl_2 . A obtenção do [^{18}F]FBNA está representada no esquema 7, descrito na seção 4.3.2.2.

Após a purificação e caracterização, o [^{18}F]FBA foi adicionado a 5 mg do precursor 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (**2**) diluído em DMSO (200 μL) e 50 μL de N-metil-morfolina em THF (200 μL). Sem o uso de N-metil-morfolina como base auxiliar, não foi observada formação de produto final, o que se encontra de acordo com resultados reportados na literatura para outras reações de acilação entre o [^{18}F]FBA e outros derivados de N-hidroxissuccinimida (KOSLOWSKY *et al.*, 2010) na obtenção de radiofármacos.

Em seguida foi avaliado o efeito da temperatura no rendimento da radiossíntese do [^{18}F]FBNA. Para isso, o [^{18}F]FBNA foi sintetizado a temperatura ambiente, 50, 80 ou 100 $^{\circ}\text{C}$ por um tempo constante de 10 min e a mistura reacional bruta foi injetada no sistema de CLAE. A porcentagem de [^{18}F]F livre, [^{18}F]FBA e [^{18}F]FBNA foi obtida diretamente a partir do radiocromatograma. Pela observação dos radiocromatogramas obtidos por CLAE (Figura 23), podemos verificar que à temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$) o produto [^{18}F]FBNA foi obtido com o rendimento mais baixo de todas as condições testadas, apenas 42%, e, ainda apresenta o material de partida [^{18}F]FBA (Figura 23, **A**). Os melhores resultados foram obtidos à temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$ no qual o rendimento radioquímico para o [^{18}F]FBNA foi >85% (Figura 23, **B**). A uma temperatura de 80 $^{\circ}\text{C}$, observou-se uma degradação do [^{18}F]FBNA, com o surgimento de um novo pico com tempo de retenção de $6,58 \pm 0,3$ min e um rendimento radioquímico do [^{18}F]FBNA de apenas 55% (Figura 23, **C**). Quando a reação foi realizada a uma temperatura de 100 $^{\circ}\text{C}$, > 90% da mistura reacional correspondeu ao produto degradado (Figura 23, **D**).

Dessa forma, todas as radiossínteses subsequentes do [^{18}F]FBNA foram realizadas pela adição de [^{18}F]FBA com 5 mg do precursor diluído em DMSO (200 μL) e 50 μL de N-metil-morfolina em THF (200 μL) sob agitação por 10 minutos a 50 $^{\circ}\text{C}$.

Figura 23 – Perfil de radioatividade obtido da análise por CLAE da mistura bruta mostrando o efeito da temperatura na radiosíntese do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$. Para os testes foram utilizadas 5 mg do precursor com $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ e a reação ocorreu por 10 min à **(A)** temperatura ambiente, **(B)** 50 °C, **(C)** 80 °C e **(D)** 100 °C. Os radiocromatogramas foram obtidos pela injeção da mistura bruta, sem purificação do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ (n=3) utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30 % (B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ = Tr. $15,1 \pm 0,3$ min.

Fonte: Autor da tese

Após a padronização da melhor temperatura de radiosíntese para a obtenção do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$, prosseguiu-se com a purificação do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ através de um cartucho de fase reversa Plus C-18 Sep-Pak. O $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ retido na coluna foi eluído com etanol (1 mL) e, o solvente foi completamente evaporado. Essa secagem foi necessária para concentrar o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ produzido, aumentar a atividade em um menor volume e, para posterior aplicação em estudos biológicos. O produto final $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ foi identificado por CLAE (Figura 24) e apresentou um Tr = $15,15 \pm 0,6$ min, com um tempo de retenção semelhante ao obtido com o composto padrão $[^{19}\text{F}]\text{FBNA}$ mostrado na figura 19 (Tr = $15,21 \pm 0,3$ min). A atividade molar de $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ foi determinada pela injeção de 0,37 MBq de

$[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ no sistema de CLAE, e não foi detectado nenhum pico UV de composto padrão $[^{19}\text{F}]\text{FBNA}$ correspondente. O pH da solução final em 300 μL de PBS (0,1 M) foi de 7,2. A atividade molar de $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ foi de pelo menos 1,2 a 2,1 GBq/ μmol (suficiente para os estudos biológicos), e o rendimento radioquímico foi de $23,4\% \pm 5,2\%$ ($n = 5$), corrigido com base no decaimento do $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. A pureza radioquímica determinada por CLAE excedeu 95%. Numa experiência típica, 3,9 GBq de fluoreto $[^{18}\text{F}]^-$ foram convertidos em 0,3 GBq de $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ dentro de um tempo de radiosíntese total de cerca de 100 min.

Figura 24 – Perfil de análise por CLAE do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ purificado. O radiocromatograma do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30%(B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ = Tr. $15,15 \pm 0,3$ min.

Fonte: Autor da tese

Sumarizando, os compostos $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ foram obtidos com elevadas purezas radioquímicas $> 90\%$, com tempos curtos de radiosínteses, valores aceitáveis de atividade molar para os métodos de preparação manual, rendimentos radioquímicos acima dos 30% e em quantidades suficientes para os estudos biológicos.

5.2.3 Análise da estabilidade do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ em solução salina e soro

Avaliar a estabilidade dos radiofármacos marcados é um dos parâmetros mais imprescindíveis para determinar se um fármaco tem potencial

para ser usado para aplicações *in vivo* ou não. Neste trabalho foi avaliada a estabilidade do novo radiofármaco [^{18}F]FBNA em uma solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) (Figura 25) e em soro de camundongo (Figura 26), por um período de até 6 horas. Dessa forma, logo após a radiossíntese, 3,7 MBq do [^{18}F]FBNA diluído em 500 μL de NaCl 0,9% foi incubado por 0, 1, 3 e 6 horas à temperatura ambiente. Após esses intervalos, 0,5 MBq das amostras para cada tempo foram analisadas por CLAE para determinar a porcentagem de [^{18}F]FBNA remanescente nas amostras ao longo do tempo.

Da mesma forma, para os estudos de estabilidade em soro de camundongo, 3,7 MBq de [^{18}F]FBNA diluído em 50 μL de NaCl 0,9% foi incubado com 450 μL de soro de camundongo nos mesmos intervalos de tempo que o estudo em salina. As amostras foram incubadas a 37 °C e ao longo dos tempos de estudos, alíquotas de 100 μL foram retiradas e as proteínas séricas foram precipitadas pela adição de 100 μL de acetonitrila seguido de centrifugação (5000 g, por 10 min). O sobrenadante (plasma) foi injetado no sistema CLAE para a avaliação da pureza radioquímica do [^{18}F]FBNA.

Figura 25 - Perfil de radioatividade obtido da análise por CLAE da estabilidade do [^{18}F]FBNA durante o tempo inicial **(A)** e durante 6 horas **(B)** em solução salina fisiológica (NaCl 0,9 %). O radiocromatograma do [^{18}F]FBNA obtido por CLAE é representativo de (n=3) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30 %(B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de [^{18}F]FBNA = Tr. $15,17 \pm 0,6$ min.

Fonte: Autor da tese

Figura 26 - Perfil de radioatividade obtido da análise por CLAE da estabilidade do [^{18}F]FBNA durante o tempo inicial (**A**) e durante 6 horas (**B**) em soro de camundongo. O radiocromatograma do [^{18}F]FBNA obtido por CLAE é representativo de ($n=3$) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH_3CN (B), isocrático 70(A):30%(B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de radiação. Tr de [^{18}F]FBNA = Tr. 15,20 $\pm$ 0,6 min.

Fonte: Autor da tese

Como é possível observar nas Figuras 25 e 26, o [^{18}F]FBNA, nos períodos estudados, permaneceu estável por até 6 horas tanto para os estudos realizados utilizando solução salina à temperatura ambiente (Figura 25) quanto para os estudos feitos com soro a 37 °C (Figura 26). Os valores de pureza radioquímica foram superiores a 95% até às seis horas em cada uma das condições estudada. As porcentagens de outras impurezas como [^{18}F]F livre e outros produtos como o [^{18}F]FBA foram praticamente indetectáveis para cada intervalos de tempo com valores inferiores a 1,4 $\pm$ 0,3 %.

Outros parâmetros, como a característica da solução e o pH também foram estudados. Verificou-se que o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ se apresentou como uma solução límpida e incolora quando incubado em solução salina e manteve um pH entre 6,8-7,2 tanto em salina quanto em soro.

Concluindo, esses resultados demonstram que o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ é estável por um período de até seis horas em solução salina e em soro de camundongo, mantendo parâmetros como pureza radioquímica, pH e características físico-químicas inalteráveis ao longo do tempo.

5.2.4 Determinação do coeficiente de partição (P e $\log P$)

O coeficiente de partição (P) ideal para um agente de hipóxia é objeto de debate até aos dias de hoje. O coeficiente de partição é definido como a relação das concentrações da substância em um solvente orgânico e em água, dado que ambos os solventes são necessariamente imiscíveis. Dessa forma, quanto maior o valor de P , mais lipofílico é o radiofármaco e maior a afinidade do composto pela fase orgânica (oleosa), isto é, maior a facilidade deste fármaco de atravessar as membranas plasmáticas constituídas de uma bicamada lipídica. Para calcular o coeficiente de partição, o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ foi adicionado a uma mistura de n-octanol e solução salina fisiológica (0,9% NaCl) (1:1) de acordo com o método descrito na seção 4.3.5. A atividade presente na fase orgânica (n-octanol) e na fase aquosa (salina) foi medida e o coeficiente de partição foi calculado. Este estudo foi também realizado para os radiofármacos $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ para efeitos de comparação. O P e $\log P$ obtidos para o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$, $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Coeficiente de partição de $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$. Comparação com $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$.

Radiofármaco	Coeficiente de partição (P)	Coeficiente de partição ($\log P$)
$[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$	$1,12 \pm 0,09$	0,05
$[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$	$0,37 \pm 0,08$	- 0,43
$[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$	$2,29 \pm 0,12$	0,36

Fonte: Autor da tese

Como é possível observar na Tabela 4, o novo composto [^{18}F]FBNA ($\log P = 0,05$) é mais hidrofílico que o [^{18}F]FMISO ($\log P = 0,36$) mas menos hidrofílico que o [^{18}F]FAZA ($\log P = -0,43$), resultados dos compostos padrões semelhantes aos reportados por outros autores (FLEMING *et al.*, 2015). Estes dados sugerem que o [^{18}F]FBNA possa superar uma das limitações descritas para o [^{18}F]FMISO, a sua alta lipofilicidade, que leva ao seu acúmulo lento nos locais hipóxicos e a uma depuração plasmática lenta originando imagens de baixo contraste (tumor-fundo). Em comparação com o [^{18}F]FAZA espera-se uma captação mais rápida nas células tumorais em condições de hipóxia para tempos menores de estudo e, uma maior proporção tumor-sangue e tumor-músculo em estudos clínicos e pré-clínicos.

5.3 Avaliação Biológica

5.3.1 Quantificação da distribuição e dos radiometabólitos do [^{18}F]FBNA no sangue

Após a injeção de radiofármacos na corrente sanguínea, a sua ligação às proteínas plasmáticas desempenha um papel importante na determinação da biodistribuição, taxa de eliminação, circulação sanguínea, acesso ao local alvo e metabolismo do traçador. Alguns radiofármacos têm associação limitada com os constituintes do sangue quando administrados, enquanto outros se associam ou se ligam à albumina, lipoproteínas e eritrócitos. O radiofármaco ligado às proteínas plasmáticas possui uma maior dificuldade em atravessar o endotélio vascular e penetrar nos tecidos. A maioria dos radiofármacos mostra algum grau de ligação às células sanguíneas; no entanto, o equilíbrio os estados ligado e livre no plasma é alcançado rapidamente. Se um radiofármaco é altamente lipofílico, a sua ligação às proteínas plasmáticas é aumentada, reduzindo assim a sua disponibilidade para entrar nos tecidos de interesse (JEGHERS *et al.*, 1990). Em Medicina Nuclear, é essencial o entendimento e a quantificação deste fenômeno, de maneira a antecipar o comportamento *in vivo* dos radiotraçadores.

Dessa forma, avaliamos a distribuição e a produção de radiometabólitos do [^{18}F]FBNA após a sua injeção em camundongos saudáveis. Para realizar este estudo, 20 MBq de [^{18}F]FBNA em 100 μL de solução salina foram injetados intravenosamente em camundongos BALB/c saudáveis e

amostras de sangue foram coletadas ao final de 5, 15, 30, 45 e 60 min pós-injeção (p.i.). Após cada intervalo, as células, proteínas e plasma sanguíneo foram separados por centrifugação e precipitação, e a radioatividade de cada fração foi medida através de um contador gama. A distribuição de radioatividade do [^{18}F]FBNA no sangue demonstrou ser estável ao longo dos 60 min analisados (Figura 27). A porcentagem de ligação do [^{18}F]FBNA nas células do sangue foi de cerca de 60% até 60 min. Apenas cerca de 5% da radioatividade total foi encontrada ligada às proteínas do sangue nos tempos estudados e a radioatividade no plasma ao longo do tempo foi de cerca de 40%.

Figura 27 - Distribuição de radioatividade no sangue de camundongos saudáveis após injeção de [^{18}F]FBNA. Três camundongos Balb/c saudáveis foram injetados intravenosamente com 30 MBq de [^{18}F]FBNA. Aos 5, 15, 30, 45 e 60 min p.i., uma alíquota de sangue foi coletada e processada. A atividade presente nas células sanguíneas, proteínas e plasma foi quantificada, e os dados foram normalizados como a porcentagem de radioatividade total e mostrados como média $\pm$ DP de $n = 3$ experimentos.

Fonte: Autor da tese

Outro parâmetro estudado foi a geração radiometabólitos após a injeção do [^{18}F]FBNA *in vivo*. Atualmente é sabido que os radiotraçadores administrados por via intravenosa são imediatamente expostos a processos biológicos que começam a metabolizar os radiotraçadores, de modo que a fração de radioatividade presente no sangue como radiotraçador inalterado diminui

rapidamente. Os radiometabólitos geralmente são menos lipofílicos que o radiotraçador original. Um radiotraçador considerado ideal não deveria sofrer nenhuma alteração metabólica; no entanto, alguns metabólitos gerados realmente se ligam de maneira mais eficiente ao receptor alvo ou a outro alvo. É imperativo que os radiometabólitos após a administração de um radiotraçador *in vivo* sejam avaliados para garantir que análises biomatemáticas apropriadas e cinética da ligação do ligante ao respectivo alvo possam ser determinadas.

Para isso, o plasma coletado no experimento anterior foi submetido à análise por CCD e através da análise deste, foi calculada a percentagem de radiometabólitos originados do [^{18}F]FBNA após sua injeção *in vivo*. Pela observação da Figura 28 podemos verificar uma redução na percentagem do [^{18}F]FBNA intacto no plasma dos animais ao longo do tempo, com uma diminuição de 83% aos 5 min p.i. para 68% aos 60 min p.i. A diminuição no plasma do radiofármaco intacto é comumente observada e dever-se em parte ao aumento da sua eliminação ao longo do tempo. Além disso, foi observada a geração de dois radiometabólitos, denominados 1 e 2 na Figura 28, cuja porcentagem aumenta ao longo do tempo no plasma dos animais. O radiometabólito 1 corresponde ao [^{18}F] e pôde ser detectado cerca de 5 min após a injeção, aumentando até o período de 60 min. A presença crescente do [^{18}F] pode ser devida a processos de desfluorinação do [^{18}F]FBNA ao longo do tempo. A porcentagem do radiometabólito 2, por outro lado, aumenta discretamente no plasma 15 min após a injeção no animal até ao tempo de 60 min. Este radiometabólito (2) não foi identificado, nem caracterizado mas, pelas características da molécula [^{18}F]FBNA, acreditamos que possa ter sido originado pela hidrólise no átomo de nitrogênio do grupo amino da molécula [^{18}F]FBNA, originando o radiometabólito [^{18}F]FBA, visto que essa ligação amida ser suscetível a reações de hidrólise por proteases.

Nossos dados demonstram que a atividade encontrada no plasma (Figura 27) corresponde ao [^{18}F]FBNA (70% ao final de 1 hora) e a dois radiometabólitos. É conhecido que o [^{18}F] livre (radiometabólito 1) poderá ser parcialmente absorvido pelos ossos. Quanto ao radiometabólito 2 ([^{18}F]FBA), pelo fato de ser mais polar que o radiofármaco [^{18}F]FBNA, esperamos que ele seja excretado provavelmente através da depuração renal na urina.

Figura 28 - Geração de radiometabólitos em camundongos saudáveis após injeção de [^{18}F]FBNA. Três camundongos Balb/c saudáveis foram injetados intravenosamente com 30 MBq de [^{18}F]FBNA. Aos 5, 15, 30, 45 e 60 min p.i., uma alíquota do plasma coletada no experimento anterior foi processada. A atividade remanescente do [^{18}F]FBNA, do radiometabólito 1 e 2 foram quantificadas, e os dados foram normalizados como a porcentagem de radioatividade total e mostrados como média $\pm$ DP de $n = 3$ experimentos.

