



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**Avaliação dos Radiofármacos [^{18}F]FDG e [^{18}F]FMISO para a detecção
da doença de Chagas por PET / CT**

LIZZ NATALY VILLARROEL FERNANDEZ

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
Profissional em Tecnologia das Radiações
em Ciências da Saúde na área de
Concentração:
Medicina Nuclear e Radiofarmacia**

Orientador:

Prof. Dr. Emerson Soares Bernardes

**São Paulo
2022**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES IPEN
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**Avaliação dos Radiofármacos [¹⁸F]FDG e [¹⁸F]FMISO para detecção
da doença de Chagas por PET / CT**

LIZZ NATALY VILLARROEL FERNANDEZ

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
Profissional em Tecnologia das Radiações
em Ciências da Saúde na área de
Concentração:
Medicina Nuclear e Radiofarmacia**

Orientador:

Dr. Emerson Soares Bernardes

São Paulo

2022

Fonte de Financiamento: Comissão Nacional de Energia Nuclear CNEN- BRASIL

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

Como citar:

VILLARROEL FERNANDEZ, L. N. ***Avaliação dos Radiofármacos [18F]FDG e [18F]FMISO para a detecção da doença de Chagas por PET / CT.*** 2022. 84 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

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

VILLARROEL FERNANDEZ, LIZZ NATALY
Avaliação dos Radiofármacos [18F]FDG e [18F]FMISO para a
detecção da doença de Chagas por PET / CT / LIZZ NATALY
VILLARROEL FERNANDEZ; orientador EMERSON SOARES BERNARDES. --
São Paulo, 2022.
84 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de
Pós-Graduação em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde
(Medicina Nuclear e Radiofarmácia) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2022.

1. Radiofármacos. 2. [18F]FDG . 3. [18F]FMISO. 4. Chagas.
5. PET / CT. I. SOARES BERNARDES, EMERSON , orient. II.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Lizz Nataly Villarroel Fernández.

Título: Avaliação dos Radiofármacos [^{18}F]FDG e [^{18}F]FMISO para detecção da doença de Chagas por PET / CT

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre Profissional em Ciências da Saúde na área de Concentração: Tecnologia Nuclear Aplicações.

Data:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

**Esta Dissertação é dedicada aos meus pais e irmãs.
esse triunfo é nosso. Nós o alcançamos.**

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha sincera gratidão, primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Virgem Maria, por me guiar, cuidar de mim, me proteger em todos os momentos e permitir que este projeto fosse possível.

À minha família que está sempre ao meu lado: meu pai José Fabian Villarroel Flores, minha mãe María Flora Fernández Pozo, meus irmãos, José Miguel, Sheyla Estefany e Niltza Vania. Obrigada por ser minha fonte de inspiração, conselho, orientação, amor e por ser meu lar feliz.

Ao meu Professor orientador Dr. Emerson Soares Bernardes, por permitir meu desenvolvimento criativo, por me orientar e abrir as portas de seu laboratório de pesquisas no IPEN – BRASIL.

À Professora Dra. Maria Denise Zezell, e as secretárias de Pós-graduação: Andrea Malvazi, Sabrina Zeballos, pelo apoio e suporte, muito obrigada

À Sofia dos Santos por colaborar e fazer parte das boas experiências na investigação.

Aos amigos do laboratório de pesquisa em Radiofarmácia do IPEN, meus amigos de coração: Fabio Fernando Alves da Silva, Rafael Andrade, Yaniel Babi Araujo, Guilherme Bonifacio, Andy Gonzales Rivera, Dino Seigo Gushiken Junior, Raiza Oliveira, Jhonatas Pedrosa Marim Pereira, Maria Angela Pepe Carneiro, Arian Perez Nario, André Henrique Silva. Obrigada por me apoiar, e por acreditar comigo que tudo é possível, e que sempre haverá um caminho de luz na escuridão. Não tenho coragem de me despedir de vocês, então até em breve, pois tenho a esperança de nos encontrar novamente, no caminho. Vocês foram uma parte linda da minha vida.

À Professora Maria Julia Mansó Alves, Técnica Célia Braga, Lais Trajano, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo USP, muito obrigada pelo

apoio nesta pesquisa e principalmente pela solidariedade e empatia no trabalho, agradeço do fundo do coração.

Muito obrigada aos meus Professores, que me apoiaram moral e tecnologicamente: Luis Alberto Pareira Dias, André Luís Lapolli, Henrique Barcellos, Aguinaldo Donizete Negrini. Um agradecimento especial aos Professores da banca por todo o apoio: Dr. Daniel Perez Vieira, Dr. Orlando Rodrigues Junior, Dr. Adelanir Antonio Barroso e Dr. Walter Miguel Turato

Muito obrigado pela ajuda à Dra. Elizabeth Gutierrez do Instituto Nacional Investigaciones Nucleares ININ do México. Leonard De Vinci Kanda Kupa estudante de Pós-doutorando da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e Rogério Silva do Nascimento do Instituto de Ciências Biológicas ICB IV Laboratório de Parasitologia.

Aos meus colegas de Mestrado, um especial agradecimento a Fernando Couto, durante minha estadia no Brasil, e por todos os conselhos e apoio incondicional a Gislanne de Souza Braz Rodrigues, Gustavo Rico Freitas, Valeria Mendez, Sabrina Zeballos.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear, por financiar minha bolsa de estudos no Brasil

À todas aquelas pessoas que me ajudaram de diferentes maneiras

MUITO OBRIGADA

**Ter Deus é ter tudo, com ele todos os dias serão bons,
as tempestades são temporárias, mas as bênçãos são
para sempre,
Sempre ouça o coração, lute por objetivos, ignore o
que faz mal para você, dê mais de si a quem te ama,
sorria e seja sempre feliz.
Todas as coisas boas levam tempo, o vinho, a vida, o
amor. As conquistas não são fruto do acaso. As
conquistas são o produto do trabalho constante,
deixo fluir e que seja infinito.**

RESUMO

A doença de Chagas é endêmica na América Latina e afeta aproximadamente 6 - 7 milhões de pessoas em todo o mundo. Esta doença é causada pelo protozário *Trypanosoma cruzi* e considerada negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A doença se diferencia em duas fases bem distintas: a fase aguda, que se inicia entre 4 a 10 dias após a picada do vetor e, a fase crônica. Apesar da fase crônica da doença não ter cura, a fase aguda é passível de tratamento. Entretanto, a dificuldade reside no fato dela passar despercebida. Recentemente, o uso de imagem por tomografia por emissão de pósitrons (PET) foi sugerido como uma ferramenta promissora para detectar a inflamação do miocárdio originada pela doença. Além disso, vários estudos têm demonstrado a capacidade do *Trypanosoma cruzi* de se adaptar ao seu microambiente (local de infecção no corpo humano), levando a um processo inflamatório com produção de ROS e NOS, associados a um ambiente hipóxico. Desta forma, os radiofármacos [¹⁸F]FDG (marcador de inflamação) e o [¹⁸F]FMISO (um marcador de hipóxia) foram utilizados neste estudo para avaliar através da imagem PET, o curso de desenvolvimento da doença de Chagas desde a fase aguda até à fase crônica da doença.

Os nossos resultados mostraram que, *in vitro*, o *T. cruzi* não capta [¹⁸F]FDG, mas apresenta uma captação pronunciada do radiofármaco [¹⁸F]FMISO. As diferentes fases da doença de Chagas foram simuladas em camundongos C57BL/6 utilizando a cepa Y do *T. cruzi*. Através de estudos de biodistribuição e imagem PET, na fase aguda, foi possível observar uma maior captação no coração e músculo utilizando o radiofármaco [¹⁸F]FDG e, nos intestinos e músculo, utilizando o [¹⁸F]FMISO, em camundongos infectados quando comparados aos camundongos saudáveis. Com a progressão da doença (fase intermediária e crônica), verificamos uma maior captação do [¹⁸F]FDG no coração, músculo e estômago e uma maior captação do [¹⁸F]FMISO nos intestinos dos animais infectados em comparação com os animais saudáveis. Além disso, foi possível verificar que tanto o [¹⁸F]FDG quanto o [¹⁸F]FMISO apresentam uma taxa de eliminação dos tecidos mais lenta nos animais infectados (em qualquer fase da doença) quando comparado com os animais não infectados, sugerindo uma maior retenção dos tecidos.

Apesar dos radiofármacos utilizados neste trabalho terem demonstrado um aumento de captação nos locais de inflamação e infecção nos animais infectados com *T. cruzi* em comparação com animais saudáveis, não foi possível obter uma imagem diagnóstica de alto contraste devido à captação intrínseca do [¹⁸F]FDG no coração e, da via de excreção do [¹⁸F]FMISO passar pelo intestino, limitando a utilização desses dois traçadores na PET diagnóstica da doença de Chagas. No entanto, foi possível demonstrar a importância da ferramenta PET como ferramenta diagnóstica da doença de Chagas abrindo portas para estudos com outros radiofármacos.

ABSTRACT

Chagas disease is endemic in Latin America and affects approximately 6 - 7 million people worldwide. This disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and is considered neglected by the World Health Organization (WHO). The disease is differentiated into two very distinct phases: the acute phase, which begins between 4 and 10 days after the vector bite, and the chronic phase. Although the chronic phase of the disease has no cure, the acute phase is treatable. However, the difficulty lies in the fact that it goes unnoticed. Recently, the use of positron emission tomography (PET) imaging has been suggested as a promising tool to detect myocardial inflammation caused by the disease. In addition, several studies have demonstrated the ability of *Trypanosoma cruzi* to adapt to its microenvironment (site of infection in the human body), leading to an inflammatory process with production of ROS and NOS, associated with a hypoxic environment. Thus, the radiopharmaceuticals [^{18}F]FDG (an inflammation marker) and [^{18}F]FMISO (a hypoxia marker) were used in this study to assess, through PET imaging, the course of development of Chagas disease from the acute phase to the chronic phase of the disease.

Our results showed that, *in vitro*, *T. cruzi* shows a low [^{18}F]FDG uptake and a high uptake of [^{18}F]FMISO. The different stages of Chagas disease were simulated in C57BL/6 mice using the *T. cruzi* Y strain. Through biodistribution studies and PET imaging, we showed that in the acute phase there was an increased uptake of [^{18}F]FDG in the heart and muscle and, an higher uptake of [^{18}F]FMISO in the intestines and muscle of infected mice when compared to healthy mice. With the progression of the disease (intermediate and chronic phase), we observed a greater uptake of [^{18}F]FDG in the heart, muscle and stomach and a greater uptake of [^{18}F]FMISO in the intestines of infected animals compared to healthy animals. In addition, it was possible to verify that both [^{18}F]FDG and [^{18}F]FMISO show a slower tissue elimination rate in infected animals (at any stage of the disease) when compared to non-infected animals, suggesting a greater retention of the tissues.