Fonte: Autor da tese

5.3.2 Estudo biológicos com os modelos celulares de câncer gástrico, AGS e MKN45

5.3.2.1 Avaliação da captação celular do [^{18}F]FBNA nas linhagens celulares de câncer gástrico, AGS e MKN45 em condições hipóxia

Em seguida foi avaliada a capacidade do radiofármaco [^{18}F]FBNA ser retido especificamente em células tumorais sob condições hipóxicas. Para isso, foram realizados estudos da captação celular *in vitro* utilizando as linhagens celulares de câncer gástrico MKN45 e AGS. Ambas linhagens foram inicialmente cultivadas sob condições de hipóxia (1 % de O_2) ou normóxia (21% O_2) por 48h. Após esse período, 0,37 MBq de [^{18}F]FBNA ou [^{18}F]FAZA (utilizado como radiofármaco controle de captação em hipóxia) foram adicionados às células por 1 ou 3 horas. Após esses intervalos, as células foram lavadas e a atividade nas células (correspondente aos radiofármacos retidos) foi contada em um contador

de poços gama, e as contagens foram normalizadas tendo em conta o número de células presente em cada linhagem.

Figura 29 - Captação celular do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA em condições de normóxia e hipóxia. As células MKN-45 e AGS foram cultivadas por 48h em condições de normóxia (21% de O_2) ou hipóxia (1% O_2). Após esse período, 0,37 MBq de [^{18}F]FBNA ou [^{18}F]FAZA foi adicionado às células por um período adicional de 1 ou 3 horas. Ao final do período de incubação, as células foram recolhidas e a atividade foi contada em um contador de poços gama. Os gráficos apresentam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes ($n = 3$). A diferença entre hipóxia e normóxia foi analisada usando o teste-t não pareado (testes t múltiplos); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. A barra preta representa a captação em hipóxia e a barra cinza a captação em normóxia.

Fonte: Autor da tese

Na Figura 29 podemos observar que ao final de 1 hora de incubação dos radiofármacos, a captação por [^{18}F]FBNA pelas células MKN45 e AGS em hipóxia foi estatisticamente superior à sua captação nas células em normóxia. Não foram observadas diferenças significativas entre as duas linhagens estudadas. Por outro lado, ao final de 3 horas de incubação deixamos de observar

uma diferença pronunciada de captação de [^{18}F]FBNA entre células em hipóxia e normóxia.

A captação celular de [^{18}F]FAZA, tal como relatado pela literatura, possui um acúmulo mais lento nas células em hipóxia (SORGER *et al.*, 2003) e apenas ao final de 3 horas de incubação é possível observar um aumento significativo de sua captação por células hipóxicas em comparação com as células normóxicas.

A relação de captação dos radiofármacos em hipóxia/normóxia foi introduzida como parâmetro para comparar [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA (Tabela 5 e Figura 30), uma vez que ambos radiofármacos foram investigados em experimentos separados.

Tabela 5 - Relação da captação celular Hipóxia/Normóxia do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA utilizando diferentes tempos e 2 linhagens celulares. A tabela apresenta a média $\pm$ DP de três experimentos independentes (n = 3).

Linhagem celular	[^{18}F]FBNA (1 h)	[^{18}F]FAZA (1 h)	[^{18}F]FBNA (3 h)	[^{18}F]FAZA (3 h)
AGS	4,65 $\pm$ 0,85	1,64 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,10	5,46 $\pm$ 1,52
MKN-45	4,53 $\pm$ 1,52	2,42 $\pm$ 1,17	0,72 $\pm$ 0,03	2,39 $\pm$ 0,02

Fonte: Autor da tese

Figura 30 - Relação da captação celular Hipóxia/Normóxia do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA utilizando diferentes tempos e 2 linhagens celulares. Os gráficos apresentam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes (n = 3). A diferença entre Hipóxia/Normóxia foi analisada usando o teste-t não pareado (testes t múltiplos); ** p < 0,01, **** p < 0,0001. A barra preta representa a captação do [^{18}F]FBNA e a barra cinza a captação do [^{18}F]FAZA.

Fonte: Autor da tese

O aumento da relação hipóxia/normóxia observada com o [^{18}F]FBNA nas linhagens estudadas foi maior em comparação com o [^{18}F]FAZA na primeira hora de incubação ($4,65 \pm 0,85$ vs $1,64 \pm 0,02$ para AGS e $4,53 \pm 1,52$ vs $2,42 \pm 1,17$ para MKN45) para o [^{18}F]FNBA e o [^{18}F]FAZA respectivamente). Quando o tempo de incubação aumentou para três horas, a relação de captação do [^{18}F]FBNA em hipóxia/normóxia diminuiu nas linhagens estudadas em comparação ao tempo de 1 hora. No entanto, o oposto aconteceu para o [^{18}F]FAZA, onde a relação hipóxia/normóxia foi aumentada às 3 horas pós-incubação para ambas linhagens.

Os resultados obtidos até aqui sugerem que o caráter lipofílico do [^{18}F]FBNA em comparação com o [^{18}F]FAZA poderá contribuir para uma captação mais rápida do [^{18}F]FBNA pelas células tumorais em condições de hipóxia.

5.3.2.2 Avaliação in vivo da captação de [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA por imagem μPET

Em seguida, utilizando o equipamento $\mu\text{PET}/\text{CT}$, foi investigada a captação específica do novo radiotraçador [^{18}F]FBNA na linhagem de câncer gástrico (MKN-45) previamente inoculada em camundongos Balb/c nude.

Inicialmente, foi avaliado se o tumor derivado da linhagem MKN-45 apresentaria áreas de hipóxia quando inoculado *in vivo*. Para isso, 20 MBq do radiofármaco controle [^{18}F]FAZA foi injetado intravenosamente no animal Balb/c nude contendo o tumor MKN-45 (250 mm^3). Três horas após a injeção do radiotraçador, o animal foi anestesiado e colocado na equipamento $\mu\text{PET}/\text{CT}$ no qual foi realizada a aquisição de uma imagem estática por 15 min. Pode-se observar que o [^{18}F]FAZA foi captado especificamente pelo tumor MKN-45 como apresentado na Figura 31, indicando que o tumor derivado da linhagem MKN-45 apresenta áreas de hipóxia no seu microambiente.

Figura 31 - Imagem μ PET/CT da captação tumoral do $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ utilizando um modelo tumoral de câncer gástrico. $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ (20 MBq) foi injetado intravenosamente em camundongos Balb/c nude previamente inculados com as células tumorais MKN-45. Três horas após a administração do radiofármaco, os animais foram colocados no equipamento μ PET/CT onde foi realizada a aquisição de uma imagem PET estática de 15 min, seguida de aquisição de imagem CT (35 kV, 400 μ A). A figura é representativa de n=2.

Fonte: Autor da tese

Em seguida, utilizando o modelo tumoral MKN-45, foram realizados estudos de imagem dinâmica utilizando os radiofármacos $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$. Para isso, 20 MBq de $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ foram injetados intravenosamente nos animais Balb/c nude contendo o tumor MNK-45 com aproximadamente 300 mm³. Os animais foram colocados na câmara de escaneamento imediatamente após a injeção. Imagens PET foram adquiridas de 10 em 10 minutos por um tempo total de 180 min. Dois dias depois, esses mesmos animais foram injetados com 20 MBq de $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ para efeitos de comparação. As imagens PET representativas de cada tempo de estudo são apresentadas na Figura 32.

Figura 32 – Imagem coronal μ PET/CT da captação de $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ utilizando um modelo tumoral de câncer gástrico. Os radiofármacos (na dose de 20 MBq) foram injetados intravenosamente em camundongos Balb/c nude previamente inculados com as células tumorais MKN-45. Os animais foram colocados no equipamento μ PET/CT onde foi realizada a aquisição de uma imagem PET aos 10, 30, 60, 120, e 180 minutos após administração dos radiofármacos, seguida de aquisição de imagem CT (35 kV, 400 μ A). A figura é representativa de n=3

Fonte: Autor da tese

A imagem PET do plano coronal anterior mostra que a captação no tumor pelo radiofármaco $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ começa a ocorrer 30 min após a sua injeção no animal. Por outro lado, observamos que a captação do $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ no mesmo animal, se inicia apenas ao final de 2 horas após a injeção. Este tempo para a captação de $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ vai de encontro aos resultados já reportados na literatura (SORGER *et al.*, 2003).

A quantificação da captação de ambos radiofármacos foi extraída da imagem PET pelo software pMOD. Para isso, um volume elíptico de interesse que envolvia o tumor ou o músculo foi posicionado manualmente nas imagens PET para a determinação do volume tumoral e muscular. A região considerada como hipóxica no tumor foi a de maior captação na região de interesse tumoral (região captante) e a região do tumor onde não aconteceu captação na região de interesse foi considerada normóxica (região não captante). Em seguida, os

contornos tridimensionais foram desenhados automaticamente na região captante. Para cada VOI, a porcentagem da dose injetada na região de interesse, dividida pela dose injetada por peso do animal (% ID / g) pode ser calculada diretamente usando os parâmetros de saída do μ PET. Os valores máximos de captação padronizados, $SUV_{\text{máx}}$, são mostrados na Tabela 6.

Tanto o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ quanto o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ se acumularam nos tumores MKN-45, no entanto, em tempo diferentes. Durante a primeira hora após a injeção o valores $SUV_{\text{máx}}$ do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ ($SUV_{\text{FBNA}} 0,90 \pm 0,03$) foram maiores que o $SUV_{\text{máx}}$ para o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ ($SUV_{\text{FAZA}} 0,21 \pm 0,01$). Nesse mesmo período, a relação Tumor/Músculo para o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ foi o dobro em comparação com o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ ($3,76 \pm 0,41$ vs. $1,84 \pm 0,04$). Três horas após a injeção dos traçadores, no entanto, as diferenças do $SUV_{\text{máx}}$ no tumor e a relação Tumor/Músculo foram superiores para o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ em comparação com o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ ($3,44 \pm 0,52$ vs. $1,51 \pm 0,18$).

Tabela 6 - Valores máximos de captação padronizados ($SUV_{\text{máx}}$) para $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ obtidos por imagem PET em tecido tumoral e muscular uma e três hora após a injeção (p.i.) dos radiofármacos, bem como a relação Tumor/Músculo para o modelo de câncer gástrico.

Radiofármaco	Tempo (min)	Tumor ($SUV_{\text{máx}}$)	Músculo ($SUV_{\text{máx}}$)	Tumor/Músculo
$[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$	30	$0,49 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,01$	$2,03 \pm 0,08$
	60	$0,90 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,03$	$3,76 \pm 0,41$
	120	$0,54 \pm 0,17$	$0,31 \pm 0,08$	$1,76 \pm 0,08$
	180	$0,43 \pm 0,12$	$0,28 \pm 0,05$	$1,51 \pm 0,18$
$[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$	30	$0,19 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$	$1,70 \pm 0,41$
	60	$0,21 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$1,84 \pm 0,04$
	120	$0,43 \pm 0,12$	$0,22 \pm 0,06$	$2,03 \pm 0,75$
	180	$0,65 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,01$	$3,44 \pm 0,52$

Fonte: Autor da tese

Concluindo, os valores de $SUV_{\text{máx}}$ para o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ no tumor foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) que os observados para $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ aos 30 min e 60 min após a injeção. Isto pode ser devido à maior lipofilicidade do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ em comparação com $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$, o que permite que o novo

radiotraçador penetre mais facilmente pela membrana celular levando a um acúmulo mais rápido em locais específicos. Estes dados sugerem que o [^{18}F]FBNA possa ser utilizado como traçador de hipóxia possuindo como vantagem a aquisição de imagens PET em um tempo mais curto quando comparado com o [^{18}F]FAZA.

5.3.2.3 Autorradiografia dos tumores injetados com [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA

Seguidamente, 20 MBq dos radiotraçadores [^{18}F]FBNA ou [^{18}F]FAZA foram injetados em animais Balb/c nude portadores de tumor MKN-45 e, ao final de 60, 120 e 180 min, os animais foram eutanaziados e os tumores coletados para serem analisados por autorradiografia. O tumor coletado foi congelado, seccionado em cortes de 40 μm e colocado em lâminas histológicas pré-preparadas para receber criocortes. Uma placa de fósforo foi então colocada em cima das lâminas e a leitura da placa foi realizada em equipamento de autorradiografia (GE Healthcare Life Sciences - Typhoon FLA 9500, Alemanha). O [^{18}F]FBNA apresentou uma captação nas regiões intratumorais mais pronunciado nos tempos de 1 e 2 horas pós-injeção (Figura 33). Por outro lado, a captação intratumoral por [^{18}F]FAZA foi observada de forma mais intensa no tempo de 3 horas pós-injeção (Figura 34). Estes dados corroboram as imagens PET anteriores no qual se verifica que o [^{18}F]FBNA é captado de forma mais precoce pelo tumor MKN-45 que o [^{18}F]FAZA.

Figura 33 - Autorradiografia do tumor derivado das células MKN-45 após a injeção do radiofármaco [^{18}F]FBNA. O radiofármaco [^{18}F]FBNA (20 MBq) foi injetado intravenosamente em camundongos Balb/c nude previamente inoculados com as células de câncer gástrico MKN-45. Ao final de 60, 120 ou 180 min, o tumor dos animais foi coletado, congelado e seccionado para lâminas histológicas. Todo o tumor recolhido foi seccionado em diferentes lâminas (L). As imagens são representativas de n=3.

Fonte: Autor da tese

Figura 34 – Autorradiografia do tumor derivado das células MKN-45 após a injeção do radiofármaco [^{18}F]FAZA. O radiofármaco [^{18}F]FAZA (20 MBq) foi injetado intravenosamente em camundongos Balb/c nude previamente inoculados com as células de câncer gástrico MKN-45. Ao final de 60, 120 ou 180 min, o tumor dos animais foi coletado, congelado e seccionado para lâminas histológicas. Todo o tumor recolhido foi seccionado em diferentes lâminas (L). As imagens são representativas de n=3.

Fonte: Autor da tese

5.3.2.4 Avaliação *ex vivo* do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA por biodistribuição

Por fim, foram realizados estudos de biodistribuição *ex vivo* que fornecem informações essenciais para determinação da captação do radiofármacos por órgão analisado. A partir destes ensaios de distribuição é possível inferir quanto à forma de eliminação e excreção da molécula radiomarcada. Para tanto, 20 MBq dos radiofármacos [^{18}F]FBNA ou [^{18}F]FAZA foram injetados intravenosamente em animais Balb/c nude previamente inoculados com a linhagem tumoral MKN-45. Uma hora após a injeção, os animais foram sacrificados e os órgãos de interesse foram excisados, pesados e a atividade de cada órgão foi medida em um contador de poços gama. A Figura

35 e Tabela 7 apresentam a porcentagem de dose injetada por grama de tecido (% DI/g) para cada órgão analisado.

Figura 35 - Biodistribuição *ex vivo* de [^{18}F]FBNA ou [^{18}F]FAZA em camundongos portadores de tumor gástrico MKN-45. [^{18}F]FBNA ou [^{18}F]FAZA (20 MBq) foram injetados intravenosamente em animais Balb/c Nude previamente inoculados com a linhagem tumoral gástrica MKN-45. Uma hora após a injeção, os animais foram eutanaziados e os órgãos de interesse, incluindo o tumor, foram recolhidos para pesagem e contagem da atividade em um contador de poços gama. O gráfico apresenta o valor médio $\pm$ DP da %DI/g de $n = 3$. A diferença entre a captação nos órgãos do [^{18}F]FBNA e o [^{18}F]FAZA foi analisada usando o teste de comparações múltiplas de Sidak; **** $p < 0,01$. A barra preta representa a biodistribuição do [^{18}F]FBNA e a barra branca do [^{18}F]FAZA.

Fonte: Autor da tese

Tabela 7 – Valores de %DI/g dos órgãos recolhidos na biodistribuição *ex vivo* de camundongos portadores de tumor gástrico MKN-45 após a injeção intravenosa de [^{18}F]FBNA ou [^{18}F]FAZA. Os dados representam o valor médio $\pm$ DP da %DI/g de $n = 3$. A diferença entre a captação nos órgãos do [^{18}F]FBNA e o [^{18}F]FAZA foi analisada usando o teste de comparações múltiplas de Sidak; **** $p < 0,01$

Órgão	[^{18}F]FBNA (% DI/g)	[^{18}F]FAZA (% DI/g)
Sangue	$0,28 \pm 0,11$	$0,47 \pm 0,21$
Intestinos	$1,10 \pm 0,33$	$1,61 \pm 0,54$
Baço	$0,30 \pm 0,26$	$0,51 \pm 0,51$
Pâncreas	$0,26 \pm 0,23$	$0,37 \pm 0,29$
Estômago	$0,22 \pm 0,17$	$2,51 \pm 0,19$ ****
Fígado	$0,40 \pm 0,31$	$0,83 \pm 0,50$
Rins	$0,36 \pm 0,19$	$0,77 \pm 0,48$
Coração	$0,20 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,23$
Pulmões	$0,35 \pm 0,18$	$0,39 \pm 0,35$
Tumor	$1,14 \pm 0,50$	$1,04 \pm 0,22$
Músculo	$0,15 \pm 0,08$	$0,33 \pm 0,06$
Cérebro	$0,09 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,13$
Bexiga	$5,00 \pm 0,46$	$5,33 \pm 0,63$

Fonte: Autor da tese

Os dados obtidos pelo ensaio de biodistribuição mostram que a porcentagem de captação no estômago do [^{18}F]FBNA foi menor em comparação com o [^{18}F]FAZA ao final de 60 min. A captação de [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA pelo tumor foi semelhante aos 60 min. A relação tumor/músculo (T/M) foi significativamente maior para [^{18}F]FBNA ($8,21 \pm 2,09$) em comparação com o [^{18}F]FAZA ($3,13 \pm 0,59$). A maior captação do [^{18}F]FBNA na bexiga e nos rins em comparação com o fígado e os intestinos sugere uma eliminação renal do radiofármaco (Figura 36).