Although the radiopharmaceuticals used in this work demonstrated an increase uptake at sites of inflammation and infection in animals infected with *T. cruzi* when compared to healthy animals, it was not possible to obtain a high-contrast diagnostic image because of the intrinsic uptake of [^{18}F]FDG in the heart and [^{18}F]FMISO uptake in the intestines (its excretion pathway), limiting the use of these two tracers for PET diagnosis of Chagas disease. However, it was possible to demonstrate the importance of PET as a diagnostic tool for Chagas disease, which paved the way for further studies using other radiopharmaceuticals.

LISTA DE ABREVIÇÕES

[¹⁸F]FDG: [¹⁸F] Fluoro-2-Desoxi-D-Glucose

[¹⁸F]FMISO: [¹⁸F] Fluoromisonidazol

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CDC: Centers for Disease Control and Prevention.

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNDi: Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi)

DTU: Discrete Typing Units

IFN: Interferon

IL: Interleucinas

LIT: Liver Infusión Tryptose

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NITTP: 1-(2-nitro-10-imidazolil)-2-O-tetra-hidropiranil-3-O-toluenossulfonilpropano-diol

NO₂: Grupo Nitro

O₂⁻: Superóxido

OMS: Organização Mundial de Saúde

OTf: Grupo triflato

PET / CT: Tomografia por Emissão de Pósitrons / Tomografia Computadorizada

pH: Potencial hidrogeniônico

RNS: *Reactive Nitrogen Species*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

Sn₂: Substituição nucleofílica bimolecular

TFA: Ácido Trifluoroacético

TNF: Fator de Necrose Tumoral

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
3.2 Variabilidade genética, de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
3.3 Tomografia por Emissão de Pósitrons/Tomografia Computarizada	21
3.4 Descrição, mecanismo de ação e metabolismo de [¹⁸ F]FDG	22
3.5 Descrição, mecanismo de ação e metabolismo de [¹⁸ F]FMISO.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Produção dos radiofármacos [¹⁸ F]FDG e [¹⁸ F]FMISO	27
4.1.1. Síntese [¹⁸ F] Fluoro-2-Desoxi-D-Glucose ([¹⁸ F]FDG)	27
4.1.1.1. Esquema de produção no módulo de síntese para [¹⁸ F]FDG	29
4.1.1.2. Controle de qualidade do [¹⁸ F]FDG.....	30
4.1.2. Síntese do [¹⁸ F] Fluoromisonidazol ([¹⁸ F]FMISO)	30
4.1.2.1. Esquema de produção do módulo de sínteses para [¹⁸ F]FMISO.....	31
4.1.2.2 Controle de qualidade de [¹⁸ F]FMISO	32
4.2. Estudo de ligação <i>in vitro</i> dos radiofármacos [¹⁸ F]FDG e [¹⁸ F]FMISO.....	33
4.3. Infecção de animais C57BL/6 com <i>T. cruzi</i>	34
4.6. Estudos de imagem PET/CT	36
4.6.1. Imagem μPET/CT [¹⁸ F]FDG.....	36
4.6.2. Imagem μPET/CT [¹⁸ F] FMISO	36
5. RESULTADOS	38
5.1. Resultados da síntese e controle de qualidade dos radiofármacos [¹⁸ F]FDG e do [¹⁸ F]FMISO	38
5.1.1. Controle de qualidade do radiofármaco [¹⁸ F]FDG.	38
5.1.2. Controle de qualidade do radiofármaco [¹⁸ F]FMISO.	39
5.2. Estudo de captação <i>in vitro</i> dos radiofármacos [¹⁸ F]FDG e [¹⁸ F]FMISO.....	39
5.3. Estudos de biodistribuição	40
5.3.1. Biodistribuição de [¹⁸ F]FDG em animais infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
5.3.2 Biodistribuição de [¹⁸ F]FMISO em animais infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
5.4. Estudo farmacocinéticos	45
5.5. Imagem μPET/CT utilizando os radiofármacos [¹⁸ F]FDG ou [¹⁸ F]FMISO	50

6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, descoberta em 1909 por Carlos Chagas em Minas Gerais- Brasil. É endêmica em grande parte do território americano (Ministério da Saúde, Manual Operacional) e afeta aproximadamente 6 e 7 milhões de pessoas em todo o mundo (OMS 2022). Sendo um verdadeiro problema de saúde e um desafio médico-sanitário, pela alta prevalência e alta morbimortalidade que produz nas populações rurais, marginais e de baixa renda (Ministério da Saúde Bolívia 2007 Manual Operacional).

Por meio de diversos estudos sobre a doença de Chagas foram demonstrados níveis muito elevados de diversidade genética do *Trypanosoma cruzi* e, um grande número de marcadores genéticos que foram usados para estratificar a espécie em várias subdivisões. Muitas evidências apoiam a existência de uma estrutura multiclonal das populações de *T. cruzi* (Tibayrenc M. *et al.*, 1991); (Tibayrenc M. *et al* 2002); (Sturm *et al*, 2010). A elevada diversidade genética, e as unidades discretas de tipagens, conhecidas pela sigla DTU (do inglês discrete typing units), que classificam em seis DTUs, nomeadas de TcI a TcVI as cepas do *T. cruzi* (Lemes. M., *et al* 2022): apresentam características biológicas distintas, provavelmente relacionadas com as diferentes apresentações clínicas da doença de Chagas como as manifestações cardíacas e digestivas. (Breniere SF *et al* 1995)

Essas diferenças são expressas nos níveis de parasitemia e tropismo por determinados órgãos, bem como no desenvolvimento de várias patologias em mamíferos infectados, incluindo o ser humano. (García A. 2011).

A doença de Chagas não é transmitida diretamente pela picada de insetos triatomíneos; a transmissão ocorre quando o indivíduo coça o local da picada e, o *T. cruzi* presente nas fezes eliminadas pelo triatomíneo infectam o hospedeiro (OMS Serie de informes técnicos 1991). A doença na fase “aguda” ocorre imediatamente após a infecção, podendo ser assintomática ou leve, apresentando sintomas como febre ou inflamação ao redor do local da inoculação (CDC 2016). Após a fase aguda, as pessoas entram em uma fase crônica “indeterminada”, que pode durar anos ou décadas nos quais os parasitas ainda estão presentes nos tecidos dos órgãos (DNDi 2022).

Posteriormente a maioria das pessoas infectadas entram em um estágio prolongado da doença chamada “crônica” durante o qual muito pouco ou nenhum parasita é encontrado no sangue (CDC 2016). Nesta fase, muitas pessoas podem não apresentar sintomas ao longo da vida associados à doença de Chagas. No entanto, estima-se que entre 20% e 30% das pessoas infectadas experimentarão problemas médicos debilitantes, e às vezes potencialmente mortais (CDC 2016).

A doença de Chagas passa por muitas variáveis de estudo, que tornam suas pesquisas muito interessantes. Assim vários estudos mencionam a capacidade do *Trypanosoma cruzi*, em função da adaptação de seu microambiente, produzir vesículas extracelulares que intervêm na prevenção da resposta imune e fatores relacionados às espécies reativas de oxigênio ROS (Reactive Oxygen Species), assim como espécies reativas de nitrogênio RNS (Reactive Nitrogen Species), associado à hipóxia (Maldonado E 2020).

Da mesma forma, outra variável que se destaca na doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, são os estágios morfológicos, que o parasita adota (chamados de amastigota, epimastigota e tripomastigota). Que estão relacionadas ao tipo de hospedeiro em que se encontra e à fase da doença, entre os principais aspectos (Apt W. *et al* 2008) (Tyler KM. *et al* 2001).

Desse modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade de detecção do *Trypanosoma cruzi* por meio de PET / CT utilizando radiofármacos convencionais como [¹⁸F]FDG e [¹⁸F]FMISO, em modelos murinos, infectados com a linhagem II cepa γ.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo utilizar os radiofármacos [^{18}F]FDG e o [^{18}F]FMISO para avaliar através da imagem PET/CT, estudos de biodistribuição e farmacocinética, o curso de desenvolvimento da doença de Chagas desde a fase aguda até à fase crônica.

2.2. Objetivos específicos

1. Realizar a síntese e controle de qualidade dos radiofármacos [^{18}F]FDG e do [^{18}F]FMISO;
2. Realizar ensaios de ligação *in vitro* em cultura celular com os radiofármacos [^{18}F]FDG e [^{18}F]FMISO;
3. Infectar animais C57BL/6 com *T. cruzi*;
4. Realizar estudos de biodistribuição, farmacocinética e imagem PET/CT com [^{18}F]FDG e do [^{18}F]FMISO na fase aguda, indeterminada e crônica da infecção com *T. cruzi*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A doença de Chagas é uma afecção tropical negligenciada que afeta principalmente a América Latina. Devido às suas características é uma condição complexa, de difícil erradicação e cujo tratamento não é totalmente eficaz (Manual Operativo do Ministério da Saúde) (APT, W.; Zulantay, 2011). A doença de Chagas (CDC 2012), (DNDi 2022, OMS 1991), tem as seguintes fases:

Fase aguda: As pessoas infectadas geralmente apresentam sintomas leves ou nenhum sintoma. A duração desta fase é de aproximadamente 8 semanas, e os parasitas podem ser encontrados no sangue circulante. Os sintomas podem incluir erupções cutâneas, nódulos inchados, febre, dor de cabeça, linfonodos aumentados, náuseas, diarreia, vômitos e falta de ar (DNDi 2022).

Fase crônica: A maioria das pessoas com infecção crônica permanecem assintomáticas por toda a vida na ausência de tratamento. Nesta fase, e dependendo do tempo decorrido desde a infecção, muito poucos parasitas ou nenhum são encontrados no sangue circulante (CDC 2016, CDC 2012, DNDi 2022). A fase crônica tem dois aspectos muito importantes para ser considerados: A fase crônica indeterminada e a fase crônica tardia (DNDi 2022) (OMS 1991),

- **Fase crônica indeterminada:** É posterior à fase aguda, pode durar anos ou décadas. Os parasitas ainda estão presentes nos tecidos e órgãos, apesar da ausência de sintomas. Pessoas na fase indeterminada podem transmitir a doença (DNDi 2022).
- **Fase crônica tardia:** Nesta fase, entre 30% e 40% das pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* evoluem para uma fase crônica tardia com manifestações clínicas características da doença de Chagas (DNDi 2022), relacionados a danos cardíacos, como insuficiência cardíaca progressiva, alargamento do trato digestivo e distúrbios motores gastrointestinais entre outros sintomas (DNDi 2022).