Figura 36 – Relação Tumor/Músculo e Tumor/Sangue de captação dos radiofármacos [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA 60 min após injeção em camundongos Balb/c nude portadores de tumor gástrico MKN-45. O gráfico apresenta o valor médio $\pm$ DP da %DI/g de $n = 3$. A diferença entre [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA foi analisada usando o teste-t não pareado (testes t múltiplos); ** $p < 0,01$. A barra preta representa a biodistribuição do [^{18}F]FBNA e a barra branca do [^{18}F]FAZA.

Fonte: Autor da tese

Concluindo, os nossos resultados indicam que o [^{18}F]FBNA é um traçador específico para locais de hipóxia e pode ser utilizado para detecção de hipóxia em tempos mais precoces que o radiofármaco [^{18}F]FAZA. Além disso, a alta relação Tumor/Músculo observada ao final de 1 hora, sugere que o [^{18}F]FBNA oferece um melhor contraste na imagem PET do que o [^{18}F]FAZA, sendo um candidato radiofarmacêutico para se tornar o próximo agente de diagnóstico de hipóxia no microambiente tumoral.

6 DISCUSSÃO

ENSAIOS CLÍNICOS

Até ao momento, um dos mais importantes desafios consiste em demonstrar que o diagnóstico e quantificação da hipóxia no microambiente tumoral pode ser adotado na prática clínica de rotina como um marcador de prognóstico no tratamento do câncer. Assim, a imagem molecular da hipóxia tumoral teria potencialmente dois papéis clinicamente importantes: (i) selecionar pacientes que possam responder melhor a determinado tipo de tratamento e; (ii) imagem serial da hipóxia tumoral para determinar os efeitos do tratamento, visualizando um status hipóxico reduzido de um tumor sólido (KROHN *et al.*, 2008). A PET é a modalidade mais comumente usada em ensaios clínicos e na clínica para medir a hipóxia tumoral; no momento desta tese, havia 50 ensaios clínicos ativos usando radiofármacos PET para medir a hipóxia no microambiente tumoral (CLINICALTRIALS.GOV, 2020). Os principais tipos de tumor estudados nesses ensaios clínicos são: câncer de cabeça e pescoço (7 estudos), câncer de pulmão (6 estudos), câncer próstata (5 estudos), câncer de pâncreas (4 estudos), tumores cerebrais (4 estudos), câncer de colo do útero (3 estudos) e câncer de ovário (3 estudos). Os ensaios clínicos ativos até à data procuram maioritariamente demonstrar que os radiofármacos para hipóxia:

1. Encontram-se associados com a sobrevida livre de doença após a radioterapia ou qualquer outro tipo de tratamento (NCT02976883, NCT01898065);
2. Podem ser úteis para a determinação da dose radioterapêutica inicial (NCT00771381, NCT01995084);
3. Possuem utilidade prognóstica para predizer o resultado terapêutico com base nas frações hipóxicas e (NCT01542177, NCT01613521);
4. Permitem orientar a radioterapia guiada por imagem (NCT00713037, NCT01898065).

Dentro os radiofármacos para hipóxia por PET envolvidos nos estudos clínicos até o momento encontram-se o [^{18}F]FMISO, [^{18}F]FAZA, [^{18}F]EF5 e [^{18}F]HX4. O [^{18}F]FMISO é o radiotraçador de hipóxia PET mais amplamente estudado, ainda não foi aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), no entanto, foi aprovado em 2017 pela Agência Europeia

de Medicamentos (EMA) e tem sido o marcador hipóxico mais utilizado, sendo hoje utilizado em 19 ensaios clínicos. No entanto, devido à sua alta lipofilicidade, o [^{18}F]FMISO tem um acúmulo lento nos locais hipóxicos, possui uma depuração plasmática lenta, o que leva a um baixo contraste sinal-ruído (RICKARD, *et al.*, 2019; CLINICALTRIALS.GOV, 2020). Isso tem levado à procura de novos radiofármacos para superar essas limitações. Os traçadores de hipóxia de nova geração foram desenvolvidos para diminuir a lipofilicidade do [^{18}F]FMISO e acelerar a depuração dos traçadores dos tecidos oxigenados normais (LOPCI *et al.*, 2014; WATANABE *et al.*, 2019). O [^{18}F]FAZA, até o momento, foi o radiofármaco que apresentou os melhores resultados em estudos pré-clínicos e clínicos comparado com o [^{18}F]FMISO. Diversos estudos têm demonstrado que o [^{18}F]FAZA se acumula seletivamente em células tumorais hipóxicas *in vitro* e, quando injetado *in vivo*, apresenta um maior contraste tumor-músculo e tumor-sangue, assim como melhores propriedades farmacocinéticas em comparação com o [^{18}F]FMISO (STIEB *et al.*, 2018). Atualmente, cinco ensaios clínicos estão em andamento usando o [^{18}F]FAZA (ClinicalTrials.gov: Identifier: NCT01567800, NCT03181035, NCT02802969, NCT03418818, NCT02701699). O [^{18}F]FAZA está ganhando popularidade na imagem PET da hipóxia tumoral e, por esse motivo, a seleção desse marcador de hipóxia para a realização dos estudos biológicos desta tese.

Após um tempo de acumulação de aproximadamente 2 a 3 h, o [^{18}F]FMISO e o [^{18}F]FAZA não são mais afetados pela perfusão, tornando-os específicos para áreas hipóxicas. Os radiofármacos são sensíveis à pO_2 entre 2 e 10 mmHg e se acumulam nos tecidos por ligação a macromoléculas intracelulares quando $\text{pO}_2 < 10$ mmHg. Imagens podem ser obtidas com uma dose moderada de radiação, tipicamente 250 MBq (RAJENDRAN e KROHN, 2005).

Dentre as aplicações de radiofármacos para a detecção de hipóxia com mais impacto, são de destacar: 1) o uso de radiofármacos para hipóxia no planejamento da radioterapia com intensidade modulada (IMRT) com base em subvolumes hipóxicos em tumores (HENDRICKSON *et al.*, 2011; ANDREASSEN *et al.*, 2018), e 2) o uso de radiofármacos na imagiologia prognóstica para prever o resultado da radioterapia e quimioterapia com base nas frações tumorais hipóxicas (SPENCE *et al.*, 2008; GRKOVSKI *et al.*, 2017). Mortensen *et*

al. avaliaram o uso do [^{18}F]FAZA para prever o resultado da radioterapia em quarenta pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço com base nas frações tumorais hipóxicas. Os resultados mostraram nos exames PET/CT com [^{18}F]FAZA realizados durante a radioterapia, que a hipóxia pode ser detectada em seis de 13 pacientes e em outros 30 pacientes uma correlação positiva foi detectada entre a captação máxima de [^{18}F]FAZA no tumor primário e no linfonodo. Durante um acompanhamento médio de 19 meses foi detectada uma diferença significativa na taxa de sobrevida livre de doença, com 93% para pacientes com tumores não hipóxicos e 60% para pacientes com tumores hipóxicos. Este estudo enfatiza o papel da imagem PET/CT com [^{18}F]FAZA como um ensaio adequado com potencial prognóstico para a detecção de hipóxia no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (MORTENSEN *et al.*, 2012). Em outro exemplo, Hendrickson *et al.* estudaram como a radioterapia (RT) aumenta os sub-volumes tumorais hipóxicos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço que poderiam melhorar o controle local do tumor. Usando imagens PET com [^{18}F]FMISO para determinar os sub-volumes hipóxicos para o planejamento de aumento da RT, os autores criaram planos IMRT (o IMRT permite a possibilidade de esculpir a dose em três dimensões e, portanto, criar distribuições de dose que estejam em conformidade com os volumes-alvo e poupem os tecidos normais adjacentes. Os autores encontraram uma melhora média de 17% na probabilidade de controle do tumor, com um aumento moderado da radiação nas áreas hipóxicas e sem maiores complicações, concluindo que a combinação de imagens PET com [^{18}F]FMISO e planejamento IMRT permite a administração de doses mais altas em regiões hipóxicas (HENDRICKSON *et al.*, 2011). Atualmente, três ensaios clínicos estão em andamento usando planos IMRT em tumores hipóxicos do tipo carcinoma nasofaríngeo, câncer de pulmão e câncer de cabeça e pescoço localmente avançado (ClinicalTrials.gov: Identifier: NCT02089204, NCT01617980 e NCT01212354 respectivamente).

Diferentemente da hipóxia tumoral, a hipóxia causada pela isquemia (cardíaca e cerebral) é o resultado de um processo mecânico, sendo uma situação de estresse celular produzido pela diminuição temporária ou permanente do suprimento sanguíneo (diminuição do suprimento de nutrientes, eliminação de produtos do metabolismo e suprimento de oxigênio) (HEARSE, 2014). Nos

tumores, a hipóxia pode ser muito mais complexa, pois o tecido é aberrante sem função normal, no entanto, tem a capacidade de se adaptar ao estresse. Em relação à cardiologia, embora o [^{18}F]FMISO seja o 2-nitroimidazol mais amplamente estudado para imagens de hipóxia, não há pesquisas significativas sobre sua potencial aplicação cardiovascular há quase 20 anos (HANDLEY *et al.*, 2012). Até o momento, apenas um agente, Cu-ATSM, foi avaliado na isquemia miocárdica, com resultados contraditórios pelo fato de ter um potencial redox muito baixo para aplicação útil em cardiologia (LEWIS *et al.*, 2002). Em relação à neurologia, por exemplo, o [^{18}F]FMISO só tem duas aplicações clínicas importantes. Read *et al.* investigaram 24 pacientes com AVC por imagem PET e observaram os pacientes por até 51 h para avaliar o prognóstico (READ *et al.*, 2000). Esses autores demonstraram que a maioria dos tecidos que mostram captação de [^{18}F]FMISO em uma fase aguda prosseguiu para o infarto, e os escores de gravidade neurológica dos pacientes com AVC foram correlacionados positivamente com os volumes de tecido hipóxicos. Mais recentemente, Alawneh *et al.* examinaram três pacientes com AVC agudo por imagem multimodal (ALAWNEH *et al.*, 2014). A captura de FMISO estava presente principalmente na periferia, mas também no núcleo isquêmico, aumentando a possibilidade de que existam células viáveis mesmo no núcleo isquêmico. A Tabela 8 resume as principais aplicações na hipóxia e os tipos de tumores usando traçadores para imagem PET que foram usados na prática clínica.

Tabela 8 – Visão geral das principais aplicações clínicas em relação à hipóxia usando diferentes radiofármacos para imagem PET.

Aplicação	[¹⁸ F] FMISO	[¹⁸ F] FAZA	[¹⁸ F] FRP-170	[¹⁸ F] HX4	[¹⁸ F] EF5	[¹⁸ F] FETNIM	Cu- ATSM
Tumores cerebrais	X		X				X
Cabeça e pescoço	X	X		X	X	X	X
Mama	X						
Pulmão	X	X	X	X		X	X
Trato gastrointestinal	X	X				X	X
Geniturinário/ ginecológico	X	X			X	X	X
Sarcoma de tecidos moles	X	X					
Isquemia Cardíaca							X
Isquemia Cerebral	X						

Fonte: Adaptada, LI *et al.*, 2014; CHALLAPALLI *et al.*, 2017.

QUÍMICA E RADIOQUÍMICA

Para a preparação do novo radiofármaco com o grupo 2-Nitroimidazol para imagem hipóxica ([¹⁸F]FBNA), a reação proposta foi segura, simples e o traçador pode ser facilmente preparado em uma instalação PET padrão. O processo consiste na reação entre os ésteres de derivados de N-hidroxissuccinimida (NHS) (Composto **2**) e a amina primária presente nos compostos, por exemplo, [¹⁸F]FBA, semelhante a descrita para outros radiofármacos para hipóxia como [¹⁸F]EF5, [¹⁸F]EF3 e [¹⁸F]EF5 (FLEMING *et al.*, 2015). A reação envolve a ligação covalente de um grupo acil ao nucleófilo por meio do deslocamento de um grupo abandonador do NHS, resultando na formação de uma amida na cadeia lateral do grupo amino. A acetilação oferece um meio eficiente e econômico para a identificação e caracterização de aminas, bem como para proteger uma funcionalidade amino na síntese orgânica

(GREENE, 1999). O cloreto de acetila é um dos agentes de acilação mais comuns e baratos, mas sua alta reatividade e instabilidade concomitante em meio aquoso restringem seu uso em transformações (FURNISS *et al.*, 2006). Para melhorar as características desse grupo funcional, existem relatos na literatura sobre compostos derivados de N-succinimidil utilizados como precursores na reação de acetilação de radiofármacos que tem na sua estrutura amina primária (BERNDT *et al.*, 2007). Dessa forma, o precursor (**2**) para a radiosíntese (que na sua estrutura tem o grupo funcional N-succinimidil) foi obtido com elevado rendimento químico e um curto tempo de síntese de três horas partindo do material de partida **1**. A reação final foi a obtenção do NHS-éster com um tempo de reação muito curto (WILCHEK *et al.*, 1994). A reação da amidação, para a obtenção do composto padrão “frio” ($[^{19}\text{F}]\text{FBNA}$) partindo igualmente do material de partida **1** (Esquema 3), foi feita com o reagente 4-fluoro benzil amina. Essa amina primária foi sendo utilizada por outros autores, com bons resultados, nas reações para a obtenção de amidas partindo de derivados de ácidos carboxílicos (CARCELLI *et al.*, 2014). Neste trabalho, para melhorar os rendimentos e resultados anteriores, colocamos o catalisador nucleofílico DMAP e o EDC (agente de ativação de carboxila).

Para a obtenção do radiofármaco $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ foi necessário primeiramente a obtenção de uma amina primária ($[^{18}\text{F}]\text{FBA}$) para a futura reação com o precursor **2**, sintetizado e caracterizado anteriormente. A fim de obter radiotraçadores PET com altos rendimentos radioquímicos e com alta radioatividade específica, o radiomarcador deve ser incorporado o mais tarde possível na sequência de síntese. No entanto, essas reações de radiofluoração nucleofílica, de etapa única e sem carreador (em inglês: no-carrier-added, n.c.a.) nem sempre são possíveis. Portanto, vários pequenos blocos de construção com ^{18}F , como agentes de fluoroalquilação $[^{18}\text{F}]$ e fluoretos de aril marcados com ^{18}F , foram desenvolvidos para incorporação específica do fluoreto $[^{18}\text{F}]$ em moléculas que, de outra forma, não permitem a incorporação direta de fluoreto $[^{18}\text{F}]$ e/ou são suscetíveis à decomposição devido às condições de reação bastante drásticas necessárias para as reações de radiofluoração nucleofílica. Dentre os agentes de fluoroalquilação $[^{18}\text{F}]$, o 4- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzil-amina ($[^{18}\text{F}]\text{FBA}$) é um dos mais utilizados (WAY e WUEST, 2013). Por exemplo, há artigos sobre o uso de

[^{18}F]FBA na preparação de grupos protéticos como 4-[^{18}F]fluorobenzil-2-bromoacetamida ([^{18}F]FBBA) e 4-[^{18}F]fluorobenzilamido-propionil maleimida ([^{18}F]FBAPM) para a marcação de diferentes compostos (KOSLOWSKY *et al.*, 2010). Todas as sínteses relatadas de [^{18}F]FBA dependem da redução do 4-[^{18}F]fluorobenzonitrila [^{18}F]FBN. A radiosíntese do [^{18}F]FBN ocorre basicamente através da reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), reação composta pelo $^{18}\text{F}^-$ (nucleófilo), e o substrato contendo o grupo abandonador triflato (OTf) do precursor sulfonato de trifluorometan-4-ciano-N, N, N-trimetilanilínio. Solventes polares próticos, como a água, são capazes de solvatar o nucleófilo e podem impedir a reação de substituição. Além disso, o ânion fluoreto é mais fortemente solvatado quando comparado com outros haletos; isto acontece por ser um ânion menor e sua carga ser a mais concentrada. Desta maneira, a utilização de solventes polares apróticos como acetonitrila (CH_3CN), N,N-Dimetilformamida(DMF) e Dimetil sulfóxido (DMSO) são especialmente úteis nas reações $\text{S}_{\text{N}}2$.

Para a redução do [^{18}F]FBN e obtenção do [^{18}F]FBA, o NaBH_4 foi utilizado pois reduz rapidamente aldeídos, cetonas e halogenetos de acila e é virtualmente inerte a muitos outros grupos funcionais, incluindo os grupos nitrila. No entanto, o potencial de redução de NaBH_4 é significativamente aumentado na presença de vários sais de metais de transição como NiCl_2 , $\text{Co}(\text{OAc})_2$ e CuCl_2 . Na presença de soluções aquosas de sais de metais de transição, o NaBH_4 reduz rapidamente grupos nitrila através da formação de boretos metálicos in situ, seguidos pela liberação de hidrogênio. As características redutoras favoráveis de NaBH_4 na presença de sais de metais de transição para grupos nitrila nos levaram a estabelecer a radiosíntese de [^{18}F]FBA. Khurana e Kukreja demonstraram que altos rendimentos de benzilamina poderiam ser obtidos quando incubados com NiCl_2 e NaBH_4 à temperatura ambiente (KHURANA e KUKREJA, 2002), pelo que otimizamos as condições da redução com $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$, resumidas na Tabela 3. Os resultados mostram claramente que a redução não é quantitativa e que a reação depende da razão $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$. Além disso, quantidades maiores de NiCl_2 também favorecem a fixação de grandes quantidades da sal formada nas paredes do frasco de vidro, o que causa uma redução incompleta e menores rendimentos radioquímicos na obtenção do [^{18}F]FBA. Os resultados estão em correspondência

com os reportados por outros autores usando a redução de grupos nitrilas com $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$ (KHURANA, e GOGIA, 1997). O rendimento radioquímico obtido na síntese do $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ ($62,6\% \pm 12\%$) e apresentado nessa tese excedeu o rendimento relatado por outros autores (39 a 49%), mesmo utilizando um tempo de radiossíntese maior (HARADAHIRA *et al.*, 1998). Após a purificação e caracterização, o $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ foi tratado com o precursor **2** na presença de N-metil-morfolina. Diferente da reação para a obtenção do padrão $[^{19}\text{F}]\text{FBNA}$ em que foi tratada a amina com um ácido carboxílico(**1**), pela maior capacidade eletrofílica dos derivados de ésteres em comparação com derivados de ácidos carboxílicos nas reações de amidação ($\text{R-CO-NR} > \text{R-CO-OH}$), decidimos utilizar o composto **2** para a formação do composto marcado. Um possível mecanismo da formação do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ é representado no esquema 9

Esquema 9 – Possível mecanismo de formação do $[^{18}\text{F}]\text{-N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$), a partir do precursor 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (**2**) acético com o $[^{18}\text{F}]\text{4-Fluorobenzilamine}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FBA}$).

Fonte: Autor da tese

Coeficiente de partição (P e log P)

Em geral, uma maior hidrofiliabilidade está associada a uma biodistribuição mais rápida e uma depuração mais rápida no corpo (BROWN e WORKMAN, 1980). Por outro lado, é importante que um traçador para hipóxia tenha lipofiliabilidade suficiente para ser difundido passivamente através da

membrana celular. O [^{18}F]EF5 é, até agora, o derivado do 2-nitroimidazol mais lipofílico investigado em estudos pré-clínicos e clínicos (EVANS *et al.*, 2004; KOMAR *et al.*, 2008) e apresenta uma distribuição uniforme em tecidos hipóxicos. No entanto, a sua produção exige uma fluorinação eletrofílica, o que significa uma baixa atividade molar (inferior a 10 Ci/mmol) e o rendimento radioquímico máximo que pode ser obtido é de 50%. Além disso, a relação tumor/músculo de 1,5 é baixa, e não apresenta ainda nenhuma vantagem quando comparado com o [^{18}F]FMISO (KOMAR *et al.*, 2008). A estratégia mais comum sugerida para melhorar o contraste da imagem é tornar o agente da hipóxia mais solúvel na água, para que seja excretado o mais rápido possível. No entanto, essa abordagem inevitavelmente introduz o fluxo sanguíneo como um contribuidor secundário da imagem resultante. Portanto, ainda não é claro qual o coeficiente de partição ideal para um radiofármaco de hipóxia, e essa questão continua sendo objeto de debate. Segundo os resultados obtidos, o novo composto [^{18}F]FBNA ($\log P = 0,05$) é mais hidrofílico que o [^{18}F]FMISO ($\log P = 0,36$) e menos hidrofílico que o [^{18}F]FAZA ($\log P = -0,43$), resultados dos compostos padrões semelhantes aos reportados por outros autores (FLEMING *et al.*, 2015). Com esse valor intermédio espera-se que o novo composto apresente uma depuração mais rápida do tecido normal em animais, juntamente com a excreção mais rápida na urina em comparação com o [^{18}F]FMISO, que é excretado principalmente pelas vias hepatobiliar e gastrointestinal (PIERT *et al.*, 2005). De fato, nossos dados demonstram que no estudo de imagem PET o valor do SUV no tumor para o [^{18}F]FBNA ($0,90 \pm 0,03$) foi ligeiramente menor em comparação com o [^{18}F]FMISO ($1,07 \pm 0,30$) e a relação tumor-músculo foi melhor para o radiofármaco novo ($3,76 \pm 0,41$) em comparação com o estabelecido ($2,71 \pm 0,62$) reportado na literatura em outro modelo tumoral (SORGER *et al.*, 2003). Entretanto, em nossos estudos, utilizando um modelo tumoral de câncer gástrico, não utilizamos o [^{18}F]FMISO para comparação com [^{18}F]FBNA, o que impede uma comparação fidedigna entre esses dois traçadores.

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Neste trabalho decidimos usar duas linhagens tumorais de câncer gástrico para uma primeira avaliação biológica, na comparação do [^{18}F]FBNA com

o [^{18}F]FAZA. O câncer de estômago (ou câncer gástrico) é uma neoplasia muito agressiva que ocupa o quinto lugar em incidência e o terceiro em taxa de mortalidade no mundo (BRAY *et al.*, 2018). A alta fatalidade associada a esta doença se deve ao fato de o câncer de estômago progredir quase de forma assintomática, e não existirem marcadores moleculares para a detecção precoce da doença (NECULA *et al.*, 2019). Como resultado, o câncer de estômago é frequentemente detectado em um estágio muito tardio, onde as possibilidades de tratamento são mais escassas (TSUGANE e SASAZUKI, 2007). Embora a radioterapia, quimioterapia e terapia sejam empregadas como opções de tratamento para o câncer gástrico, a resposta terapêutica ainda é limitada. Portanto, o desenvolvimento e validação de técnicas não invasivas que contribuem para o melhor entendimento da carcinogênese gástrica é crucial para desenvolver uma estratégia terapêutica eficaz. Ou *et al.* demonstraram como a hipóxia promoveu a migração e invasão da célula cancerígena gástrica BGC-823, ativando o HIF-1 α e inibindo a via de sinalização associada ao NDRG2 (gene que contribui para a diferenciação celular, supressão de tumores e desempenha papéis críticos no estresse celular), demonstrando a importância da hipóxia na progressão do câncer gástrico (OU *et al.*, 2018). No entanto, até o momento, a captação de qualquer radiotraçador de hipóxia, como [^{18}F]FMISO ou [^{18}F]FAZA, em modelos de câncer gástrico, não foi avaliada detalhadamente. Apenas recentemente foi realizado o primeiro estudo clínico com PET/CT usando o [^{18}F]FAZA em um paciente com tumor gástrico. Nesse estudo foi verificado com êxito a captação de [^{18}F]FAZA no microambiente tumoral, mostrando captação heterogênea em lesões pulmonares e captação no tumor gastrointestinal, sugerindo a possibilidade de usar um método não invasivo para visualizar hipóxia gastrointestinal como uma ferramenta que pode impactar o manejo do paciente (MAPELLI *et al.*, 2017a).

Nos resultados *in vitro* obtidos, a captação do [^{18}F]FBNA nas células AGS e MKN-45 hipóxicas foi maior em comparação com as células normóxicas para a primeira e terceira hora de incubação. Além disso, a captação de [^{18}F]FBNA na primeira hora de incubação foi maior em comparação com o [^{18}F]FAZA. Esses resultados são esperados devido ao maior caráter lipofílico do [^{18}F]FBNA em comparação com o [^{18}F]FAZA, o que resulta em uma penetração

mais rápida nas células tumorais em condições de hipóxia para menores tempos de incubação. O aumento da razão hipóxia/normóxia observada ao longo do tempo em ambas linhagens celulares sugere uma retenção sensível à hipóxia de [^{18}F]FAZA resultados em correspondência aos reportados por outros autores, utilizando linhagens tumorais diferentes (HAMANN *et al.*, 2018). e relatadas para outros compostos sensíveis à hipóxia confirmados, por exemplo, Sorger *et al.* estudando um modelo tumoral de células de carcinossarcoma em hipóxia, avaliaram a captação do [^{18}F]FMISO e observaram que a taxa de captação tumoral hipóxica de [^{18}F]FMISO aumentou de 1,5 aos 20 minutos para 3,0 aos 100 minutos. Nesse mesmo estudo, uma comparação da captação de [^{18}F]FAZA e [^{18}F]MISO em linhagem de células em hipóxia e normóxia, os resultados *in vitro* indicaram que a captação seletiva de hipóxia de [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO em células tumorais, 20 e 100 minutos após a incubação era da mesma magnitude (20 min: $1,24 \pm 0,4\%$ ([^{18}F]FAZA); $1,19 \pm 0,7\%$ ([^{18}F]MISO); 100 min: $3,6 \pm 1,6\%$ ([^{18}F]FAZA); $3,3 \pm 1,7\%$ ([^{18}F]MISO). Até agora esse é o único artigo onde é feita uma comparação celular direta usando [^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO (SORGER *et al.*, 2003). Esses resultados *in vitro* mostram que o [^{18}F]FAZA é capaz de indicar um suprimento reduzido de oxigênio na mesma ordem de magnitude que o [^{18}F]FMISO. O acúmulo de [^{18}F]FAZA nas células no presente estudo apenas ao final de três horas está em correspondência com o que foi reportado na literatura também (HAMANN *et al.*, 2018) mesmo em outros modelos tumorais nenhum estudo foi feito com células de câncer gástrico, mas independente da célula o mecanismo de entrada do [^{18}F]FAZA é o mesmo, difusão passiva (RICKARD, *et al.*, 2019).

Na análise da distribuição do [^{18}F]FBNA no sangue de camundongos saudáveis, foi possível observar que ao longo dos 60 min pós-injeção a radioatividade do [^{18}F]FBNA estava igualmente distribuída entre células e plasma, com apenas uma pequena porcentagem (cerca de 5 %) associada à fração proteica. Este dado é semelhante ao reportado para o comportamento do radiofármaco [^{18}F]FAZA em camundongos Balb/c saudáveis (JANS *et al.*, 2018). As análises por TLC da fração plasmática demonstraram que o [^{18}F]FBNA correspondeu a cerca de 70 % da radioatividade total do plasma ao final de 1h após a injeção, sendo que 30% correspondeu à produção de dois

radiometabólitos. Estas observações são essenciais para as análises de farmacocinética, pois elas refletem a quantidade total de radioatividade presente no sangue (isto é, não apenas o radiofármaco a ser estudado, mas também os seus metabólitos). Nesta presente tese, entretanto, não foram realizados estudos de farmacocinética. Segundos dados da literatura, o [^{18}F]FAZA apresenta pouco ou nenhum metabolismo (< 10% até um período de 60 min pós-injeção) em camundongos Balb/c (JANS *et al.*, 2018).

Quando injetado em pacientes, [^{18}F]FMISO e [^{18}F]FAZA mostraram-se metabolicamente estáveis no sangue (> 90%) (BRUEHLMEIER *et al.*, 2004; TSUNEO *et al.*, 2015). Em relação aos radiometabólitos de [^{18}F]FBNA, foi verificado que o radiometabólito 1, correspondente ao [^{18}F], pode ter sido originado por um processo de desflurinação. Ao longo do tempo, compostos aromáticos fluorados são geralmente mais resistentes ao metabolismo. No entanto, já foi verificado a ocorrência de desflurinação metabólica catalisada pelas enzimas do citocromo P450, levando à produção do íon fluoreto durante a oxidação biológica dos fluoretos de aril (HUGHES E SAUNDERS, 1954). Por exemplo, o metabolismo da 4-fluoro-L-fenilalanina pela fenilalanina hidroxilase resultou em L-tirosina e íon fluoreto (KAUFMAN, 1960). Além disso, o metabolismo do ácido 3,5-difluoro-4-hidroxibenzóico forneceu ácido fluorobenzoquinona-5-carboxílico e íon fluoreto (HUSAIN *et al.*, 1980). Por outro lado, o radiometabólito 2, aumenta discretamente ao final de 15 min, sendo encontrado no plasma numa fração correspondente a 7% ao final de 1 hora pós-injeção. Este radiometabólito (2) não foi identificado, nem caracterizado. No entanto, e devido às características da molécula [^{18}F]FBNA, acreditamos que possa originar-se de uma hidrólise no átomo de nitrogênio da ligação amida da molécula [^{18}F]FBNA, originando o radiometabólito [^{18}F]FBA. Caso venha a se confirmar, pelo fato do [^{18}F]FBA ser mais polar que o radiofármaco [^{18}F]FBNA, espera-se que este radiometabólito seja excretado através da depuração renal na urina.

Usando igualmente um modelo tumoral de câncer foram realizados estudos *in vivo* com o objetivo de proporcionar informação comparativa sobre a acumulação tumoral do [^{18}F]FBNA e [^{18}F]FAZA. Os estudos de imagens PET mostraram uma maior de captação do [^{18}F]FBNA pelo tumor quando comparado

com o [^{18}F]FAZA na primeira hora de estudo que são comparáveis aos resultados relatados anteriormente para [^{18}F]FAZA (SORGER *et al.*, 2003). De fato, durante a imagem PET com [^{18}F]FAZA ou [^{18}F]FMISO, é necessário aguardar de 2-4 horas após a administração dos radiofármacos para se obter uma imagem com contraste suficiente para se avaliar a hipóxia tumoral (CHALLAPALLI *et al.*, 2017). O [^{18}F]FBNA mostrou uma relação T/M e T/S significativamente maior na primeira hora após a injeção em comparação com o [^{18}F]FAZA. A relação T/M média de [^{18}F]FBNA observada em ≥ 30 min após a injeção foi superior a 1,4, que é o valor de corte para [^{18}F]FMISO e [^{18}F]FAZA para indicar regiões hipóxicas em vários tumores humanos por imagem PET (KOMAR *et al.*, 2008). Isto se deve ao fato do [^{18}F]FBNA possuir uma depuração mais rápida do corpo em comparação com o [^{18}F]FAZA. A maior captação do [^{18}F]FBNA na bexiga e nos rins em comparação com o fígado e os intestinos sugere uma eliminação renal do radiofármaco similar ao [^{18}F]FAZA, sendo considerada uma vantagem em relação ao [^{18}F]FMISO, que é excretado principalmente pelas vias hepatobiliar e gastrointestinal (PIERT *et al.*, 2005). Além disso, a relação T/M média de [^{18}F]FBNA duas horas após a injeção foi superior a 1,4 ($1,76 \pm 0,08$), que é o valor de corte para [^{18}F]FAZA para indicar positividade hipóxica em tumores por meio de imagem PET (PEETERS *et al.*, 2015). Finalmente, o [^{18}F]FBNA possui a vantagem de fornecer imagens com maior contraste em um menor tempo em comparação como [^{18}F]FAZA, o que pode reduzir os tempos de aquisição de imagem PET e o tempo de espera dos pacientes.

A autorradiografia, por outro lado, mostrou que o [^{18}F]FBNA assim como o [^{18}F]FAZA se acumulam em áreas mais centrais dos cortes tumorais provenientes de células MKN45. Essas áreas de hipóxicas costumam se concentrar na região central de tumores ou na periferia de regiões de necrose. Tal como na imagem PET, foi possível observar que o [^{18}F]FBNA foi captado pelo tumor nos primeiros tempos de estudo (até 2 horas p.i.) enquanto que a acumulação do [^{18}F]FAZA foi mais perceptível ao final de 3 h pós-injeção, o que se encontra em correspondência com o reportado por outros autores (BUSK *et al.*, 2008; BUSK *et al.*, 2013). Estes dados corroboram as imagens PET anteriores nas quais se verifica que o [^{18}F]FBNA é captado de forma mais precoce pelo tumor MKN-45 que o [^{18}F]FAZA. A comparação direta dos nossos resultados de

autorradiografia com os experimentos dos camundongos citados não é possível, já que o modelo animal e os tipos de tumor são diferentes nos estudos reportados na literatura (FLEMING *et al.*, 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Claramente, traçadores de hipóxia podem ser usados com sucesso somente enquanto a entrega do traçador ao tecido é mantida; assim, é importante ter um traçador altamente difusível com pouca tendência a particionar em membrana lipofílica ou tecido adiposo. O traçador deve cruzar facilmente a membrana capilar do sangue, preferencialmente sem o uso de sistemas transportadores de membrana, o que de outra forma poderia complicar a interpretação dos estudos traçadores. Mais importante ainda, um mecanismo de retenção específico de oxigênio deve determinar a quantidade de traçador que é temporariamente ou permanentemente capturado em tecidos hipóxicos. Isto implica que apenas as células viáveis que são hipóxicas reterão os traçadores de hipóxia. Idealmente, os radiometabólitos não devem ser encontrados na circulação no momento da imagem.