3.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Uma variável que se destaca na doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, são os estágios morfológicos que o parasita adota, e que estão relacionadas principalmente ao tipo de hospedeiro em que se encontra (Apt W. et al 2008) (Tyler et al KM. 2001).

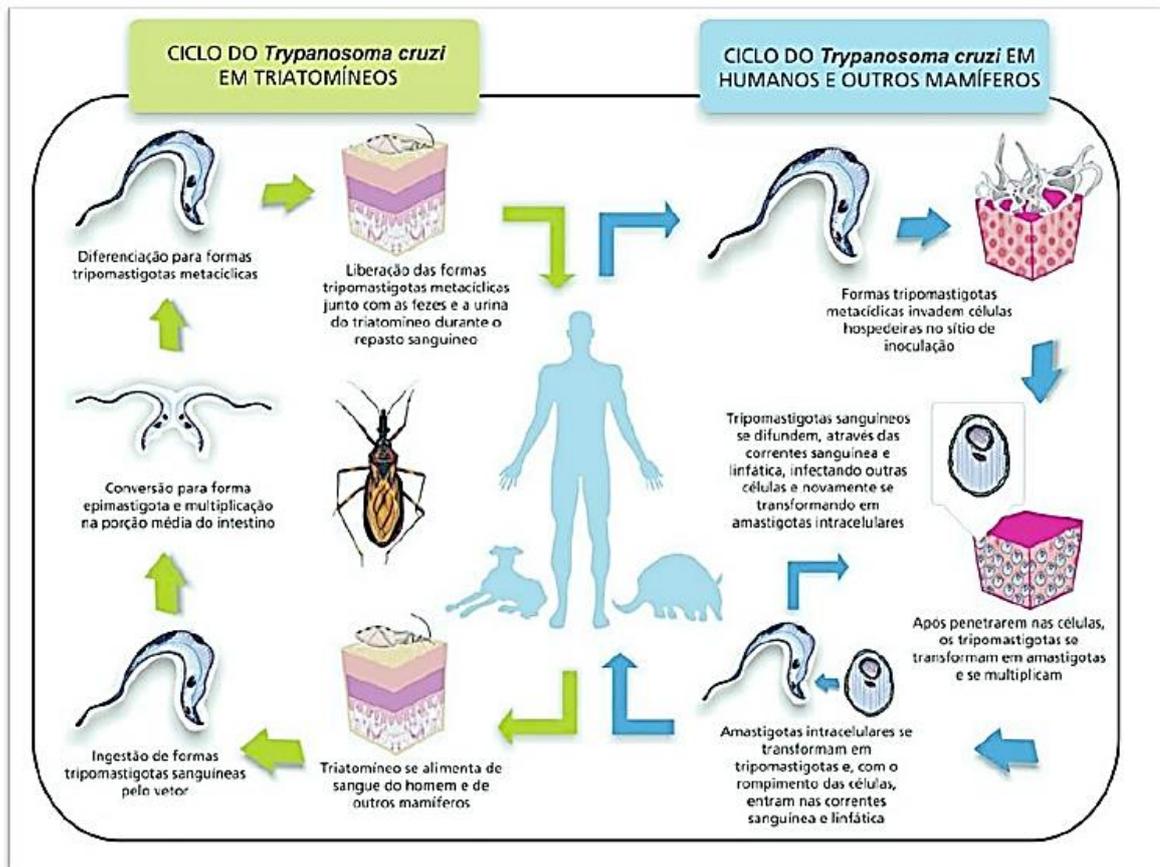
Em seu ciclo de vida (Figura 1), o *Trypanosoma cruzi* aparece em quatro formas diferentes, dependendo principalmente do hospedeiro e do local onde vive. Essas formas são: epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota e tripomastigota sanguínea.

O ciclo se inicia com as formas de tripomastigotas sanguíneos ingeridos pelo inseto vetor durante uma picada em um hospedeiro infectado, que posteriormente se diferenciarão em sua forma replicativa de Epimastigotas flagelados no intestino de triatomíneos. Porém, na ampola retal do inseto vetor os parasitas se transformam novamente em Tripomastigotas metacíclicos, que são formas flageladas e infecciosas para o hospedeiro vertebrado. Portanto, os Tripomastigotas metacíclicos são expelidos juntamente com as fezes do hospedeiro invertebrado. Para dar continuidade ao ciclo infeccioso, o parasita entra no hospedeiro vertebrado através de microlesões na pele ou mucosas do hospedeiro.

Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas têm a capacidade de infectar uma grande variedade de células nucleadas, onde se diferenciam na forma replicativa conhecida como amastigota, que ocupa o citoplasma da célula hospedeira até se diferenciar novamente para a forma tripomastigota, neste caso chamado tripomastigota sanguíneo.

Os tripomastigotas liberados pelas células hospedeiras entram na corrente sanguínea e podem invadir novamente outras células nucleadas, ou podem ser ingeridos por um novo inseto vetor, completando assim o ciclo de vida do parasita (Brenner Z. 1973, Silva O.A.C. 2017).

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (adaptado de Argolo *et al.*, 2008)



3.2 Variabilidade genética, de *Trypanosoma cruzi*

Diversos estudos sobre a doença de Chagas, mostram níveis muito elevados de diversidade genética, de *Trypanosoma cruzi*, e um grande número de marcadores genéticos tem sido usado para estratificar a espécie em várias subdivisões. Muitas evidências apoiam a existência de uma estrutura multiclonal das populações de *T. cruzi* (Tibayrenc M. *et al.*, 1991); (Tibayrenc M. *et al* 2002); (Sturm *et al*, 2010). Portanto, o *T. cruzi* é uma espécie heterogênea, consistindo de várias subpopulações com diferentes características bioquímicas, biológicas e genéticas (Macedo *et al.*, 2004).

A diversidade genética do *T. cruzi* permite sua classificação em sete linhagens diferentes, sendo: seis DTU (Discrete Typing Units), de TcI a TcVI, e um sétimo genótipo, TcBat (Zingales B. *et al* 2009), (Zingales B. *et al* 2018), (Marcili A. *et al* 2009), que inicialmente foi identificado em várias espécies de morcegos (Ramírez JD *et al* 2014).

Qualquer linhagem de *T. cruzi* pode infectar humanos, entretanto, TcI, TcII, TcV e TcVI são as UTDs mais associadas a infecções humanas em ciclos de transmissão domiciliar em áreas endêmicas (Zingales B *et al* 2012), (Messenger LA. *et al* 2015). No Brasil, TcII e TcVI são as DTUs de *T. cruzi* mais frequentemente identificadas em infecções humanas (Rodrigues-Dos-Santos Í *et al* 2018), (Ribeiro AR *et al* 2018).

A elevada diversidade genética, e os isolados apresentam características biológicas distintas, provavelmente relacionadas com as diferentes apresentações clínicas da doença de Chagas como a forma indeterminada, manifestações cardíacas e digestivas). (Bosseno MF. *et al* 2000). Essas diferenças são expressas nos níveis de parasitemia e tropismo por determinados órgãos, bem como no desenvolvimento de várias patologias em mamíferos infectados, incluindo o ser humano. (García A. 2011).

Da mesma forma, quando o *T. cruzi* entra no hospedeiro, a primeira linha de defesa é ativada, ou seja, a resposta imune inata (Almeida I.C. *et al* 2000), por meio da sinalização do receptor Toll (TLR) e ativação de macrófagos por glicoproteínas semelhantes à mucina (Almeida I. C. *et al* 2001), (Ferguson M. A. J. 1999); resultando no aumento da produção de IL-12, IFN- γ e óxido nítrico (NO) (Campos M. A. S. *et al* 2001).

Porém, o *Trypanosoma cruzi* responde à variação das mudanças por possuir plasticidade morfogenética para se adaptar a um microambiente específico, mimetizando propriedades biológicas e antigênicas, como pôde ser observado no estudo de Graterol D. *et al* 2013 através do cultivo do *Trypanosoma cruzi* com diferentes tensões de oxigênio (Graterol D., *et al* 2013). Por tanto parece indicar que o *Trypanosoma cruzi* é altamente afetado pelas condições que o cercam durante as fases de infecção razão pela qual esta pesquisa, pretende aplicar o [¹⁸F]FMISO devido às suas propriedades como rádio-traçador na imagem PET, permitindo uma avaliação não invasiva da hipóxia tecidual.

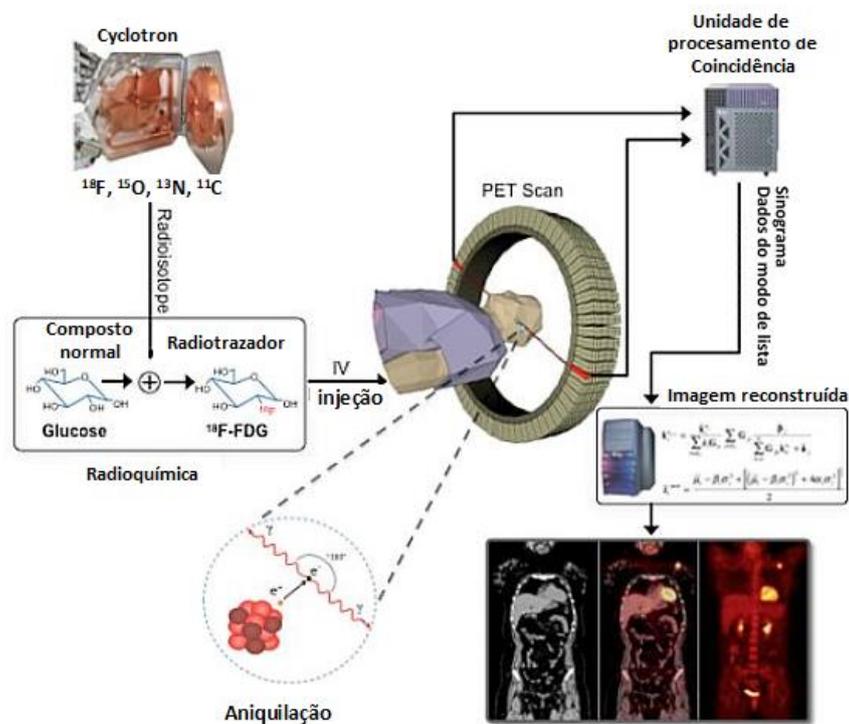
É importante destacar que o mundo moderno atualmente está aplicando diversas tecnologias para solucionar os problemas da sociedade, ainda mais os relacionados com à saúde, portanto, o diagnóstico de diversas patologias requer o acompanhamento in vivo das alterações patológicas, morfológicas e funcionais no indivíduo acometido. Por tanto esse aspecto foi sido observado por este trabalho e por diversos pesquisadores que consideram a aplicação das técnicas de medicina nuclear, por meio de radiofármacos como um componente essencial na pesquisa científica, não só na patologia oncológica, mas também dos aspectos envolvidos na avaliação da progressão da infecção. Assim, por exemplo, no estudo de Salimy M.S. *et al* 2017, concentrou suas pesquisas em achados anormais de PET [¹⁸F]FDG e [⁸²Rb] na Cardiopatia Chagásica, obtendo imagens em um caso clínico de um paciente acometido pela patologia chagásica, indicando a aplicação desse tipo de etiologia para auxiliar na distinção entre sarcoidose cardíaca ativa e outras etiologias de cardiomiopatia não isquêmica. Da mesma forma Garg, G. *et al* 2016, avaliou a captação cardíaca de [¹⁸F]FDG na doença de Chagas. Portanto, as noções gerais desta tecnologia no campo de aplicação da medicina nuclear serão desenvolvidas a seguir.

3.3 Tomografia por Emissão de Pósitrons/Tomografia Computarizada

O sistema híbrido de tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada (PET/CT) é uma modalidade de imagem amplamente utilizada em medicina nuclear.

Atualmente, esses exames são realizados em aparelhos sincronizados com tomografia computadorizada que permitem combinar as imagens metabólicas com as anatômicas, obtidas respectivamente para as duas técnicas que fornecem imagens mais detalhadas de áreas internas do corpo. – acrônimo PET-CT, do inglês PET-CT, *Positron Emission Tomography – Computed Tomography*. (Visioni, A. *et al* 2011).

Figura 2. Aquisição de imagens com PET



Fonte: Adaptado de University of UTAH. Huntsman Cancer institute 2000

A base para a aquisição da imagem consiste no decaimento e emissão de pósitrons do radioisótopo emissor de radiação β^+ que foi injetado no paciente. Portanto, essas moléculas podem colidir com um elétron cortical do tecido, essa aniquilação dá origem à emissão de dois raios gama fundamentalmente de 511keV na mesma direção e direções opostas, como mostra a Figura 2. A imagem é obtida por meio da detecção de fótons gama emitidos pelo paciente, para isso os fótons devem vir da mesma direção e em direções opostas além de serem detectados concomitantemente em uma janela de tempo de nanossegundos), (Phelps M.E. 2000) (Bicher B.J B.J. *et al* 2008).

O (PET/CT) tornou-se um método fundamental na avaliação oncológica na prática clínica atual. Dentro dos últimos anos, tornaram-se evidentes novas aplicações para esta

técnica, como a avaliação de patologias inflamatório-infecciosas, que geralmente apresentam um aumento mensurável no metabolismo (Gerhard F *et al* 2017), além do acompanhamento de resposta terapêutica precoce de muitas doenças. (Ávila R.M.A. *et al* 2010).

A tecnologia PET/CT pode ajudar a revelar a função metabólica ou bioquímica de tecidos e órgãos. No procedimento é usado um radiofármaco ou radiotraçador administrado por via intravenosa, quando absorvido pelas células, nesse local ocorre emissão de raios gama que são captados por um detector de radiações (tomografia por emissão de pósitrons), acoplado a um computador que forma as imagens. A aquisição de imagens funcionais do PET associadas às imagens da tomografia computadorizada (CT) de alta resolução e baixa dose de radiação, são adquiridas num intervalo de tempo determinado após a administração do radiofármaco por via endovenosa, a depender do objetivo diagnóstico. (Phelps ME 2000) (Ávila R. M.A. *et al* 2010).

Dentro os radiofármacos emissores de pósitrons com meia-vida curta, a [¹⁸F]FDG, um análogo da glicose, é o mais comumente utilizado. O seu acúmulo depende do metabolismo glicolítico nos diversos órgãos e tecidos. (Jacobson *et al.*, 2015); (Conti M. *et al* 2016). (Bicher B.J. *et al* 2008). Além da [¹⁸F]FDG existem diversos outros traçadores emissores de pósitrons já em uso clínico no mundo, e outros ainda em desenvolvimento, nas áreas de oncologia, neurologia, cardiologia, e outros. (Dimen. 2010). (Jiang, L. *et al* 2014). Eventuais lesões encontradas nos exames de PET/CT podem ter sua intensidade de captação quantificada, gerando um valor numérico SUV (standard uptake value), que expressa a atividade metabólica desta lesão. Esta quantificação tem valor no acompanhamento da evolução da doença (Dimen. 2010). (Jiang, L. *et al* 2014).

3.4 Descrição, mecanismo de ação e metabolismo de [¹⁸F]FDG

O radiofármaco [¹⁸F]FDG tem como molécula ativa a 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glicose, cuja fórmula molecular corresponde a C₆H₁₁¹⁸FO₅ com peso molecular de 181,26 daltons e meia-vida de 109,7 minutos. O flúor [¹⁸F] decai por emissão de pósitrons (β⁺) Os principais fótons úteis para o diagnóstico por imagem são os fótons gama de 511 keV, que resultam da interação do pósitron emitido com um elétron (Tabela 1) (Cunha J. 2022).

Tabla 1. Principais dados de emissão de flúor ¹⁸F

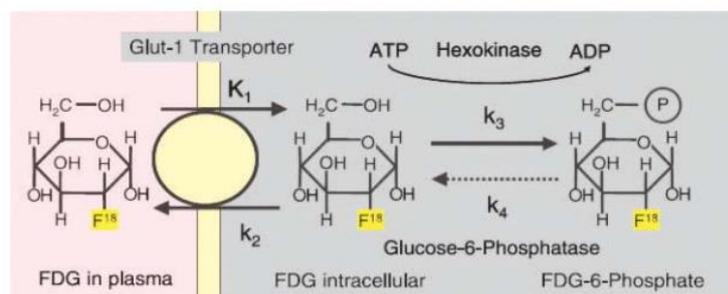
Radiação/Emissão	% por Desintegração	Energia média
Positron (β ⁺)	96.73	249.8 keV
Gamma (±)*	193.46	511.0 keV

Fonte: Adaptado em português de Kocher, D.C. "Radioactive Decay Tables" DOE/TIC-11026, 89 (1981).

As enzimas hexoquinases presentes nas células catalisam a etapa mais essencial e inicial do metabolismo celular da glicose. Essas enzimas têm uma alta afinidade pela glicose e a convertem em glicose-6-fosfato, criando um gradiente descendente que resulta no aumento da difusão facilitada de glicose através de transportadores facilitadores de glicose (GLUT1-13) (Avril N. 2004). A fosforilação rápida por hexoquinases aprisiona a molécula de glicose dentro da célula pois a glicose-6-fosfato é impermeável à difusão membranar. As células saudáveis normalmente metabolizam a glicose-6-fosfato por diferentes vias, dependendo do seu estado energético (Suolinna EM *et al* 1986).

A 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glicose ([¹⁸F]FDG), é um análogo da molécula de glicose, No entanto, não possui O grupo hidroxila na posição 2-C. Em vez disso, contém o radioisótopo [¹⁸F] (Suolinna EM *et al*, 1986). Portanto, quando entra na célula usando os receptores GLUT1 ou GLUT3, torna-se fosforilado e não é posteriormente metabolizado. Para continuar o processo de glicólise, o oxigênio 2 da molécula de glicose deve ser desfosforilado pela glicose-6-fosfatase para sair da célula, porém a molécula de [¹⁸F]FDG-6-fosfato formada não entra na via glicolítica antes do decaimento da radioatividade (López DA *et al* 2017) (Suolinna EM *et al*, 1986).

Figura 3. Estrutura e metabolismo do [¹⁸F]FDG. A [¹⁸F]FDG é fosforilada pela hexoquinase ficando metabolicamente aprisionada e acumulada dentro das células em forma proporcional ao metabolismo da glicose. A [¹⁸F]FDG é transportada para as células por GLUTs em paralelo com a glicose. Na [¹⁸F]FDG, o [¹⁸F] é substituído pelo grupo hidroxila normal (-OH) na posição C-2 da molécula de glicose. ADP = adenosina difosfato, ATP = adenosina trifosfato, 6P = 6-fosfato.



Fonte: (Kobayashi K. *Et al.* 2012) (Haro E. 2009)

A [¹⁸F]FDG é concentrada em células que dependem da glicose como fonte de energia, ou em células cuja dependência de glicose é aumentada em condições fisiopatológicas (Suolinna EM *et al*, 1986). Particularmente quando se tem em conta a diferença cinética entre o transporte da glicose, e a fosforilação é levada em consideração, a [¹⁸F]FDG que é expressa como a proporção da "constante concentrada", e será usada para avaliar o metabolismo da glicose (Cunha J. 2022).

Portanto, conforme descrito acima, a distribuição de [^{18}F]FDG é um bom reflexo da distribuição no consumo e fosforilação da glicose nas células do corpo (Kawada K., *et al*, 2016, Kawai N. *et al*, 2013).

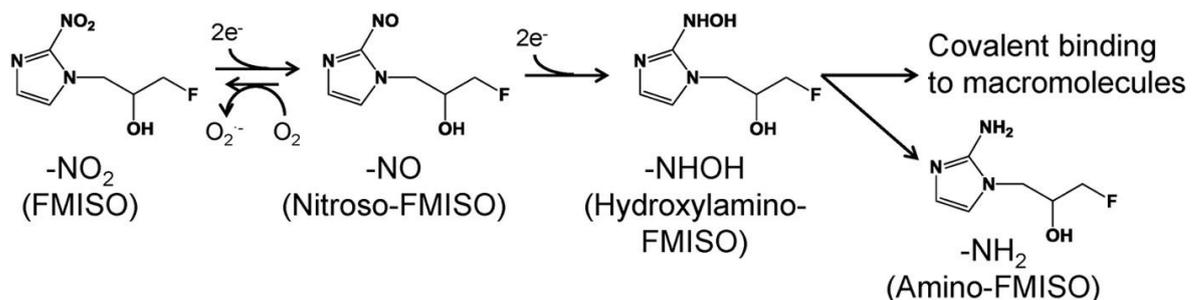
A injeção da [^{18}F]FDG é rapidamente distribuída para todos os órgãos do corpo após administração intravenosa. A imagem PET é ideal após 30 a 40 minutos de administração. A análise da imagem deve levar em conta várias considerações como: A atividade de fundo, o tipo específico de órgão ou tecido e as regiões de captação: Aumentada, Diminuída ou Ausente de [^{18}F]FDG em comparação com os valores normais (Cunha J. 2022).