A pesquisa de hipóxia tem uma longa história; no entanto, a medição precisa e reproduzível da hipóxia clinicamente relevante ainda é um desafio importante na comunidade científica. Embora as medições de hipóxia por radionuclídeos tenham começado no início dos anos 80, ainda precisamos de um método amplamente aceito. Além de estudos com eletrodos de oxigênio, a imagem PET e imuno-histoquímica com pimonidazol tem sido a base da avaliação da hipóxia em estudos clínicos. A identificação dessas áreas com exames de hipóxia PET permite a orientação da imagem e, portanto, o aumento da dose de radiação para sub-volumes radorresistentes (BARTHEL *et al.*, 2004; ESCHMANN *et al.*, 2005; RAJENDRAN *et al.*, 2006). Houve algum sucesso no uso de medidas de hipóxia como parte de ensaios clínicos: vários estudos confirmaram que a hipóxia prediz falha locorregional à radioterapia (NORDSMARK *et al.*, 2005; MILOSEVIC *et al.*, 2012). Aumentar a dose para áreas intra-tumorais de resistência biológica (pintura de doses) está sendo adotado como uma estratégia para superar a radorresistência e melhorar os resultados (GEETS *et al.*, 2013). Isso é possível devido aos avanços no planejamento de tratamento de imagem e

radiação. A viabilidade dessa estratégia foi investigada em cânceres de cabeça e pescoço, pulmão e cérebro com Cu-ATSM (CHAO *et al.*, 2001), FMISO (RISCHIN *et al.*, 2006) e FAZA (GROSU *et al.*, 2007), principalmente em phantoms antropomórficos, e mais estudos são necessários para a tradução em benefício clínico. Por outro lado, houve vários desafios, em particular a baixa sensibilidade dos métodos que exigem longos períodos de avaliação (no que diz respeito aos métodos PET com derivados de nitroimidazol), natureza invasiva (no que diz respeito à imuno-histoquímica do pimonidazol), incapacidade de relacionar a saída medida à tensão de oxigênio (no que diz respeito métodos de ressonância magnética apesar da alta resolução espacial) e ampla heterogeneidade dentro e entre os tumores dos mesmos pacientes e temporalmente com o tratamento (todos os métodos).

Notavelmente, apesar do desenvolvimento de novas gerações de derivados de nitroimidazóis com propriedades físico-químicas substancialmente diferentes - alta hidrofiliabilidade - melhorias concomitantes na razão sinal-ruído e, portanto, redução nos tempos de imagem, não foram alcançadas, indicando que a estrutura química ideal ainda não foi encontrada. Este radiofármaco inédito, denominado [^{18}F]FBNA, apresentou captação em áreas de hipóxia tanto *in vitro* (em um modelo de câncer gástrico) quanto *in vivo*, além de: (1) fácil preparação; (2) o composto foi visualizado de forma não invasiva com uma alta resolução; (3) alta permeabilidade na membrana celular; (4) capacidade de absorção seletiva e de detecção das células hipóxicas; (5) quimicamente estável e rapidamente depurado da corrente sanguínea e outros tecidos. Além disso, verificou-se que apresentou características superiores aos principais radiofármacos desenvolvidos e utilizados em ensaios clínicos hoje em dia ([^{18}F]FAZA e [^{18}F]FMISO), o que torna a sua introdução na clínica mais favorável e viável. No entanto, também há escassez de estudos que examinam a heterogeneidade da hipóxia usando imagens paramétricas para detectar a influência dos sub-volumes da hipóxia e se esse detalhe adicional terá valor prognóstico ou preditivo. Com scanners PET-MRI, será possível fornecer informações adicionais, como perfusão, para aumentar a precisão das medições de hipóxia ou fornecer informações complementares com maior valor preditivo. Qualquer que seja o método selecionado, será necessária uma avaliação da precisão da medição, que não é

trivial com um fenômeno evanescente espaço-temporalmente como a hipóxia. Assim, aceita-se que a hipóxia possa ter valor prognóstico e preditivo significativo na clínica; no entanto, o melhor método para avaliação da hipóxia não foi, em nossa opinião, realizado.

7 CONCLUSÕES

1. A molécula FBNA foi sintetizada com sucesso e caracterizada química e estruturalmente (incluindo os seus intermediários sintéticos) por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e por Espectrometria de Massa (EM) confirmando sua estrutura química.
2. FBNA foi eficientemente radiomarcado manualmente com ^{18}F ($[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$), com bons tempos de radiosíntese, rendimento radioquímico, atividade molar e alta pureza radioquímica.
3. $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ mostrou-se estável em salina e em soro por até 6 horas e mais hidrofílico que o $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ e menos hidrofílico que o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$.
4. A distribuição de radioatividade do $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ no sangue demonstrou ser estável ao longo dos 60 min analisados .
5. $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ é captado especificamente por células gástricas em hipóxia (1% de O_2) em apenas 1 hora e não em células em condições fisiológicas (normóxia, 21% O_2). Por outro lado, o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ não é captado por células em hipóxia (1% de O_2) ao final de 1 hora, necessitando de pelo menos 3 horas para ser captado por células hipóxicas.
6. Utilizando um modelo tumoral de câncer gástrico humano verificou-se que o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ é captado pelo tumor ao final de 1 hora pós-injeção. Entretanto, o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ necessita de pelo menos 3 horas para ser captado pelo tumor.
7. Estudos de autorradiografia observou-se a maior concentração da radioatividade na margem e no interior do tumor, nos primeiros tempos de estudo até 120 minutos p.i. para o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$, o contrário foi observado para o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$, cuja concentração da radioatividade foi mais perceptível aos 180 minutos.
8. $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$ apresentou melhores valores de relações de Tumor/Músculo e Tumor/Sangue e a captação em todos os órgãos foram menores para o $[^{18}\text{F}]\text{FBNA}$, em comparação com o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$, no estudo de biodistribuição *ex vivo*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. E.; FLOCKHART, I. R.; SMITHEN, C. E.; STRATFORD, I. J.; WARDMAN, P.; WATTS, M. E. Electron-affinic sensitization. VII. A correlation between structures, one-electron reduction potentials, and efficiencies of nitroimidazoles as hypoxic cell radiosensitizers. ***Radiat. Res***, v. 67, n. 1, p. 9–20, 1976.

AIRLEY, R. E.; MOBASHERI, A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. ***Chemotherapy***, v. 53, n. 4, p. 233–256, 2007.

ALAWNEH, J. A.; MOUSTAFA, R. R.; MARRAPU, S. T.; JENSEN-KONDERING, U.; MORRIS, R. S.; JONES, P. S.; AIGBIRHIO, F. I.; FRYER, T. D.; CARPENTER, T. A.; WARBURTON, E. A.; Diffusion and perfusion correlates of the 18F-MISO PET lesion in acute stroke: Pilot study. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 41, n. 6, p. 736–744, 2014.

ALBIACH, C. F.; MORENO, A. C.; CORDON, M. R.; MORILLO, M. V.; BOUCHÉ, B. A.; BEATO, T. I.; SÁNCHEZ I. A.; FRANCÉS, M. A. Contribution of hypoxia-measuring molecular imaging techniques to radiotherapy planning and treatment. ***Clin Transl Oncol***, v. 12, n. 1, p. 22–26, 2010.

AL-HALLAQ, H. A.; RIVER, J. N.; ZAMORA, M.; OIKAWA, H.; KARCZMA, G. S. Correlation of magnetic resonance and oxygen microelectrode measurements of carbogen-induced changes in tumor oxygenation. ***Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.***, v. 41, n. 1, p. 151–159, 1998.

ALI, R.; APTE, S.; VILALTA, M.; SUBBARAYAN, M.; MIAO, Z.; CHIN, F. T.; GRAVES, E. E. 18F-EF5 PET is predictive of response to fractionated radiotherapy in preclinical tumor models. ***PLoS One***, v. 10, n. 10, p. 139–143, 2015.

ANDREASSEN, C. N.; ERIKSEN, J. G.; JENSEN, K.; HANSEN, C. R.; SØRENSEN, B. S.; LASSEN, P.; ALSNER, J.; SCHACK, L. M.; OVERGAARD, J.; GRAU, C. IMRT - Biomarkers for dose escalation, dose de-escalation and personalized medicine in radiotherapy for head and neck cancer. ***Oral Oncol.***, v. 86, n. 1, p. 91–99, 2018

ANDRZEJEWSKI, P.; WENGERT, G.; HELBICH, T. H.; MAGOMETSCHNIGG, H.; GEORG, D.; HACKER, M.; BALTZER, P.; CLAUSER, P.; KAPETAS, P.; GEORG, P.; WADSAK, W.; PINKER, K. Sequential [18F]FDG-[18F]FMISO PET and Multiparametric MRI at 3T for Insights into Breast Cancer Heterogeneity and

Correlation with Patient Outcomes: First Clinical Experience. **Contrast Media Mol Imaging**, v. 8, n. 1, p. 130–139, 2019.

ASANO, A.; UEDA, S.; KUJI, I.; YAMANE, T.; TAKEUCHI, H.; HIROKAWA, E.; SUGITANI, I.; SHIMADA, H.; HASEBE, T.; OSAKI, A.; SAEKI, T. Intracellular hypoxia measured by F-18 fluoromisonidazole positron emission tomography has prognostic impact in patients with estrogen-receptor positive breast (BRCR-D17-00693). **Breast Cancer Res**, v. 20, n. 1, p. 78–86, 2018.

BARTHEL, H.; WILSON, H.; COLLINGRIDGE, D. R.; BROWN, G.; OSMAN, S.; LUTHRA, S. K.; BRADY, F.; WORKMAN, P.; PRICE, P. M.; ABOAGYE, E. O. In vivo evaluation of [18F]fluoroetanidazole as a new marker for imaging tumour hypoxia with positron emission tomography. **Br. J. Cancer**, v. 90, n. 11, p. 2232–2242, 2004.

BAUDELET, C.; GALLEZ, B. How does blood oxygen level-dependent (BOLD) contrast correlate with oxygen partial pressure (pO₂) inside tumors? **Magn. Reson. Med.**, v. 48, n. 6, p. 980–986, 2002.

BEJOT, R.; DERSEMANS, V.; KELLY, C.; CARROL, L.; KING, R. C.; GOUWERNEUR, V. Pre-clinical evaluation of a 3-nitro-1,2,4-triazole analogue of [18F]FMISO as hypoxia-selective tracer for PET. **Nucl. Med. Biol.**, v. 37, n. 5, p. 565–575, 2010.

BENSAAD, K.; HARRIS, A. L. Hypoxia and metabolism in cancer. **Adv Exp Med Biol**, v. 772, n. 3, p. 1–39, 2014.

BEPPI, T.; TERASAKI, K.; SASAKI, T.; FUJIWARA, S.; MATSUURA, H.; OGASAWARA, K.; SERA, K.; YAMADA, N.; UESUGI, N.; SUGAI, T.; KUDO, K.; SASAKI, M.; EHARA, S.; IWATA, R.; TAKAI, Y. Standardized uptake value in high uptake area on positron emission tomography with 18F-FRP170 as a hypoxic cell tracer correlates with intratumoral oxygen pressure in glioblastoma. **Mol Imaging Biol**, v. 16, n. 1, p. 127–135, 2014.

BERNDT, M.; PIETZSCH, J.; WUEST, F. Labeling of low-density lipoproteins using the 18F-labeled thiol-reactive reagent N-[6-(4-[18 F]fluorobenzylidene) aminoxyhexyl] maleimide. **Nucl Med Biol**, v.34, n. 1, p. 5–15, 2007.

BETTIO, A.; HONER, M.; MULLER, C.; BRUHLMEIER, M.; MULLER, U.; SCHIBLI, R. Synthesis and preclinical evaluation of a folic acid derivative labeled with 18 F for PET imaging of folate receptor-positive tumors. **J Nucl Med**, v. 47, n. 7, p. 1153–1160, 2006.

BOŚ-LIEDKE, A.; WALAWENDER, M.; WOŹNIAK, A.; FLAK, D.; GAPIŃSKI, J.; JURGA, S.; KUCIŃSKA, M.; PLEWIŃSKI, A.; MURIAS, M.; ELEWA, M.; LAMPP, L.; IMMING, P.; TADYSZAK, K. EPR Oximetry Sensor-Developing a TAM Derivative for In Vivo Studies. **Cell Biochem Biophys**, v. 76, n. 2, p. 19–28, 2018.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRISTOW, R. G.; BERLIN, A.; DAL PRA, A. An arranged marriage for precision medicine: hypoxia and genomic assays in localized prostate cancer radiotherapy. **Br J Radiol**, v. 87, n. 1035, p. 201–230, 2014.

BROWN, J. M.; WORKMAN, P. Partition coefficient as a guide to the development of radiosensitizers which are less toxic than misonidazole. **Radiat Res**, v. 82, n. 1, p. 171–190, 1980.

BRUEHLMEIER, M.; ROELCKE, U.; SCHUBIGER, P. A.; AMETAMEY, S. M. Assessment of hypoxia and perfusion in human brain tumors using PET with 18F-fluoromisonidazole and 15O-H₂O. **Journal Nuclear Medicine**, v. 45, n. 11, p. 1851–1859, 2004.

BUCK, A. K.; NEKOLLA, S.; ZIEGLER, S.; BEER, A.; KRAUSE, B. J.; HERRMANN, K. SCHWAIGER M.; DRZEZGA, A. SPECT/CT*. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 8, p. 1305–1319, 2008.

BUSK, M.; HORSMAN, M. R.; KRISTJANSEN, P. E.; VAN DER KOGEL, A. J.; VAN DER KOGEL, A. J.; BUSSINK, J.; OVERGAARD, J. Aerobic glycolysis in cancer: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. **Int J Cancer**, v. 122, n. 12, p. 2726–2734, 2008.

BUSK, M.; JAKOBSEN, S.; HORSMAN, M. R.; MORTENSEN, L. S.; IVERSEN, A. B.; OVERGAARD, J.; NORDSMARK, M.; JI, X.; LEE, D. Y.; RALEIGH, J. R. PET imaging of tumor hypoxia using 18F-labeled pimonidazole. **Acta Oncol.**, v. 52, n. 7, p. 1300–1307, 2013.

BUSSINK, J.; KAANDERS, J.; VAN DER KOGEL, A. J. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. **Radiother Oncol**, v. 67, n. 1, p. 3–15, 2003.

CAI, L.; LU, S.; PIKE, V. W. Chemistry with [18F] fluoride ion. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2008, n. 17, p. 2853–2873, 2008.

CARCELLI, M.; ROGOLINO, D.; BACCHI, A.; RISPOLI, G.; FISICARO, E.; COMPARI, C.; SECHI, M.; STEVAERT, A.; NAESENS, L. Metal-chelating 2-hydroxyphenyl amide pharmacophore for inhibition of influenza virus endonuclease. **Mol Pharm.**, v. 11, n. 1, p. 304–316, 2014.

CHALLAPALLI, A.; CARROLL, L.; ABOAGYE, E. O. Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. **Clin Transl Imaging**, v. 5, n. 3, p. 225–253, 2017.

CHAPMAN, J. D.; FRANKO, A. J.; SHARPLIN, J. A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. **Br J Cancer**, v. 43, n. 4, p. 546–550, 1981.

CHAO, K. S.; BOSCH, W. R.; MUTIC, S.; LEWIS, J. S.; DEHDASHTI, F.; MINTUN, M. A.; DEMPSEY, J. F.; PEREZ C. A.; PURDY, J. A.; WELCH, M. J. (2001) A novel approach to overcome hypoxic tumor resistance: Cu-ATSM-guided intensity-modulated radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 49, n. 4, p. 1171–1182, 2001

CHENG, J.; LEI, L.; XU, J.; SUN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, X.; PAN, L.; SHAO, Z.; LIU, G. 18F-fluoromisonidazole PET/CT: a potential tool for predicting primary endocrine therapy resistance in breast cancer. **J Nucl Med**, v. 54, n. 3, p. 333–340, 2013.

CHITNENI, K. S.; PALMER, M. G.; ZALUTSKY, R. M.; DEWHIRST, W. M. Molecular Imaging of Hypoxia. **J. Nucl. Med.** v. 52, n. 2, p. 165–168, 2011.

CITRIN, D. E. Recent Developments in Radiotherapy. **N Engl J Med.**, v. 377, n. 11, p. 1065–1075, 2017.

CLARKE, H; PALLISTER C, J. The impact of anaemia on outcome in cancer. **Clin Lab Haematol**, v. 27, n. 1, p. 1–13, 2005.

CLINICALTRIALS.GOV - **U.S National Library of Medicine**. Estados Unidos, 2020. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 14 de maio de 2020.

COLE, E. L.; STEWART, M. N.; LITTICH, R.; HOAREAU, R.; SCOTT, P. J. Radiosyntheses using fluorine-18: the art and science of late stage fluorination. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 7, p. 875–900, 2014.

CONTI, M.; ERIKSSON, L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion. **EJNMMI Physics**, v. 3, n. 1, p. 8–17, 2016.

DE BRUYCKER, S.; VANGESTEL, C.; VAN DEN WYNGAERT, T.; PAUWELS, P.; WYFFELS, L.; STAELENS, S.; STROOBANTS, S. 18F-Flortanidazole Hypoxia PET Holds Promise as a Prognostic and Predictive Imaging Biomarker in a Lung Cancer Xenograft Model Treated with Metformin and Radiotherapy. **J Nucl Med.**, v. 60, n. 1, p. 34–40, 2019.

DEARLING, J. L.; PACKARD, A. B. Some thoughts on the mechanism of cellular trapping of Cu(II)-ATSM. **Nucl Med Biol**, v. 37, n. 3, p. 237–243, 2010.

DECRISTOFORO, C. **The radiopharmacy**. Viena: European Association of Nuclear Medicine. 2012.

DHANI, N.; FYLES, A.; HEDLEY, D.; MILOSEVIC, M. The clinical significance of hypoxia in human cancers. **Semin Nucl Med**, v. 45, n. 2, p. 110–121, 2015.

DIERCKX, R. A.; VAN DE WIELE, C. FDG uptake, a surrogate of tumour hypoxia? **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 35, n. 8, p. 1544–1549, 2008.

DUBOIS, L.; LANDUYT, W.; CLOETENS, L.; BOL, A.; BORMANS, G.; HAUSERMANS, K.; LABAR, D.; NUYTS, J.; GRÉGOIRE, V.; MORTELMANS L. [18F]EF3 is not superior to [18F]FMISO for PET-based hypoxia evaluation as measured in a rat rhabdomyosarcoma tumour model. **Eur J Nucl Med Mol Imaging.**, v. 36, n. 2, p. 209–218, 2009.

DUBOIS, L.; LANDUYT, W.; HAUSERMANS, K.; DUPONT, P.; BORMANS, G.; VERMAELEN, P.; FLAMEN, P.; VERBEKEN, E.; MORTELMANS, L. Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [(18)F]fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry. **Br J Cancer**, v. 91, n. 11, p. 1947–1954, 2004.

EARY, J. F.; LINK, J. M.; MUZ, I. M.; CONRAD, E. U.; MANKOFF, D. A.; WHITE, J. K.; KROHN, K. A. Multiagent PET for risk characterization in sarcoma. **J Nucl Med.**, v. 52, n. 4, p. 541–546, 2011.

ELSINGA, P. H. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. **Methods**, v. 27, n. 3, p. 208–217, 2002.

ESCHMANN, S. M.; PAULSEN, F.; REIMOLD, M.; DITTMANN, H.; WELZ, S.; REISCHL, G.; MACHULLA, H. J.; BARES, R. Prognostic impact of hypoxia imaging with 18F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. **J Nucl Med**, v. 46, n. 2, p. 253–260, 2005.

EVANS, S. M.; JUDY, K. D.; DUNPHY, I.; JENKINS, W. T.; NELSON, P. T.; COLLINS, R.; GEOERGER, B.; KOCH, C. J. Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle electrodes and EF5 binding. **Cancer Res**, v. 64, n. 5, p. 1886–1892, 2004.

FLEMING, I. N.; MANAVAKI, R.; BLOWER, P. J.; WEST, C.; WILLIAMS, K. J.; HARRIS, A. L.; DOMARKAS, J.; LORD, S.; BALDRY, C.; GILBERT, F. J. Imaging tumour hypoxia with positron emission tomography. **Br J Cancer**, v. 112, n. 2, p. 238–250, 2015.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 442–447, 1987.

FONTI, R.; CONSON, M.; DEL VECCHIO, S. PET/CT in radiation oncology. **Semin Oncol.**, v. 46, n. 3, p. 202–209, 2019.

FRANK, W.; WUEST, F.; Positron emission tomography radiotracers for imaging hypoxia. **J Labelled Comp Radiopharm.**, v. 56, n. 4, p. 244–250, 2013.

FURNISS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; SMITH, P. W. G.; TATCHELL, A. R. **Vogel's text book of practical organic chemistry**. 5th edition London: Pearson Education, 2006.

GARIÉPY, J.; RÉMY, S.; ZHANG, X.; BALLINGER, J. R.; BOLEWSKA-PEDYCZAK, E.; RAUTH, M.; BISLAND, S.K. A simple two-step approach for introducing a protected diaminedithiol chelator during solid-phase assembly of peptides. **Bioconjug Chem.**, v. 13, n. 3, p. 679–684, 2002.

GEETS, X.; GREGOIRE, V.; LEE, J. A. Implementation of hypoxia PET imaging in radiation therapy planning. **J Nucl Med Mol Imaging**, v. 57, n.3, p. 271–282, 2013.

GRAVES, E. E.; HICKS, R. J.; BINNS, D.; BRESSEL, M.; LE, Q. T.; PETERS, L.; YOUNG, R. J.; RISCHIN, D. Quantitative and qualitative analysis of [(18)F]FDG and [(18)F]FAZA positron emission tomography of head and neck cancers and associations with HPV status and treatment outcome. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 43, n. 4, p. 617–625, 2016.

GREENE, T. W.; WUTS, P. M. **Protective groups in organic synthesis**, 3rd edition New York: John Wiley and Sons Ltd, 1999.

GRIERSON, J. R.; LINK, J. M.; MATHIS, C. A.; RASEY, J. S.; KROHN, K. A. A radiosynthesis of fluorine-18 fluoromisonidazole. **J Nucl Med**, v. 30, n. 3, p. 343–350, 1989.

GRKOVSKI, M.; LEE, N. Y.; SCHODER, H.; CARLIN, S. D.; BEATTIE, B. J.; RIAZ, N. Monitoring early response to chemoradiotherapy with (18)F-FMISO dynamic PET in head and neck cancer. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 44, n. 10, p. 1682–1689, 2017.

GRÖNROOS, T.; ESKOLA, O.; LEHTIÖ, K.; MINN, H.; MARJAMÄKI, P.; BERGMAN, J.; HAAPARANTA, M.; FORSBÄCK, S.; SOLIN, O. Pharmacokinetics of [18F]FETNM: a potential marker for PET. **J Nucl Med**, v. 42, n. 9, p. 1397–1404, 2001.

GRÖNROOS, T.; LEHTIÖ, K.; SÖDERSTRÖM, K. O.; KRONQVIST, P.; LAINE, J.; ESKOLA, O.; VILJANEN, T.; GRÉNMAN, R.; SOLIN, O.; MINN, H. Hypoxia, blood flow and metabolism in squamous-cell carcinoma of the head and neck: correlations between multiple immunohistochemical parameters and PET. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 876–887, 2014.

GROSU, A. L.; SOUVATZOGLU, M.; ROPER, B.; DOBRITZ, M.; WIEDENMANN, N.; JACOB, V.; WESTER, H. J.; REISCHL, G.; MACHULLA, H. J.; SCHWAIGER, M.; MOLLS, M.; PIERT, M. Hypoxia imaging with FAZA-PET and theoretical considerations with regard to dose painting for individualization of radiotherapy in patients with head and neck cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 69, n. 2, p. 541–551, 2007.

GUO, M.; SHI, J. H.; WANG, P. L.; SHI, D. Z. Angiogenic Growth Factors for Coronary Artery Disease: Current Status and Prospects. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 23, n. 2, p. 130–141, 2018.

HAMANN, I.; KRYSS, D.; GLUBRECHT, D.; BOUVET, V.; MARSHALL, A.; VOS, L.; MACKEY, J. R.; WUEST, M.; WUEST, F. Expression and function of hexose

transporters GLUT1, GLUT2, and GLUT5 in breast cancer-effects of hypoxia. **FASEB J.**, v. 32, n. 9, p. 5104–5118, 2018.

HAN, K.; SHEK, T.; VINES, D.; DRISCOLL, B.; FYLES, A.; JAFFRAY, D.; KELLER, H.; METSER, U.; PINTILIE, M.; XIE, J.; YEUNG, I.; MILOSEVIC, M. Measurement of Tumor Hypoxia in Patients With Locally Advanced Cervical Cancer Using Positron Emission Tomography with 18F-Fluoroazomyin Arabinoside. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 102, n. 4, p. 1202–1209, 2018.

HANDLEY M. G.; MEDINA R. A.; NAGEL E.; BLOWER P. J.; SOUTHWORTH R. PET imaging of cardiac hypoxia: Opportunities and challenges. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 51, n. 5, p. 640–650, 2012.

HAVELUND, B. M.; HOLDGAARD, P. C. RAFAELSEN, S. R.; MORTENSEN, L. S.; THEIL, J.; BENDER, D.; PLØEN, J.; SPINDLER, K. L.; JAKOBSEN, A. Tumour hypoxia imaging with 18F-fluoroazomycin arabinofuranoside PET/CT in patients with locally advanced rectal cancer. **Nucl Med Commun.**, v. 34, n. 2, p. 155–161, 2013.

HAYASHI, K.; FURUTSUKA, K.; TAKEI, M.; MUTO, M.; NAKAO, R.; AKI, H.; SUZUKI, K.; FUKUMURA, T. High-yield automated synthesis of [18F]fluoroazomycin arabinoside ([18F]FAZA) for hypoxia-specific tumor imaging. **Appl Radiat Isot.**, v. 69, n. 7, p.1007–1013, 2011.

HEARSE DJ. Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century? **Cardiovasc Res.**, v. 28, n. 5, p. 1737–1744, 1994.

HENDRICKSON, K.; PHILLIPS, M.; SMITH, W.; PETERSON, L.; KROHN, K.; RAJENDRAN, J. Hypoxia imaging with [F-18] FMISO-PET in head and neck cancer: potential for guiding intensity modulated radiation therapy in overcoming hypoxia-induced treatment resistance. **Radiother Oncol**, v. 101, n. 3, p. 369–375, 2011.

HIRATA, K.; YAMAGUCHI, S.; SHIGA, T.; KUGE, Y.; TAMAKI, N.; The Roles of Hypoxia Imaging Using 18F-Fluoromisonidazole Positron Emission Tomography in Glioma Treatment. **J Clin Med.**, v. 8, n. 8, p. 1088–1105, 2019.

HOCKEL, M.; KNOOP, C.; SCHLENGER, K.; VORNDRAN, B.; BAUSSMANN, E.; MITZE, M.; KNAPSTEIN, P. G.; VAUPEL, P. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. **Radiother Oncol**, v. 26, n. 1, p. 45–50, 1993.

HU, M.; XIE, P.; LEE, N. Y.; LI, M.; HO, F.; LIAN, M.; ZHAO, S.; YANG, G.; FU, Z.; ZHENG, J.; MA, L.; YU, J. Hypoxia with 18F-fluoroerythronitroimidazole integrated

positron emission tomography and computed tomography (18F-FETNIM PET/CT) in locoregionally advanced head and neck cancer: Hypoxia changes during chemoradiotherapy and impact on clinical outcome. **Medicine (Baltimore)**, v. 98, n. 40, p. 17067–17075, 2019.

HUANG, H.; ZHOU, H.; LI, Z.; WANG, X.; CHU, T. Effect of a second nitroimidazole redox centre on the accumulation of a hypoxia marker: Synthesis and in vitro evaluation of 99mTc-labeled bisnitroimidazole propylene amine oxime complexes **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, n. 1, p. 172–177, 2012.

HUGHES, G.; SAUNDERS, B. Enzymatic rupture of a C-F bond. **Chem. Ind.**, v. 14, n. 5, p. 1265–1269, 1954.

HUSAIN, M.; ENTSCH, B.; BALLOU, D. P.; MASSEY, V.; CHAPMAN, P.J. Fluoride elimination from substrates in hydroxylation reactions catalyzed by p-hydroxybenzoate hydroxylase. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 9, p. 4189–4197, 1980.

IJSPEERT, J.E.; VERMEULEN, L.; MEIJER, G. A.; DEKKER, E. Serrated neoplasia - role in colorectal arcinogenesis and clinical implications. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 7, p. 401–409, 2015.

IMAIZUMI, A.; OBATA, T.; KERSHAW, J.; TACHIBANA, Y.; INUBUSHI, M.; KOIZUMI, M.; YOSHIKAWA, K.; ZHANG, M. R.; TANIMOTO, K.; HARADA, R.; UNO, T.; SAGA, T. Imaging of Hypoxic Tumor: Correlation between Diffusion-weighted MR Imaging and 18F-fluoroazomycin Arabinoside Positron Emission Tomography in Head and Neck Carcinoma. **Magn Reson Med Sci**, v. 17, n. 3, p. 431–439, 2019.

IMAM, S. K. Review of positron emission tomography tracers for imaging of tumor hypoxia. **Cancer Biother Radiopharm.**, v. 25, n. 3, p. 365–374, 2010.

INCA - **Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil - estimativa 2020.** Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 20 junho, 2020.

JACOBSON, O.; KIESEWETTER, D. O.; CHEN, X. Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 1–18, 2015.

JANS, H.; YANG, X.; BROCKS D. R.; KUMAR, P.; WUEST, M.; WIEBEL. Positron Emission Tomography (PET) and Pharmacokinetics: Classical Blood Sampling

Versus Image-Derived Analysis of [18F]FAZA and [18F]FDG in a Murine Tumor Bearing Model. **J Pharm Pharm Sci**, v. 21, n. 2, p. 32–47, 2018.

JEGHERS, O.; PIEPZS, A.; HAM, H. R. What does protein binding of radiopharmaceuticals mean exactly. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 17, n. 5, p. 101–102, 1990.

JOSSE, O., LABAR, D.; GEORGES, B.; GRÉGOIRE, V.; MARCHAND-BRYNAERT, J. Synthesis of [18F]-labeled EF3 [2-(2-nitroimidazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)-acetamide], a marker for PET detection of hypoxia. **Bioorg Med Chem.**, v. 9, n. 3, p. 665–675, 2001.

KÄMÄRÄINEN, E. **F-18 labelling synthesis, radioanalysis and evaluation of a dopamine transporter and a hypoxia tracer**. Academic Dissertation – University of Helsinki. Finland, Helsinki, 2007.

KANETA, T.; TAKAI, Y.; IWATA, R.; HAKAMATSUKA, T.; YASUDA, H.; NAKAYAMA, K.; FUKUDA, H.; TAKAHASHI, S.; YAMADA, S. Initial evaluation of dynamic human imaging using 18F-FRP170 as a new PET tracer for imaging hypoxia. **Ann Nucl Med**, v. 21, n. 2, p. 101–107, 2007.

KAUFMAN, S. Hydroxylation of 4- fluoro-L-phenylalanine by phenylalanine hydroxylase results in L-tyrosine and fluoride ion. **Biochim. Biophys**, v.51, n.2, p. 619–625, 1961

KHURANA, J. ; GOGIA, A. Synthetically useful reactions with nickel boride. A review. **Org. Prep. & Proced. Int.**, v. 29, n. 1, p. 1–32, 1997.

KHURANA, J.; KUKREJA, G. Rapid reduction of nitriles to primary amines with nickel boride at ambient temperature. **Synth. Commun**, v. 32, n. 8, p. 1265–1269, 2002.

KIM, D. W.; AHN, D. S.; OH, Y. H.; LEE, S.; KIL, H. S.; OH, S. J.; LEE, S. J.; KIM, J. S.; RYU, J. S.; MOON, D. H.; CHI, D. Y. A new class of SN2 reactions catalyzed by protic solvents: Facile fluorination for isotopic labeling of diagnostic molecules. **Am. Chem. Soc.**, v. 128, n. 50, p. 16394–16397, 2006.

KIZAKA, K. S.; KONSE N. H. Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. **Cancer Sci.**, v. 100, n. 8, p. 1366–1373, 2009.

KOCH, C. J.; EVANS, S. M.; LORD, E. M. Oxygen dependence of cellular uptake of EF5 [2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)acetamide] : analysis of drug adducts by fluorescent antibodies vs bound radioactivity. **Br J Cancer**, v. 72, n. 4, p. 869–874, 1995.

KOCH, C. J.; SCHEUERMANN, J. S.; DIVGI, C.; JUDY, K. D.; KACHUR, A. V.; FREIFELDER, R.; REDDIN, J. S.; KARP, J.; STUBBS, J. B.; HAHN, S. M.; DRIESBAUGH, J.; SMITH, D.; PRENDERGAST, S.; EVANS, S. M. Biodistribution and dosimetry of (18)F-EF5 in cancer patients with preliminary comparison of (18)F-EF5 uptake versus EF5 binding in human glioblastoma. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 37, n. 11, p. 2048–2059, 2010.

KOMAR, G.; SEPPANEN, M.; ESKOLA, O.; LINDHOLM, P.; GRÖNROOS, T. J.; FORSBACK, S. F-18-EF5: a new PET tracer for imaging hypoxia in head and neck cancer. **J Nucl Med**, v. 49, n. 12, p. 1944–1951, 2008.

KOSLOWSKY, I.; MERCER, J.; WUEST, F. Synthesis and Application of 4-[(18)F]fluorobenzylamine: A Versatile Building Block for the Preparation of PET Radiotracers. **Org Biomol Chem**, v. 8, n. 5, p. 4730–4735, 2010.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 472–482, 2008.

KROHN, K. A.; LINK, J. M.; MASON, R. P. Molecular imaging of hypoxia. **J Nucl Med**, v. 49, n. 2, p. 129–148, 2008.

KURIHARA, H.; HONDA, N.; KONO, Y.; ARAI, Y. Radiolabelled agents for PET imaging of tumor hypoxia. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, n. 20, p. 3282–3289, 2012.

LAPI, S. E.; LEWIS, J. S.; DEHDASHTI, F. Evaluation of hypoxia with copper-labeled diacetyl-bis(N-methylthiosemicarbazone). **Semin Nucl Med**, v. 45, n. 2, p. 177–185, 2015.

LASNE, M. C.; PERRIO, C.; ROUDEN, J.; BARRÉ, L.; ROEDA, D.; DOLLE, F.; CROUZEL, C. Chemistry of β^+ -emitting compounds based on fluorine-18. **Topics in Current Chemistry**, v. 222, n. 1, p. 201–258, 2002.