3.5 Descrição, mecanismo de ação e metabolismo de [^{18}F]FMISO

O [^{18}F] Fluoromisonidazol ([^{18}F]FMISO) é um radiofármaco que vem sendo amplamente utilizado em estudos pré-clínicos e clínicos, foi o primeiro radiofármaco desenvolvido para obter imagens PET de hipóxia com base em nitroimidazol (Rasey JS *et al* 2000) para avaliação, prognóstico e quantificação da hipóxia tumoral e, portanto, do microambiente tumoral (Rajendran JG. *et al*, 2015). O [^{18}F]FMISO é sintetizado a partir de um precursor comercial que possui a estrutura química de 1-(2'-Nitro-1'-imidazolil)-2-O-tetra-hidropiranyl-3-O-toluenossulfonil-propanodiol (precursor NITTP para [^{18}F]FMISO ABX 2022).

A ligação do [^{18}F]FMISO às células depende do estado de oxigenação do tecido e é reversível na primeira etapa (Figura 4), portanto parte da [^{18}F]FMISO acaba retornando à circulação e é excretada pelo rim e bexiga sem ser previamente metabolizada pelo fígado (Lee ST, *et al* 2007). O [^{18}F]FMISO não fica preso no tecido necrótico porque o transporte de elétrons mitocondrial está ausente. Além disso, parte do [^{18}F]FMISO é excretada como conjugado pelos rins (Investigator's Brochure 2013).

Figura 4. Mecanismo de redução e acúmulo de [^{18}F]FMISO nas regiões tecidulares hipóxicas.

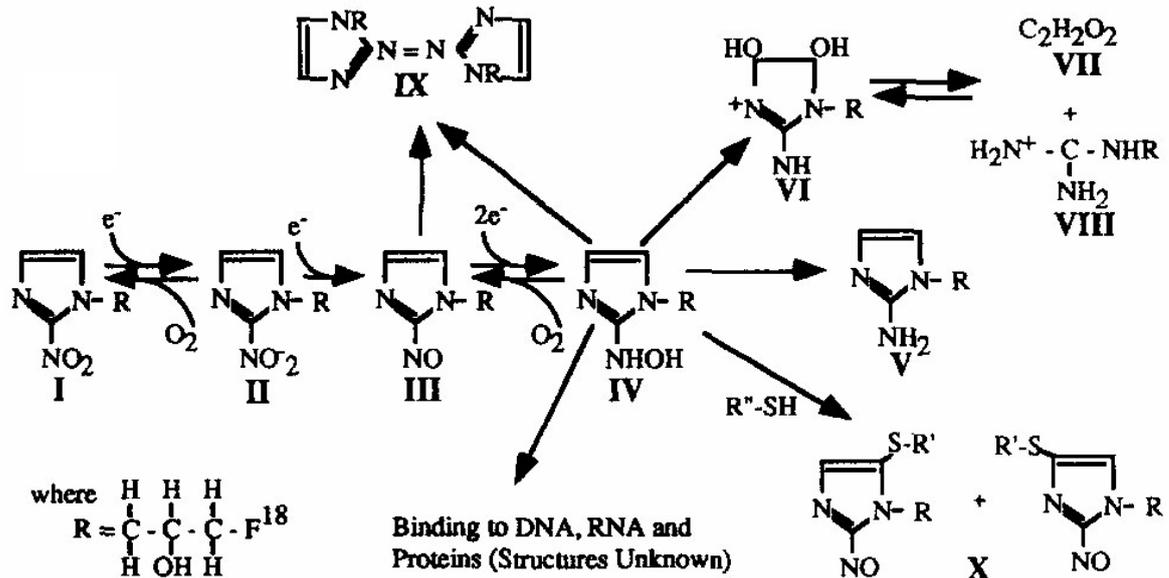


Fonte: Esquema proposto por Masaki Y *et al*, 2015)

O $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ é um sensibilizador de células hipóxicas à base de azomicina, seu mecanismo de ação é que $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ é reduzido por hipóxia e se liga covalentemente a moléculas celulares em taxas que são inversamente proporcionais à concentração de oxigênio intracelular, em vez de por interações bioquímicas subsequentes (Prekeges JL. *et al* 1991). A ligação covalente dos nitroimidazóis ocorre por alquilação biorredutiva baseada na redução da molécula através de uma série de etapas de 1 elétron na ausência de oxigênio (McClelland RA. 1990).

Os produtos de hidroxilamina e o produto de redução de 2 elétrons ligam-se de forma estável a macromoléculas, como DNA, RNA e proteínas nas células (Figura 5). Então, na presença de oxigênio, ocorre um ciclo, no qual o primeiro produto de redução de 1 elétron, que é um ânion radical nitro, é reoxidado a nitroimidazol original, com a produção simultânea de um ânion radical oxigênio (Investigator's Brochure 2013). A especificidade da reação é aumentada uma vez que tanto a redução quanto a ligação ocorrem dentro da mesma célula (Wiebe LI *et al*, 1996, Chapman JD *et al* 1981).

Figura 5. Metabolismo de 2-n nitroimidazóis com $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$

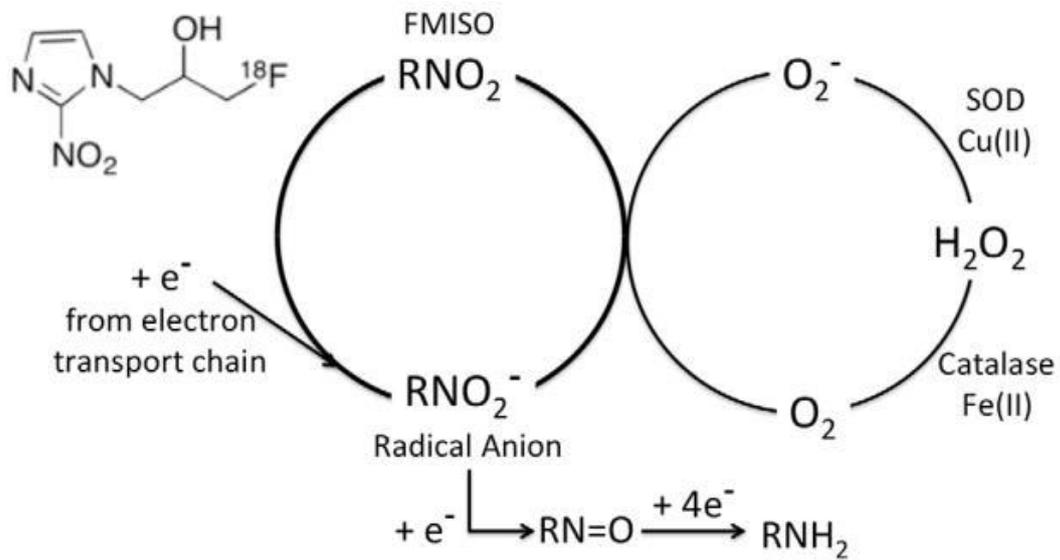


Fonte: Investigator's Brochure 2013.

A Figura 6 mostra como as mitocôndrias perdem continuamente elétrons nas células vivas, que são absorvidas pelo receptor de elétrons terminal, O_2 . Na ausência de oxigênio, torna-se um agente alquilante e é retido nas células em um nível inversamente relacionado à concentração de O_2 . O radical ânion RNO_2 que se reduz por um segundo elétron, se acumula até uma concentração de estado estacionário. Se o O_2 estiver presente

em concentração adequada, o ânion radical RN O_2 cede seu elétron extra ao O_2 e retorna ao $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ original no ciclo (Rajendran JG. *et al* 2015).

Figura 6. Mecanismo de ação do $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$



Fonte: Rajendran JG. *et al* 2015

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho teve as seguintes etapas de investigação:

- 4.1. Produção dos radiofármacos [^{18}F]FDG e [^{18}F]FMISO;
- 4.2. Cultura celular de LLC-MK2, amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*;
- 4.3. Infecção em modelos experimentais;
- 4.4. Estudos de Biodistribuição;
- 4.5. Estudos de Farmacocinética;
- 4.6. Estudos de imagem PET/CT.

4.1. Produção dos radiofármacos [^{18}F]FDG e [^{18}F]FMISO

Para a produção do isótopo radioativo [^{18}F], foi utilizado o ciclotron Cyclone 18 modelo 18 MeV do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). O íon [^{18}F] tem uma meia-vida de 109 minutos e foi obtido por irradiação de água enriquecida H_2O^{18} com prótons de 15 MeV de energia, por meio da reação $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.

A síntese de radiofármacos e o manuseio de materiais radioativos foram realizados em celas quentes com blindagem de chumbo Figura 7, Figura 8.

Figura. 7 Módulo de síntese da General Electric G.E. TRACERlab MXFDG.



Fonte: Autora da dissertação.

Figura. 8. Celas quentes no módulo de síntese de ciclotron.

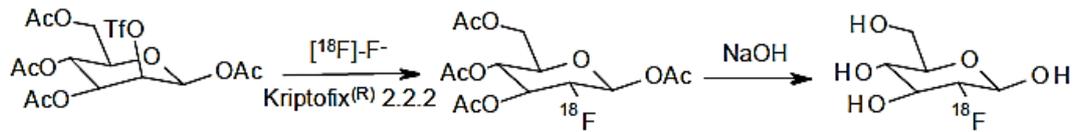


Fonte: Autora da dissertação.

4.1.1. Síntese [^{18}F] Fluoro-2-Desoxi-D-Glucose ([^{18}F]FDG)

A síntese de [^{18}F]FDG foi realizada no laboratório de celas quentes do IPEN-CNEN/SP usando o módulo sintetizador da General Electric G.E. Módulo Sintetizador TRACERlab MX_{FDG}. O produto final foi obtido após um tempo de reação de 27 minutos e a síntese prosseguiu conforme reação descrita na Figura 9.

Figura 9. Esquema das etapas de síntese do radiofármaco [^{18}F]FDG.



Fonte: López D.F. *et al* 2001

Brevemente, a síntese iniciou-se pela transferência do flúor-18 para o funil do módulo de síntese a fim de capturar o material produzido pelo Cyclotron. A atividade foi recebida e medida por um detector de radiação localizado dentro do módulo da síntese. Posteriormente, a atividade contendo o [^{18}F]-flúor foi transferida para um cartucho (QMA) utilizando uma solução de carbonato de potássio e um aminopoliéter se formando um complexo fluorado, (K/K 222)+/[^{18}F]-F⁻. Subsequentemente, o complexo foi descarregado em um tubo de reação de borossilicato do tipo Pyrex. O complexo fluorado (K/K 222)+/[^{18}F]-F⁻ reagiu com 25 mg da molécula precursora 1,3,4, 6-tetra -O-acetil-2-O-trifluorometanossulfonil- β -D-manopiranoose. (Manose Triflate, precursor ultra pura para [^{18}F]FDG ABX 2022) previamente dissolvida em acetonitrila anidra. O ânion [^{18}F]-F⁻ deslocou o grupo triflato do carbono-2, quebrando uma ligação carbono-oxigênio gerando uma nova ligação carbono-[^{18}F]-flúor (C-18F) via substituição nucleofílica bimolecular (SN2), que permitiu uma reversão completa da configuração de carbono-2. Devido à inversão da configuração, 2-desoxi-2-[^{18}F]-fluoro-D-manose não é produzido na síntese. Neste processo, foi produzida 2-[18F]-fluoro-2-desoxi1,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranoose.

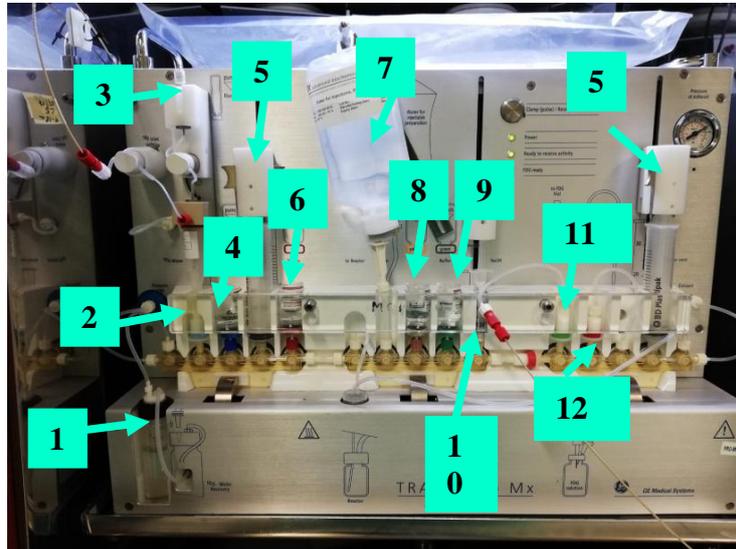
Devido ao fato de existirem 4 grupos protetores no triflato de manose (Grambhir S.S.J, 2001), o procedimento a seguir passou pela remoção destes (desproteção). Para este processo foi utilizada uma solução de Hidróxido de Sódio 2M (1 ml fornecido pela ABX porvisto no kit de reagentes). O Hidróxido de Sódio foi adicionado ao recipiente de reação e aquecido a uma temperatura de 107°C por um período de 15 min. Os grupos acetil de 2-[^{18}F]-fluoro-2-desoxi1,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranoose López DF, *et al* 2001, foram convertidos nos grupos hidroxil livres de 2-[^{18}F]- fluoro-2-desoxi-D-glicose (Padgett, H. C., *et al* 1989).

Posteriormente o produto alvo e alguns subprodutos formados (polímeros [^{18}F]-FDG, compostos polifluorados, etc.) que não são de uso clínico foram purificados por cromatografia de fase reversa (López D. F. A. *et al* 2004); (López DF *et al* 2001), (Doepner Andreas M. 2013).

4.1.1.1. Esquema de produção no módulo de síntese para [^{18}F]FDG

Para a síntese do [^{18}F]FDG foi utilizado o kit de reagentes da marca ABX, e a produção foi feita na celas quentes de síntese. Abaixo encontra-se o esquema de produção do módulo de síntese para [^{18}F]FDG, acompanhado de uma tabela descritiva (Tabela 2).

Figura. 10. Módulo de síntese GE para [^{18}F]FDG, com os reagentes correspondentes. Fonte: Protocolo ABX



Fonte: Autora da dissertação

Tabela 2. Conexões para síntese no módulo [^{18}F]-FDG

CONEXÕES	CONEXÕES
Válvula 1) Recuperação de água O-18	Válvula 8) Entanol
Válvula 2) QMA,	Válvula 9) Tampão
Válvula 3) Eluente	Válvula 10) OHNa 2 M
Válvula 4) Acetonitrila	Válvula 11) Cartucho de Alumina-N
Válvula 5) seringa de 30 ml	Válvula 12) Cartuchos de limpeza
Válvula 6) Precursor de ^{18}F FDG	Válvula 13) seringa de 30 ml
Válvula 7) Solução salina	

Fonte: Protocolo ABX 2015 para sínteses de [^{18}F]-FDG

4.1.1.2. Controle de qualidade de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

O controle de qualidade radioquímico de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, foi feito por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizado o equipamento Scan-ram Radio CCD detector (Lab logic), Figura 11, e, suporte de celulose em solvente Acetonitrila 95% v/v. A amostra foi depositada no suporte CCD em um volume aproximado entre 2 e 3 μl , com atividade aproximada de 0,82 MBq (22,12 μCi), seguindo os parâmetros da farmacopeia United States Pharmacopeial 2017.

Figura. 11. Radiocromatógrafo.

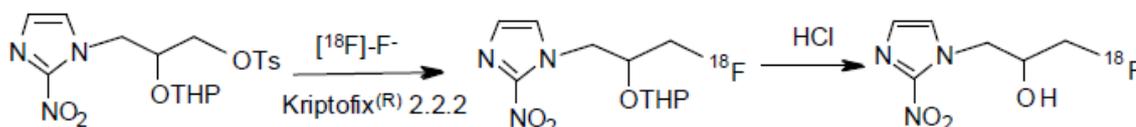


Fonte: Autora da dissertação

4.1.2. Síntese do $[^{18}\text{F}]\text{Fluoromisonidazol}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$)

Para a síntese de $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ o módulo sintetizador da General Electric G.E TRACER lab MXFDG também foi utilizado, obtendo-se o produto final após 58 minutos de reação, usando o kit de reagentes ABX. Para a síntese química de $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ foram considerados os seguintes passos descritos no protocolo de Nieto A. E., 2013, Figura 12.

Figura 12. Esquema das etapas de síntese do radiofármaco $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$.



Fonte: Nieto A. E., 2013

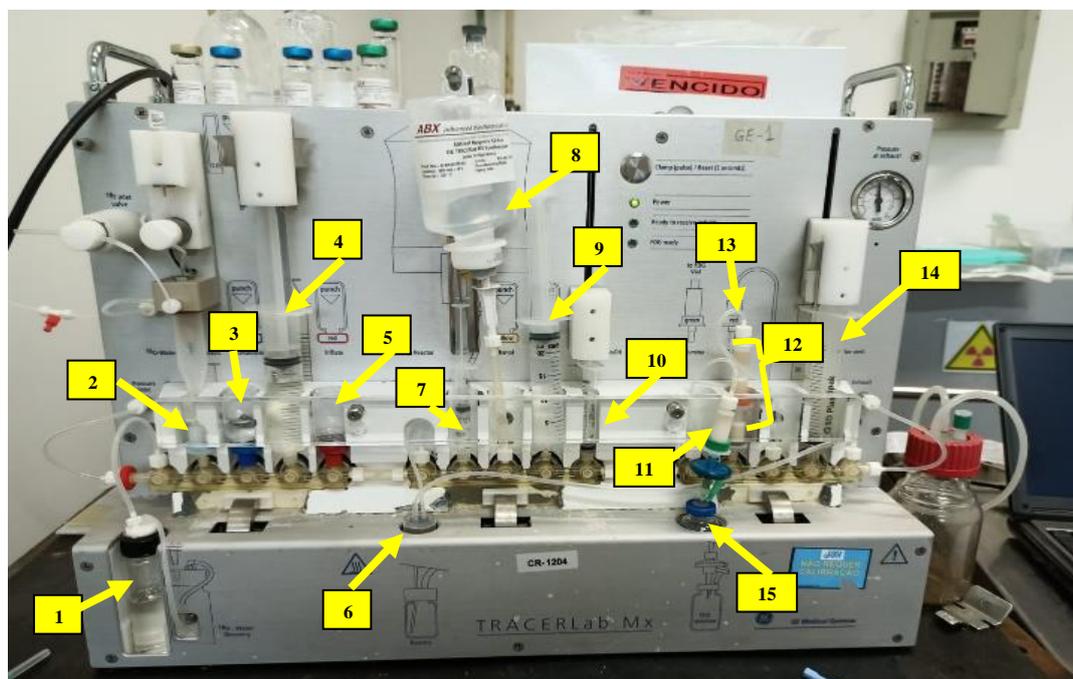
O íon $[^{18}\text{F}]\text{-fluoreto}$ foi transferido do ciclotron para o módulo de síntese TRACERLab Mx desenhado para a síntese de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ e adaptado para a síntese de $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (Figura 13) onde foi retido em um cartucho de troca aniônica QMA e eluído com uma mistura de Kryptofix® 2.2.2/ K_2CO_3 em $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$. O restante da água enriquecida foi recuperado no frasco através do tubo de conexão. Após evaporação dos solventes até à secura, o precursor dissolvido em acetonitrila foi enviado ao reator onde se encontrava o complexo $[^{18}\text{F}]\text{-fluoreto}/\text{Kryptofix}®\ 2.2.2$.

A substituição nucleofílica com ^{18}F - foi realizada a $100\text{ }^\circ\text{C}$ e posteriormente a temperatura foi reduzida gradualmente para $70\text{ }^\circ\text{C}$. Depois, o precursor marcado com ^{18}F -flúor foi transferido para a seringa (bomba 1) e dissolvido em água, purificado por extração em fase sólida usando um cartucho de fase reversa (C^{18}). Após lavagem do cartucho com água, o composto marcado foi eluído com etanol no reator. O etanol foi evaporado a 85°C durante 5 minutos. O precursor marcado com ^{18}F -flúor foi hidrolisado com ácido clorídrico 2N a 105°C em um frasco fechado com a solução neutralizante. A preparação foi purificada usando 3 cartuchos (WAX PLUS, HLB e CROMAfix clean-up cartridge PS-H+) de alumina neutra fornecidos por o kit de reagentes de ABX (Nieto A. E. 2013) (Mädling P. *et al* 2006)

4.1.2.1. Esquema de produção do módulo de sínteses para ^{18}F FMISO

Abaixo encontra-se o esquema de produção do módulo de síntese para ^{18}F FMISO (Figura 13), acompanhado de uma tabela descritiva (Tabela 3).