LEE, S. T.; SCOTT, A. M. Hypoxia positron emission tomography imaging with 18f-fluoromisonidazole. **Semin Nucl Med**, v. 37, n. 6, p. 451–461, 2007.

LEHTIO, K.; OIKONEN, V.; GRONROOS, T.; ESKOLA, O.; KALLIOKOSKI, K.; BERGMAN, J.; SOLIN, O.; GRENNAN, R.; NUUTILA, P.; MINN, H. Imaging of blood flow and hypoxia in head and neck cancer: initial evaluation with [(15)O]H(2)O and [(18)F]fluoroerythronitroimidazole PET. **J Nucl Med**, v. 42, n. 11, p. 1643–1652, 2001.

LEWIS J. S.; HERRERO, P.; SHARP, T. L.; ENGELBACH, J. A.; FUJIBAYASHI, Y.; LAFOREST, R.; KOVACS, A.; GROPLER, R. J.; WELCH M. J. Delineation of hypoxia in canine myocardium using PET and copper(II)-diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone). **J Nucl Med**, v. 43, n. 8, p. 1557–1569, 2002.

LEWIS, J. S.; LAFOREST, R.; DEHDASHTI, F.; GRIGSBY, P. W. ; WELCH, M. J. ; SIEGEL, B. A. An imaging comparison of ⁶⁴Cu-ATSM and ⁶⁰Cu-ATSM in cancer of the uterine cervix. **J Nucl Med**, v. 49, n. 7, p. 1177–1182, 2008.

LI, F.; JOERGENSEN, J. T.; HANSEN, A. E.; KJAER A. Kinetic modeling in PET imaging of hypoxia. **Am J Nucl Med Mol Imaging**, v. 4, n. 6, p. 490–506, 2014.

LIESER, K. H. **Nuclear and Radiochemistry: Fundamentals and Applications**. Second Edition. Federal Republic of Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH, D-69469 Weinheim, 2001.

LOEB, L. A; HARRIS, C. C. **AACR Centennial Series Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective**, 2013.

LOPCI, E.; GRASSI, I.; CHITI, A.; NANNI, C.; CICORIA, G.; TOSCHI, L.; FONTI, C.; LODI, F.; MATTIOLI, S.; FANTI, S. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. **Am J Nucl Med Mol Imaging**, v. 4, n. 4. p. 365–384, 2014.

LV, X.; LI, J.; ZHANG, C.; HU T.; LI, S.; HE, S.; YAN, H.; TAN, Y.; LEI, M.; WEN, M.; ZUO, J. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. **Genes Dis**, v. 4, n. 1, p. 19–24, 2017.

LYTHGOE, M. F.; WILLIAMS, S. R.; WIEBE, L. I.; MCEWAN, A. J.; GORDON, I. Autoradiographic imaging of cerebral ischaemia using a combination of blood flow and hypoxic markers in an animal model. **Eur J Nucl Med**, v. 24, n. 1, p.16–20, 1997.

MANSFIELD, K. D.; GUZY, R. D.; PAN, Y.; YOUNG, R. M.; CASH, T. P.; SCHUMACKER, P. T.; SIMON, M. C. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of

cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. **Cell Metab.**, n. 6, p. 393–399, 2005.

MAPELLI, P.; INCERTI, E.; FALLANCA, F.; BETTINARDI, V.; COMPIERCHIO, A.; MASIELLO, V.; DOGLIONI, C.; ROSSETTI, F.; NEGRI, G.; GIANOLLI, L.; PICCHIO, M. Concomitant Lung Cancer and Gastrointestinal Stromal Tumor: First Report of Hypoxia Imaging With 18F-FAZA PET/CT. **Clin Nucl Med.**, v. 42, n. 7, p. 349–351, 2017a.

MAPELLI, P.; ZERBETTO, F.; INCERTI, E.; CONTE, G. M.; BETTINARDI, V.; FALLANCA, F.; ANZALONE, N.; DI MUZIO, N.; GIANOLLI, L.; PICCHIO, M.; 18F-FAZA PET/CT Hypoxia Imaging of High-Grade Glioma Before and After Radiotherapy. **Clin Nucl Med.**, v. 42, n. 12, p. 525–526, 2017b.

MAPELLI, P.; BETTINARDI, V.; FALLANCA, F.; INCERTI, E.; COMPIERCHIO, A.; ROSSETTI, F.; COLIVA, A.; SAVI, A.; DOGLIONI, C.; NEGRI, G.; GIANOLLI, L.; PICCHIO, M. 18F-FAZA PET/CT in the Preoperative Evaluation of NSCLC: Comparison with 18F-FDG and Immunohistochemistry. **Curr Radiopharm.** 2018, v. 11, n. 1, p. 50–57, 2018.

MCALLISTER, S. S.; WEINBERG, R. A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 8, p. 717–727, 2014.

MCCLELLAND, R. A.; PANICUCCI, R.; RAUTH, M. Products of the Reductions of 2-Nitroimidazoles **J. Am. Chem. Soc.** 1987, v. 109, n. 1, p. 4308–4314, 1987.

MCGOWAN, D. R.; MACPHERSON, R. E.; HACKETT, S. L.; LIU, D.; GLEESON, F. V.; MCKENNA, W. G.; HIGGINS, G. S.; FENWICK, J. D. 18 F-fluoromisonidazole uptake in advanced stage non-small cell lung cancer: A voxel-by-voxel PET kinetics study. **Med Phys.**, v. 44, n. 9, p. 4665–4676, 2017.

MEES, G.; DIERCKX, R.; VANGESTEL, C.; VAN DE WIELE, C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. **J. Nucl. Mol. Imaging**, v. 36, n. 10, p. 1674–1686, 2009.

MILOSEVIC, M.; WARDE, P.; MENARD, C.; CHUNG, P.; TOI, A.; ISHKANIAN, A.; MCLEAN, M.; PINTILIE, M.; SYKES, J.; GOSPODAROWICZ, M.; CATTON, C.; HILL, R. P.; BRISTOW, R. Tumor hypoxia predicts biochemical failure following radiotherapy for clinically localized prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v.18, n. 7, p. 2108–2114, 2012.

MINN, H.; GRONROOS, T. J.; KOMAR, G.; ESKOLA, O.; LEHTIO, K.; TUOMELA, J.; SEPPANEN, M.; SOLIN, O. Imaging of tumor hypoxia to predict treatment sensitivity. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, n. 28, p. 2932–2942, 2008.

MIRABELLO, V.; CORTEZON-TAMARIT F.; PASCU, S. I. Oxygen sensing, hypoxia tracing and in vivo imaging with functional metalloprobes for the early detection of non-communicable diseases. **Front Chem**, v. 23, n. 1, p. 6–27, 2018.

MISHRA, A. Angiogenic neovessels promote tissue hypoxia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 38, p. 10458–10460, 2016.

MÖNNICH, D.; THORWARTH, D.; LEIBFARTH, S.; PFANNENBERG, C.; REISCHL, G.; MAUZ, P. S.; NIKOLAOU, K.; ZIPS, D.; WELZ, S. Overlap of highly FDG-avid and FMISO hypoxic tumor subvolumes in patients with head and neck cancer. **Acta Oncol.**, v. 56, n. 11, p. 1577–1582, 2017.

MORTENSEN, L. S.; JOHANSEN, J.; KALLEHAUGE, J.; PRIMDAHL, H.; BUSK, M.; LASSEN, P.; ALSNER, J.; SORENSEN, B. S.; TOUSTRUP, K.; JAKOBSEN, S.; PETERSEN, J.; PETERSEN, H.; THEIL, J.; NORDSMARK, M.; OVERGAARD, J. FAZA PET/CT hypoxia imaging in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy: results from the DAHANCA 24 trial. **Radiother Oncol**, v. 105, n. 1, p. 14–20, 2012.

MUKAI, T. ; SUWADA, J. ; SANO, K.; OKADA, M.; YAMAMOTO, F.; MAEDA, M. Design of Ga–DOTA-based bifunctional radiopharmaceuticals: Two functional moieties can be conjugated to radiogallium–DOTA without reducing the complex stability **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 13, p. 4285–4289, 2009.

MURAKAMI, M.; ZHAO, S.; ZHAO, Y.; CHOWDHURY, N. F.; YU, W.; NISHIJIMA, K.; TAKIGUCHI, M.; TAMAKI, N.; KUGE, Y. Evaluation of changes in the tumor microenvironment after sorafenib therapy by sequential histology and 18F-fluoromisonidazole hypoxia imaging in renal cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 41, n. 5, p.1593–1600, 2012.

NAKATA, N.; KIRIU, M.; OKUMURA, Y.; ZHAO, S.; NISHIJIMA, K. I.; SHIGA, T.; TAMAKI, N.; KUGE, Y.; MATSUMOTO, H. Comparative evaluation of [¹⁸F]DiFA and its analogs as novel hypoxia positron emission tomography and [¹⁸F]FMISO as the standard. **Nucl Med Biol**, v. 70, n. 1, p. 39–45, 2019.

NECULA, L.; MATEI, L.; DRAGU, D.; NEAGU, A. I.; MAMBET, C.; NEDEIANU, S.; BLEOTU, C.; DIACONU, C. C.; CHIVU-ECONOMESCU, M. Recent advances in

gastric cancer early diagnosis. **World J Gastroenterol.**, v. 25, n.17, p. 2029–2044, 2019.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.

NIELD, L. E.; QI, X. L.; VALSANGIACOMO, E.R.; MACGOWAN, C. K.; WRIGHT, G. A.; HORNBERGER, L. K.; YOO, S. In vivo MRI measurement of blood oxygen saturation in children with congenital heart disease. **Pediatr Radiol.**,v. 35, n. 2, p. 179–185, 2005.

NIX, J. S.; HAFFNER, M. C.; AHSAN, S.; HICKS, J.; DE MARZO, A. M.; BLAKELEY, J.; RAABE, E. H.; RODRIGUEZ, F. J. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors Show Decreased Global DNA Methylation. **J Neuropathol Exp Neurol** , v. 77, n. 10, p. 958–963, 2018.

NORDSMARK, M.; BENTZEN, S. M.; RUDAT, V.; BRIZEL, D.; LARTIGAU, E.; STADLER, P.; BECKER, A.; ADAM, M.; MOLLS, M.; DUNST, J.; TERRIS, D. J.; OVERGAARD, J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. **Radiother Oncol**, v. 77, n. 1, p. 18–24, 2005.

O'CONNOR, J. P.; BOULT, J. K.; JAMIN, Y.; BABUR, M.; FINEGAN, K. G.; WILLIAMS, K. J.; LITTLE, R. A.; JACKSON, A.; PARKER, G. J.; REYNOLDS, A. R.; WATERTON, J. C.; ROBINSON, S. P. Oxygen-enhanced MRI accurately identifies, quantifies, and maps tumor hypoxia in preclinical cancer models. **Cancer Res**, v. 76, n.4, p. 787–795, 2018.

OGAWA, M.; HATANO, K.; OISHI, S.; KAWASUMI, Y.; FUJII, N.; KAWAGUCHI, M.; DOI, M.; IMAMURA, M.; YAMAMOTO, M.; AJITO, K.; MUKAI, T.; SAJI, H.; ITO, K. Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo alpha(v)beta3 integrin related tumor imaging. **Nucl. Med. Biol**, v. 30, n. 1, p. 1–9, 2003.

OIKAWA, K.; KOBAYASHI, M.; BEPPU, T.; TERASAKI, K.; OGASAWARA, K. Resolution of Hypoxic Tissue in Cerebellar Hemispheres After Arterial Bypass Surgery in a Patient With Symptomatic Bilateral Vertebral Artery Occlusion: A 18F-FRP170 PET Study. **Clin Nucl Med.**, v. 44, n. 4, p. 295–296, 2019.

OU, X. W.; WANG, R. X.; KANG, M. F.; SHI, J. Q. Hypoxia Promotes Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by Activating HIF-1 α and Inhibiting NDRG2 Associated Signaling Pathway. **Eur Rev Med Pharmacol**, v. 22, n. 23, p. 8237–8247, 2018.

PARLIAMENT, M. B.; CHAPMAN, J. D.; URTASUN, R. C.; MCEWAN, A. J.; GOLBERG, L.; MERCER, J. R.; MANNAN, R. H.; WIEBE, L. I. BR. Non-invasive assessment of human tumour hypoxia with 123I-iodoazomycin arabinoside: preliminary report of a clinical study. **J. Cancer**, v. 65, n. 1, p. 90–95, 1992.

PEARCE, W. J. Fetal Cerebrovascular Maturation: Effects of Hypoxia. **Semin Pediatr Neurol**, v. 28, n.1, p. 17–28, 2018.

PEETERS, S. G.; ZEGERS, C. M.; LIEUWES, N.G.; ERIKSSON, J.; VAN DONGEN, G. A. A comparative study of the hypoxia PET tracers [18F]HX4, [18F]FAZA, and [18F]FMISO in a preclinical tumor model. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 91, n. 2, p. 351–359, 2015.

PIERT, M. **Hypoxia imaging. Principles and practice of PET and PET/CT**. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2009.

PIERT, M.; MACHULLA, H. J.; PICCHIO M. Hypoxia-specific tumor imaging with 18F-fluoroazomycin arabinoside. **J Nucl Med**, v. 46, n. 1, p. 106–113, 2005.

POSTEMA, E. J.; MCEWAN, A. J.; RIAUKA, T. A.; KUMAR, P.; RICHMOND, D. A.; ABRAMS, D. N.; WIEBE, L. I. Initial results of hypoxia imaging using 1- α -D: -(5-deoxy-5-[18F]-fluoroarabinofuranosyl)-2-nitroimidazole (18F-FAZA). **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 36, n. 10, p. 1565–1573, 2009.

POWIS, G.; KIRKPATRICK, L. Hypoxia inducible factor-1 α as a cancer drug target. **Mol Cancer Ther.**, v. 3, n. 5, p. 647–654, 2004.

PURI, T.; GREENHALGH, T. A.; WILSON, J. M.; FRANKLIN, J.; WANG, L. M.; STRAUSS, V.; CUNNINGHAM, C.; PARTRIDGE, M.; MAUGHAN, T. [18F]Fluoromisonidazole PET in rectal cancer. **EJNMMI Res.**, v. 7, n. 1, p. 78–95, 2018.

QI, Z. H.; LI, C. F.; LI, Z. F.; ZHANG, K.; WANG, Q.; YU, D. X. Preliminary study of 3T 1H MR spectroscopy in bone and soft tissue tumors. **Chin Med J**, v. 122, n. 1, p. 39–43, 2009.

QIAN, Y.; VON, E. R.; LIU, Y.; CHIN, F. T.; MIAO, Z.; APTE, S. GRAVES, E.E.; LOO BW. J.L (18)F-EF5 PET-based imageable hypoxia predicts local recurrence in

tumors treated with highly conformal radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 102, n. 4, p. 1183–1192, 2018.

QIAO, Z.; REDLER, G.; EPEL, B.; QIAN, Y.; HALPERN, H. 3D pulse EPR imaging from sparse-view projections via constrained, total variation minimization. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 258, n. 1, p. 49–57, 2015.

QUARTUCCIO, N.; ASSELIN, M.C. The Validation Path of Hypoxia PET Imaging: Focus on Brain Tumours. *Curr Med Chem.*, v. 25, n. 26, p. 3074–3095, 2018.

QUINTERO, M.; MACKENZIE, N.; BRENNAN, P. A. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol.*, v. 30, n. 5, p. 465–468, 2004.

RAHMIM, A.; ZAIDI, H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nuclear Medicine Communications*, v. 29, n. 3, p. 193–207, 2008.

RAJENDRAN, J. G.; KROHN, K. A. F-18 fluoromisonidazole for imaging tumor hypoxia: imaging the microenvironment for personalized cancer therapy. *Semin Nucl Med.*, v. 45, n. 2, p. 151–162, 2015.

RAJENDRAN, J.; KROHN, K. A. Imaging hypoxia and angiogenesis in tumors. *Radiol Clin N Am*, v. 43, n. 1, p. 169–187, 2005

RAJENDRAN, J.; SCHWARTZ, D. L.; O'SULLIVAN, J.; PETERSON, L. M.; NG, P.; SCHARNHORST, J.; GRIERSON, J. R.; KROHN, K. A. Tumor hypoxia imaging with [F-18]fluoromisonidazole positron emission tomography in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, v. 12, n. 18, p. 5435–5441, 2006.

RAMJIAWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? *Angiogenesis*, v. 20, n. 2, p. 185–204, 2017.

RASEY, J. S.; HOFSTRAND, P. D.; CHIN, L. K.; TEWSON, T. J. Characterization of [18F]fluoroetanidazole, a new radiopharmaceutical for detecting tumor hypoxia. *J Nucl Med.*, v. 40, n. 6, p. 1072–1079, 1999.

READ, S. J.; HIRANO, T.; ABBOTT, D. F.; MARKUS, R.; SACHINIDIS, J. I.; TOCHON-DANGUY, H. J.; CHAN, J. G.; EGAN, G. F.; SCOTT, A. M.; BLADIN, C. F. The fate of hypoxic tissue on 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography after ischemic stroke. *Ann. Neurol.*, v. 48, n. 6, p. 228–235, 2000.