Figura. 13. Módulo de síntese GE para ^{18}F FMISO, com os reagentes correspondentes. Fonte: Protocolo ABX



Fonte: Autora da dissertação

Tabela 3. Conexões para síntese no módulo [¹⁸F]FMISO

CONEXÕES	CONEXÕES
Válvula 1) recuperação de água O-18, sem	Válvula 8) bolsa de água de 100 ml
Válvula 2) QMA,	Válvula 10) Seringa de 3 ml contendo 1,5 ml Ácido clorídrico 2 M
Válvula 3) 7 ml de acetonitrila	Válvula 11) Frasco final com cartucho de Alumina-N, com filtro estéril com agulha e filtro ventilado; deve se adicionar 3 ml de solução tampão de citrato
Válvula 4) seringa de 30 ml	Válvula 12) Cartuchos de limpeza pré-condicionados (PS-H +, WAX, HLB, de cima para baixo)
Válvula 5) 10 mg de precursor dissolvido em 2 ml de acetonitrila	Válvula 13) tubo para cartuchos de limpeza
Válvula 6) entrada do reator,	Válvula 14) seringa de 30 ml,
Válvula 7) Seringa 2,0 ml de água	

Fonte: Fonte: Protocolo ABX 2013 para sínteses de [¹⁸F]-FMISO

4.1.2.2 Controle de qualidade de [¹⁸F]FMISO

A pureza radioquímica do produto radioativo [¹⁸F]FMISO foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da Agilent Technologies módulo 1260, e monitorada por um detector UV e de radioatividade utilizando o radiodetector (Agilent Interface 35900E Elysia Raytest Gabi) com tecnologia de μ -processador de espectrômetro gama controlado Figuras 14 e 15.

Para isso, uma atividade de 0,74 MBq (20 μ Ci) foi transferida para um frasco de amostra com água milli-Q. A análise levou em consideração as seguintes condições:

- Fase estacionária: Agilent C18 4,6 mm x 250 mm, 5 μ 100 Å.
- Fase móvel: Solvente (A) Água MiliQ + 0,1% TFA, Solvente (B) 100% Acetonitrila.
- Executar: de 10% a 100% de acetonitrila em 30 min.
- Fluxo: 1mL/min.
- Comprimento de onda: 280 nm

Figura 14. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



Fonte: Autora da dissertação

Figura 15. Radiodetector para CLAE

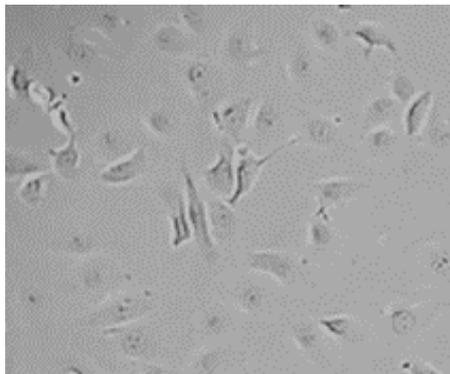


Fonte: Autora da dissertação

4.2. Estudo de ligação *in vitro* dos radiofármacos [^{18}F]FDG e [^{18}F]FMISO

As células epiteliais de rim de macaco LLC-MK2 (ATCC: CCL-7), Figura 16, e a cepa de *Trypanosoma cruzi* cepa γ DTU II foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Maria Julia Mansó do Laboratório de Bioquímica de parasitas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen) com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) com 5% de CO_2 a 37°C . Para os estudos de ligação *in vitro*, 1×10^5 células LLC-MK2 foram cultivadas em placa de 6 poços (em triplicata) e subsequentemente infectadas com 1×10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y (DTU TcII) previamente cultivados em meio LIT (Liver Infusion Tryptose, Invitrogen). Uma vez realizada a infecção das células LLCMK2 com os tripomastigotas, estas foram incubadas por 24 horas em meio DMEM contendo 2% de soro fetal bovino a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Como controle no estudo de ligação *in vitro* foram usadas células LLC-MK2 não infectadas.

Figura 16. Células LLC-MK2 em meio DMEM 10% FBS, não infectadas



Fonte: Autora da dissertação

Ao final de 24 horas de incubação foram adicionados para cada poço 10 μ Ci de [18 F]FDG ou de [18 F]FMISO e as células foram incubadas de acordo com o radiofármaco: no caso de [18 F]FDG foi 1 hora e a incubação com [18 F]FMISO foi de 3 horas.

Para os estudos com [18 F]FDG, as células foram previamente mantidas em PBS (*Phosphate Buffer Saline*) por duas horas antes da adição do radiofármaco (Figura 17A) (Figura 17B). Ao final do período de incubação com o radiofármaco, o meio de cultura foi removido e coletado para um tubo de contador γ , e foram realizadas mais 3 lavagens com PBS. O sobrenadante das três lavagens subsequentes também foi coletado no mesmo tubo (Figura 17C). Finalmente as células foram lisadas pela adição de 1 mL de tampão RIPA e recolhidas para um novo tubo de contador γ . A radioatividade de cada tubo foi medida em um contador gama (Perkin Elmer Wizard2 2470 Automatic Gamma Counter) e a quantificação de proteína em cada tubo foi quantificada através do ensaio BCA (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce, Thermo Fisher Scientific). Posteriormente foi calculada a porcentagem de ligação do [18 F]FDG ou [18 F]FMISO às células por miligrama de proteína. Os dados foram analisados com o teste *t* de Student utilizando o programa GraphPad Prism8.

Figura 17. Esquema das etapas realizadas nos estudos de captação celular dos radiofármacos [18 F]FDG e [18 F]FMISO.

A. Placa de 6 poços com cultura das células LLC-MK2 contendo controle negativo (3 poços de cima) e as células LLC-MK2 + Tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (3 poços de baixo).

B. Tubos de 1,5 mL com 1×10^5 formas parasitárias de Tripomastigotas de *T. cruzi*.

C. Tubos para a determinação da atividade radioativa em contador gama.



Fonte: Autora da dissertação.

4.3. Infecção de animais C57BL/6 com *T. cruzi*

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 de 8 semanas foram infectadas com 100 ou 1000 formas parasitárias tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* da cepa tipo Y DTU II por via intraperitoneal em um volumen de 250 μ L. Um total de 50 camundongos foram infectados e distribuídos pelos seguintes grupos (5 animais por grupo).

Estudos com [¹⁸F]FDG:

Grupo 1: Controle - Animais Saudáveis

Grupo 2: Fase aguda - Animais com 9 dias de infecção com 100 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Grupo 3: Fase intermediária - Animais com 35 dias de infecção com 100 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Grupo 4: Fase crônica - Animais com 90 dias de infecção com 100 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Grupo 5: Fase aguda - Animais com 9 dias de infecção com 1000 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Estudos com [¹⁸F]FMISO:

Grupo 6: Controle - Animais Saudáveis

Grupo 7: Fase aguda - Animais com 9 dias de infecção com 100 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Grupo 8: Fase intermediária - Animais com 35 dias de infecção com 100 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Grupo 9: Fase crônica - Animais com 90 dias de infecção com 100 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Grupo 10: Fase aguda - Animais com 9 dias de infecção com 1000 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

4.4. Estudos de Biodistribuição

Para os estudos de biodistribuição, os animais foram pesados e anestesiado com isoflurano por inalação (concentração inicial 0.5%- anestesia geral 1 a 1.87%). Os animais (5 animais por grupo) foram injetados intravenosamente com 11 MBq de [¹⁸F]FMISO ou 5,5 MBq de [¹⁸F]FDG e ao final de 3 horas ou 1 hora, respectivamente, os animais foram eutanasiados e os principais órgãos (sangue, coração, pulmão, fígado, rins, baço, pâncreas, músculos, cérebro, bexiga, estômago, intestino grosso, intestino delgado) removidos e pesados em uma balança. A atividade em cada órgão foi medida num contador gama (Perkin Elmer Wizard2). Os resultados foram expressos como % de dose injetada (%DI) nos diferentes órgãos e calculados conforme a equação abaixo onde DI_{total} é a atividade no momento da medição do órgão e A é atividade.

$$\%DI_{\text{órgão}} = \frac{A(\text{órgão})}{DI_{total} - A(\text{perdas})} \times 100$$

4.5. Estudos de farmacocinética

Para os estudos de farmacocinética foram usados os mesmos grupos de estudo que para os estudos de biodistribuição (5 animais por grupo). Brevemente, após a injeção intravenosa 11 MBq de [^{18}F]FMISO ou 5 MBq de [^{18}F]FDG, aliquotas de 5 μL de sangue foram retiradas da veia dos camundongos aos 5, 10, 15, 30, 45, 60 (para o [^{18}F]FDG) e adicionalmente, 120 e 180 min (para o [^{18}F]FMISO) após a injeção. A radioatividade em cada amostra de sangue foi medida num contador gama (Perkin Elmer Wizard2). A análise de farmacocinética não compartimental foi aplicada à concentração versus tempo através do programa Excel, e, a meia-vida β , o coeficiente α , o clearance e o volume de distribuição, foram determinados.

4.6. Estudos de imagem PET/CT

Para estes estudos foi realizada uma imagem representativa de cada grupo de estudo. As imagens foram adquiridas com o equipamento Albira PET/SPECT/CT (Albira, Bruker BioSpin), localizado no Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP de acordo com os seguintes protocolos:

4.6.1. Imagem $\mu\text{PET/CT}$ [^{18}F]FDG

1. Jejum de ração seca, pelo período aproximado de 5 horas (o tempo de jejum tem como finalidade evitar a inibição competitiva da glicose endógena (Roldán E. *et al* 2008)).
2. Injeção intravenosa de 5,55 MBq. (150 μCi) de [^{18}F]FDG diluído em solução salina em um volume final de 100 μL .
3. Aquisição da imagem μPET 1 hora após a injeção, por um tempo de 15 minutos seguido de CT (35 KeV, 400 μA).

4.6.2. Imagem $\mu\text{PET/CT}$ [^{18}F] FMISO

1. O jejum não foi necessário para o radiofármaco [^{18}F]FMISO
2. Injeção intravenosa de 11,1 MBq (300 μCi) de [^{18}F]FDG diluído em solução salina em um volume final de 100 μL .
3. Aquisição da imagem μPET 3 horas após a injeção, por um tempo de 15 minutos seguido de CT (35 KeV, 400 μA).

4.7. Análise estatística

Para a análise estatística comparativa de ligação *in vitro* em cultura celular dos radiofármacos, biodistribuição e farmacocinética, foi utilizado o programa GraphPad Prism8, aplicando o teste *t* de Student não pareado (testes *t* múltiplos) para determinar as

diferenças entre as variâncias amostrais. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados da síntese e controle de qualidade dos radiofármacos [¹⁸F]FDG e do [¹⁸F]FMISO

Para verificar as características de cada radiofármaco [¹⁸F]FDG e [¹⁸F]FMISO, foram realizados os respectivos controles de qualidade, que estão descritos a seguir.