REISCHL, G.; DOROW, D. S.; CULLINANE, C.; KATSIFIS, A.; ROSELT, P.; BINNS, D.; HICKS, R. J. Imaging of tumor hypoxia with [124I]IAZA in comparison with [18F]FMISO and [18F]FAZA--first small animal PET results. **J Pharm Pharm Sci**, v. 10, n. 2, p. 203–211, 2007.

RICKARD, A. G.; PALMER, G. M.; DEWHIRST, M. W. CLINICAL AND PRE-CLINICAL Methods for Quantifying Tumor Hypoxia. **Adv Exp Med Biol**, v. 11, n. 36, p. 19–41, 2019.

RISCHIN, D.; HICKS, R. J.; FISHER, R.; BINNS, D.; CORRY, J.; PORCEDDU, S.; PETERS, L. J. Prognostic significance of [18F]-misonidazole positron emission tomography-detected tumor hypoxia in patients with advanced head and neck cancer randomly assigned to chemoradiation with or without tirapazamine: a substudy of Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 13, p. 2098–2104, 2006.

SAHA, G. B., **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 6th. ed. Cleveland: Springer, 410p, 2010.

SEMENZA, G. L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 3, p. 382–391, 2015.

SHIMIZU, Y.; KUDO, K.; KAMEDA, H.; HARADA, T.; FUJIMA, N.; TOYONAGA, T.; THA, K. K.; SHIRATO, H. Prediction of Hypoxia in Brain Tumors Using a Multivariate Model Built from MR Imaging and 18F-Fluorodeoxyglucose Accumulation Data. **Magn Reson Med Sci**, v. 34, n. 2, p. 45–53, 2019a.

SHIMIZU, Y.; ZHAO, S.; YASUI, H.; NISHIJIMA, K. I.; MATSUMOTO, H.; SHIGA, T.; TAMAKI, N.; OGAWA, M.; KUGE, Y. A Novel PET Probe "[18F]DiFA" Accumulates in Hypoxic Region via Glutathione Conjugation Following Reductive Metabolism. **Mol Imaging Biol**, v. 21, n. 1, p. 122–129, 2019b.

SHOKEEN, M.; ANDERSON C. J. Molecular imaging of cancer with copper-64 radiopharmaceuticals and positron emission tomography (PET). **Acc Chem Res**, v. 42, n. 7, p. 832–841, 2009.

SHOSHIRO, N. Structure of Azomycin, a New Antibiotic. **Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 5, p. 379–383, 1955.

SORGER, D.; PATT, M.; KUMAR, P.; SEESE, A. [18F]Fluoroazomycin arabinofuranoside (18FAZA) and [18F]-Fluoromisonidazole (18FMISO): a comparative study of their selective uptake in hypoxic cells and PET imaging in experimental rat tumours. **Nucl Med Biol**, v. 30, n. 3, p. 317–326, 2003..

SPENCE, A. M.; MUZI, M.; SWANSON, K. R.; O'SULLIVAN, F.; ROCKHILL, J. K.; RAJENDRAN, J. G. Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. **Clin Cancer Res**, v.14, n. 9, p. 2623–2630, 2008.

STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 4, p. 201–218, 2016.

STIEB, S.; GUCKENBERGER, M.; RIESTERER, O.; ELEFThERIOU, A.; WARNOCK, G. Longitudinal PET imaging of tumor hypoxia during the course of radiotherapy. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v. 45, n. 5, p. 1–17, 2018.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychol Rev.**, v 20, n. 4, p. 327–348, 2010.

STYPINSKI, D.; MCQUARRIE, S. A.; MCEWAN, A. J.; WIEBE, L. I. Pharmacokinetics and Scintigraphic Imaging of the Hypoxia-Imaging Agent [123I]IAZA in Healthy Adults Following Exercise-Based Cardiac Stress **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 10–25, 2018.

TABASSUM, D. P.; POLYAK, K. Tumorigenesis: it takes a village. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 8, p. 473–483, 2015.

TAKASAWA, M.; MOUSTAFA, R. R.; BARON, J. C. Applications of Nitroimidazole In Vivo Hypoxia Imaging in Ischemic Stroke **Stroke**, v. 39, n. 1, p. 1629–1637, 2008.

TAMAKI, N.; HIRATA, K. Tumor hypoxia: a new PET imaging biomarker in clinical oncology. **Int J Clin Oncol**, v. 21, n. 4, p. 619–625, 2016.

TAMURA, G.; SAKATA, K.; NISHIZUKA, S.; MAESAWA, C.; SUZUKI, Y.; IWAYA, T.; TERASHIMA, M.; SAITO, K.; SATODATE, R. Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. **Japanese journal of cancer research**, v. 87, n. 11, p.1153–1159, 1996.

TATUM, J. L.; KELLOFF, G. J.; GILLIES, R. J.; ARBEIT, J. M.; BROWN, J. M.; CHAO, K. S. C.; CHAPMAN, J. D.; ECKELMAN, W. C.; FYLES, A. W.; GIACCIA, A. J. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 82, n. 10, p. 699–757, 2006.

THUREAU, S.; MODZELEWSKI, R.; BOHN, P.; HAPDEY, S.; GOUEL, P.; DUBRAY, B.; VERA, P. Comparison of Hypermetabolic and Hypoxic Volumes Delineated on [18F]FDG and [18F]Fluoromisonidazole PET/CT in Non-small-cell Lung Cancer Patients. *Mol Imaging Biol.*, v. 20, n. 8, p. 237–245, 2019.

TSUGANE, S.; SASAZUKI, S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer*, v. 10, n. 2, p. 75–83, 2007.

TSUNEO, S.; MASAYUKI, I.; MITSURU, K.; KYOSAN, Y.; MING-RONG, Z.; KATSUYUKI, T.; ATSUSHI, H.; NORIKO, Y.; FUMIYOSHI, O.; MAKOTO, N. Prognostic value of 18F-fluoroazomycin arabinoside PET/CT in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.*, v. 106, n. 11, p. 1554–1560, 2015.

VALLABHAJOSULA, S. 18F-Labeled Positron Emission Tomographic Radiopharmaceuticals in Oncology: An Overview of Radiochemistry and Mechanisms of Tumor Localization. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 37, n. 6, p. 400–19, 2007.

VAN LOON J.; JANSSEN, M. H.; OLLERS, M.; AERTS, H. J.; DUBOIS, L.; HOCHSTENBAG, M.; DINGEMANS, A. M.; LALISANG, R.; BRANS, B.; WINDHORST, B.; VAN DONGEN, G. A.; KOLB, H.; ZHANG, J.; DE RUYSSCHER, D.; LAMBIN, P. PET imaging of hypoxia using [18F]HX4: a phase I trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 37, n. 9, p.1663–1668, 2010.

VAUPEL, P.; MAYER, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*, v. 26, n. 2, p. 225–239, 2007.

VERA, P.; MIHAILESCU, S. D.; LEQUESNE, J.; MODZELEWSKI, R.; BOHN, P.; HAPDEY, S.; PÉPIN, L. F.; DUBRAY, B.; CHAUMET-RIFFAUD, P.; DECAZES, P.; THUREAU, S. Radiotherapy boost in patients with hypoxic lesions identified by 18F-FMISO PET/CT in non-small-cell lung carcinoma: can we expect a better survival outcome without toxicity? [RTEP5 long-term follow-up]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 46, n. 7, p. 1448–1456, 2019.

VERCELLINO L, GROHEUX D, THOURY A, DELORD M, SCHLAGETER MH, DELPECH Y, BARRE E, BARUCH-HENNEQUIN V, TYLSKI P, HOMYRDA L,

WALKER F, BARRANGER E, HINDIE E. Hypoxia imaging of uterine cervix carcinoma with (18)F-FETNIM PET/CT. **Clin Nucl Med**, v. 37, n. 11, p. 1065–1068, 2012.

VISSCHER, D. W.; NASSAR, A.; DEGNIM, A. C.; FROST, M. H.; VIERKANT, R. A.; FRANK, R. D.; TARABISHY, Y.; RADISKY, D. C.; HARTMANN, L. C. Sclerosing adenosis and risk of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 144, n. 1, p. 205–212, 2014.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314–322, 2011.

WACK, L. J.; MÖNNICH, D.; VAN ELMPT, W.; ZEGERS, C. M.; TROOST, E. G.; ZIPS, D.; THORWARTH, D. Comparison of [18F]-FMISO, [18F]-FAZA and [18F]-HX4 for PET imaging of hypoxia--a simulation study. **Acta Oncol.**, v. 54, n. 9, p. 1370–1377, 2015.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 3, p. 1230–1237, 1995.

WANG, C.; WANG, Z.; ZHAO, T.; LI, Y.; HUANG, G.; SUMER, B. D.; GAO, J. Optical molecular imaging for tumor detection and image-guided surgery. **Biomaterials**, v. 157, n. 1, p. 62–75, 2018.

WARDMAN, P. A.; MCCLELLAND, R.; ADAMS, G. E.; BRECCIA, A.; FIEDLEN, E. N.;. **In Advanced Research Workshop on Selective Activation of Drugs by Redox Processes**. Eds. NATO, Plenum Press, New York, p. 125–136, 1990.

WARDMAN, P. A. Some reactions and properties of nitro radical-anions important in biology and medicine. **Environ. Health Perspect.**, v. 64, n. 1, p. 309–320, 1985.

WATANABE, S.; SHIGA, T.; HIRATA, K.; MAGOTA, K.; ISEKI, K.; MATSUMOTO, H.; KUGE, Y.; TAMAKI, N. Biodistribution and radiation dosimetry of the novel hypoxia PET probe [18F]DiFA and comparison with [18F]FMISO. **EJNMMI Res.**, v. 9, n. 1, p. 60–71, 2019.

WAY, J.; WUEST, F. Fully automated synthesis of 4-[18F]fluorobenzylamine based on borohydride/NiCl₂ reduction. **Nucl Med Biol.**, v. 40, n. 3, p. 430–436, 2013.

WEAVER, J.; YANG, Y.; PURVIS, R.; WEATHERWAX, T.; ROSEN, G. M.; LIU, K. J. In vivo evidence of methamphetamine inducedattenuation of brain tissue oxygenation

as measured by EPR oxi-metry. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 275, n. 2, p. 73–78, 2014.

WEI, Y.; ZHAO, W.; HUANG, Y.; YU, Q.; ZHU, S.; WANG, S.; ZHAO, S.; HU, X.; YU, J.; YUAN, S. A Comparative Study of Noninvasive Hypoxia Imaging with 18F-Fluoroerythronitroimidazole and 18F-Fluoromisonidazole PET/CT in Patients with Lung Cancer. *PLoS One*, v. 11, n. 6, p. 157–166, 2016.

WHITE, D. A.; ZHANG, Z.; LI, L.; GERBERICH, J.; STOJADINOVIC, S.; PESCHKE, P.; MASON, R. P. Developing oxygen-enhanced magnetic resonance imaging as a prognostic biomarker of radiation response. *Cancer Lett*, v. 380, n. 1, p. 69–77, 2016.

WILCHEK, M.; KNUDSEN, K. L.; MIRON, T. Improved method for preparing N-hydroxysuccinimide ester-containing polymers for affinity chromatography. *Bioconjug Chem*, v. 5, n. 5, p. 491–492, 1994.

WILSON, A. A.; JIN, L.; GARCIA, A.; DASILVA, J. N.; HOULE, S. An Admonition When Measuring the Lipophilicity of Radiotracers Using Counting. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 54, n. 2, p. 203–208, 2001.

WORKMAN, P.; BROWN, J. M. Structure-pharmacokinetic relationships for misonidazole analogues in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v. 6, n. 1, p. 39–49, 1981.

XU, Z.; LI, X. F.; ZOU, H. (¹⁸F)-fluoromisonidazole in tumor hypoxia imaging. *Oncotarget*, v. 8, n. 55, p. 94969–94979, 2017.

YOUSEF, A. F.; CARMEN, A. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

YU, W.; ZHAO, S.; ZHAO, Y.; FATEMA, C. N.; MURAKAMI, M.; NISHIJIMA, K. I.; KITAGAWA, Y.; TAMAKI, N.; KUGE, Y. Changes in tumor oxygen state after sorafenib therapy evaluated by 18F-fluoromisonidazole hypoxia imaging of renal cell carcinoma xenografts. *Oncol Lett.*, v. 14, n. 2, p. 2341–2346, 2017.

YUAN, H.; SCHROEDER, T.; BOWSHER, J. E.; HEDLUND, L. W.; WONG, T.; DEWHIRST, M. W. Intertumoral Differences in Hypoxia Selectivity of the PET Imaging Agent 64Cu(II)-Diacetyl-Bis(N4-Methylthiosemicarbazone). *J Nucl Med.*, v. 47, n. 6, p. 989–998, 2006.

YUE, J.; YANG, Y.; CABRERA, A. R.; SUN, X.; ZHAO, S.; XIE, P.; ZHENG, J.; MA, L.; FU, Z.; YU, J. Measuring tumor hypoxia with (1)(8)FFETNIM PET in esophageal squamous cell carcinoma: a pilot clinical study. **Dis Esophagus**, v. 25, n. 1, p. 54–61, 2012.

ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. **Bosn J Basic Med Sci**, v 17, n. 3, p. 172–182, 2017.

ZENG, M., SHEN, J.; LIU, Y.; LU, L. Y.; DING, K.; FORTMANN, S. D.; KHAN M.; WANG J.; HACKETT, S. F.; SEMENZA, G. L.; CAMPOCHIARO, P. A. The HIF-1 antagonist acriflavine: visualization in retina and suppression of ocular neovascularization. **J Mol Med**, v. 95, n. 4, p. 417–429, 2017.

ZHA, Z.; ZHU, L.; LIU, Y.; DU, F.; GAN, H. ; QIAO, J. ; DUNG, H. Synthesis and evaluation of two novel 2-nitroimidazole derivatives as potential PET radioligands for tumor imaging. **Nucl. Med. Biol.**, v. 38,n. 4, p. 501–508, 2011.

ZHANG, L.; YAO, X.; CAO, J.; HONG, H.; ZHANG, A.; ZHAO, R.; ZHANG, Y.; ZHA, Z.; LIU, Y.; QIAO, J.; ZHU, L.; KUNG, H. F. In Vivo Ester Hydrolysis as a New Approach in Development of Positron Emission Tomography Tracers for Imaging Hypoxia. **Mol Pharm**, v. 16, n. 3, p. 1156–1166, 2019.

ZHANG, M. Y.; ZHANG, R. J.; JIANG, H. J.; JIANG, H.; XU, H. L.; PAN, W. B.;, WANG, Y. Q.; LI, X. 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography may be applicable in the evaluation of colorectal cancer liver metastasis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.**, v. 18, n. 2, p. 164–172, 2019.

ZIMNY, M.; GAGEL, B.; DIMARTINO, E.; HAMACHER, K.; COENEN, H. H.; WESTHOFEN M.; EBLE, M.; BUELL. U.; REINARTZ, P. FDG—a marker of tumour hypoxia? A comparison with [18F]fluoromisonidazole and pO₂-polarography in metastatic head and neck cancer. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 33, n. 12, p. 1426–1431. 2006.

ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Projeto N.154/15/CEUA-IPEN/USP)

Comissão de Ética no Uso de Animais

Parecer - Projeto Nº 154/15/CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **"SÍNTESE DE 2-NITROIMIDAZOL-GLICOPEPTÍDEOS RADIOMARCADOS COM ^{18}F E ^{68}Ga PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS DE HIPÓXIA NO MICROAMBIENTE TUMORAL"** de responsabilidade do pesquisador **DR EMERSON SOARES BERNARDES** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA.

São Paulo, 23 de abril de 2015.

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

ANEXO B – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) do Ácido 2-nitroimidazol acético (**1**) em CD_3OD e 300 MHz

ANEXO C – Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) do Ácido 2-nitroimidazol acético (1)

ANEXO D – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN) do 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (**2**) em CD_3OD e 300 MHz

ANEXO E – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN) do 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (**2**) em CD_3OD e 75 MHz

ANEXO F – Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetato (2)

User Spectra

Formula Calculator Results

Formula	Ion Species	Mass	Calc. Mass	m/z	Calc. m/z	Diff (mDa)	Diff (ppm)	DBE	Ion	Score
C9 H8 N4 O6	C9 H8 N4 Na O6	268.0441	268.0444	291.0334	291.0336	0.24	0.82	8	(M+Na)+	89.37

Ativar o Win

ANEXO G – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H -RMN)
[^{19}F]FBNA (N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida) (**3**) em CD_3OD e
300 MHz

ANEXO H – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN) do $[^{19}\text{F}]$ FBNA (N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida) (**3**) em CD_3OD e 75 MHz

ANEXO I – Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-MS) [¹⁹F]FBNA (N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-il)acetamida) (3)

User Spectra

Formula Calculator Results

Formula	Ion Species	Mass	Calc. Mass	m/z	Calc. m/z	Diff (mDa)	Diff (ppm)	DBE	Ion	Score
C12 H11 F N4 O3	C12 H12 F N4 O3	278.0814	278.0815	279.0886	279.0888	0.16	0.57	9	(M+H)+	84.22
C12 H11 F N4 O3	C12 H11 F N4 Na O3	278.081	278.0815	301.0703	301.0707	0.48	1.58	9	(M+Na)+	94.19

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**