5.1.1. Controle de qualidade do radiofármaco [¹⁸F]FDG.

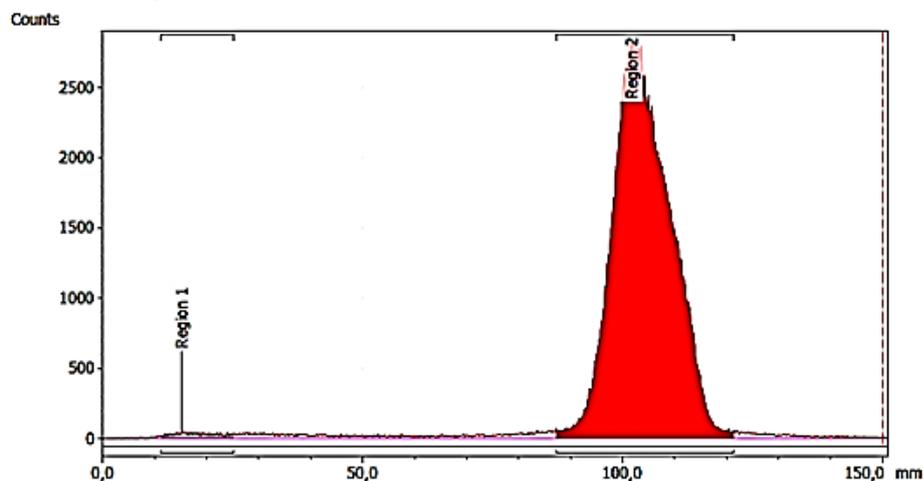
O control de qualidade foi feito por CCD, de acordo com o protocolo descrito nos materiais e métodos, obtendo-se uma pureza radioquímica para o [¹⁸F]FDG maior do que 95% como mostrado na Tabela 5 e Figura 18.

Tabela 5. Resultados do controle de qualidade de [¹⁸F]FDG, com CCD. Cromatografia em Camada Delgada, em solvente Acetonitrila 95% v/v com atividade aproximada de 0,82 MBq (22,162 µCi) volumen 2 µl. obtendo-se os seguintes resultados da Tabela:

Características	Resultados obtidos	*Parâmetros de qualidade de [¹⁸ F]FDG
Aspectos físicos da amostra radiofarmacêutica	Solução límpida, incolor, livre de partículas	Solução límpida, incolor, livre de partículas
Ph	6,5 a 7	5,0-8,5
Pureza radioquímica	De 95 a 100%	≥ 90% Solvente: Acetonitrila 95% v/v Suporte: CCD
Pureza radionuclídica:	110 min	105 a 115

*Fonte parâmetros de controle de qualidade: European Pharmacopoeia 10^a edición 2021) (Verdera *et al* 2011), (Rodríguez S.A. *et al* 2016).

Figura 18. Perfil de análise por CCD de [¹⁸F]FDG. Cromatograma representativo do controle de qualidade do [¹⁸F]FDG obtido por CCD utilizando como fase móvel uma mistura de solventes (MeCN/H₂O) na proporção de 95:5 (n=15).



Fonte: Autora da dissertação

5.1.2. Controle de qualidade do radiofármaco [¹⁸F]FMISO.

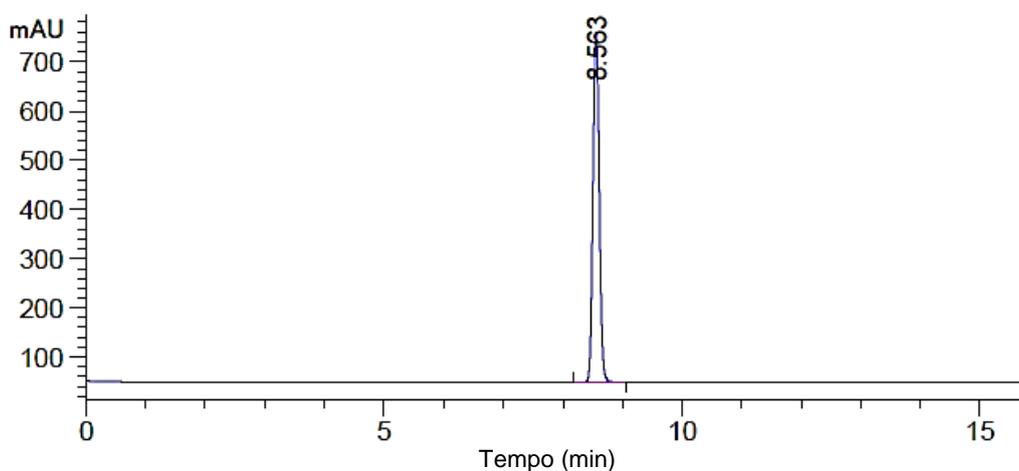
O controle de qualidade do [¹⁸F]FMISO foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) onde foi possível verificar um tempo de retenção (Tr) = 8.65 min e uma pureza radioquímica superior a 95% (Tabela 6 e Figura 19).

Tabela 6. Resultados do controle de qualidade de [¹⁸F]FMISO. A pureza radioquímica do produto radioativo foi feita com no CLAE Agilent Technologies mod 1260, com monitor Elysia raytest Gabi. A actividade da mostra foi 0,74 MBq (20 µCi).

Característica	Resultados obtidos	*Parâmetros de qualidade de [¹⁸ F]FMISO
Aspectos físicos da amostra radiofarmacêutica	O produto obtido é transparente, incolor, sem partículas	Cor transparente, incolor, sem partículas
Ph	6,5	6 a 8
Pureza radioquímica	95% a 100%	Pureza ≥ 95%
Pureza radionuclídica:	110	Meia-vida medida 100-120 minutos

*Fonte dos parâmetros de controle de qualidade: (Investigator's Brochure [¹⁸F] fluoromisonidazole 2013), (Verdera *et al* 2011) (European Pharmacopoeia 10^a edición 2021)

Figura 19. Perfil de análise por CLAE do [¹⁸F]FMISO. O cromatograma do [¹⁹F]FMISO obtido por CLAE é representativo de (n=15) e foi realizado utilizando uma coluna analítica da Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (5 µm, 4.6 x 250 mm 100 Å). A eluição foi realizada com 0,1% de água TFA (A) / CH₃CN (B), gradiente 10-100% (B), fluxo 1 mL / min, tempo de corrida 30 min e monitorado por um detector de UV com comprimento de onda de 280nm - 300 nm. Tr (tempo de retenção) de [¹⁹F]FMISO = 8,563 ± 0,6 min.



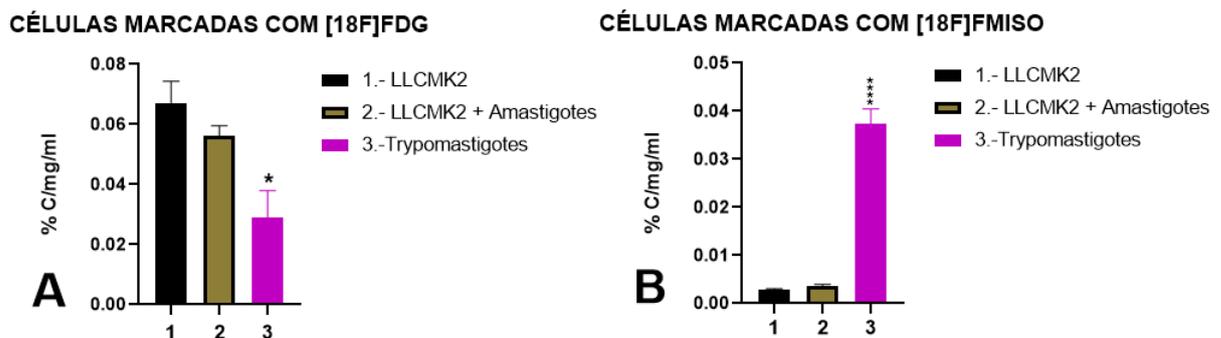
Fonte: Autora da dissertação

5.2. Estudo de captação *in vitro* dos radiofármacos [¹⁸F]FDG e [¹⁸F]FMISO

Inicialmente foi avaliada a captação celular *in vitro* dos radiofármacos [¹⁸F]FDG e [¹⁸F]FMISO ao parasita *T. cruzi*. Para isso, as células renais LLC-MK2 foram cultivadas em placas de 6 poços e posteriormente infectadas com o parasita *T. cruzi* por 24h. Em paralelo,

e como controle, foram utilizados parasitas *T. cruzi* em suspensão e células LLC-MK2 sem infecção. Após o período de infecção das células LLC-MK2, 10 μCi (0.37 MBq) de [^{18}F]FDG ou [^{18}F]FMISO foram adicionados às células por 1 ou 3 horas. As células foram então lavadas e a atividade nas células (correspondente ao radiofármaco retido) foi contada em um contador de poços gama. A contagem foi normalizada pela quantidade de proteína (mg). Podemos observar pela Figura 20A que ao final de 1 hora de incubação com o [^{18}F]FDG as células LLC-MK2 e as células LLC-MK2 infectadas captaram mais [^{18}F]FDG que os parasitas *T. cruzi* sozinhos, Pelo contrário, após de 3 horas de incubação com [^{18}F]FMISO foi possível observar que a forma tripomastigota captou significativamente mais [^{18}F]FMISO do que as células LLC-MK2 e LLC-MK2 infectada (Figura 20 B), possivelmente devido ao fato de o *T. cruzi* possuir a enzima nitroreductase capaz de reduzir o grupo nitroimidazole do [^{18}F]FMISO (Nieto A. E. 2013) mantendo-o preso dentro da célula..

Figura 20. Captação celular de [^{18}F]FDG e [^{18}F]FMISO. As células LLC-MK2 foram cultivadas por 24h na presença ou ausência de 10×10^5 tripomastigotas. Adicionalmente, foram utilizados para este ensaio 10×10^5 tripomastigotas. Após esse período, 0.37 MBq de [^{18}F]FDG ou [^{18}F]FMISO foi adicionado às células por um período de 1 ou 3 horas, respectivamente. As células tratadas com [^{18}F]FDG foram previamente incubadas com PBS 2 horas antes do início do experimento. 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 dois experimentos independentes ($n = 2$). A diferença entre a captação foi analisada usando o teste-t não pareado (testes t múltiplos); $*p < 0,05$.



Fonte: Autora da dissertação

5.3. Estudos de biodistribuição

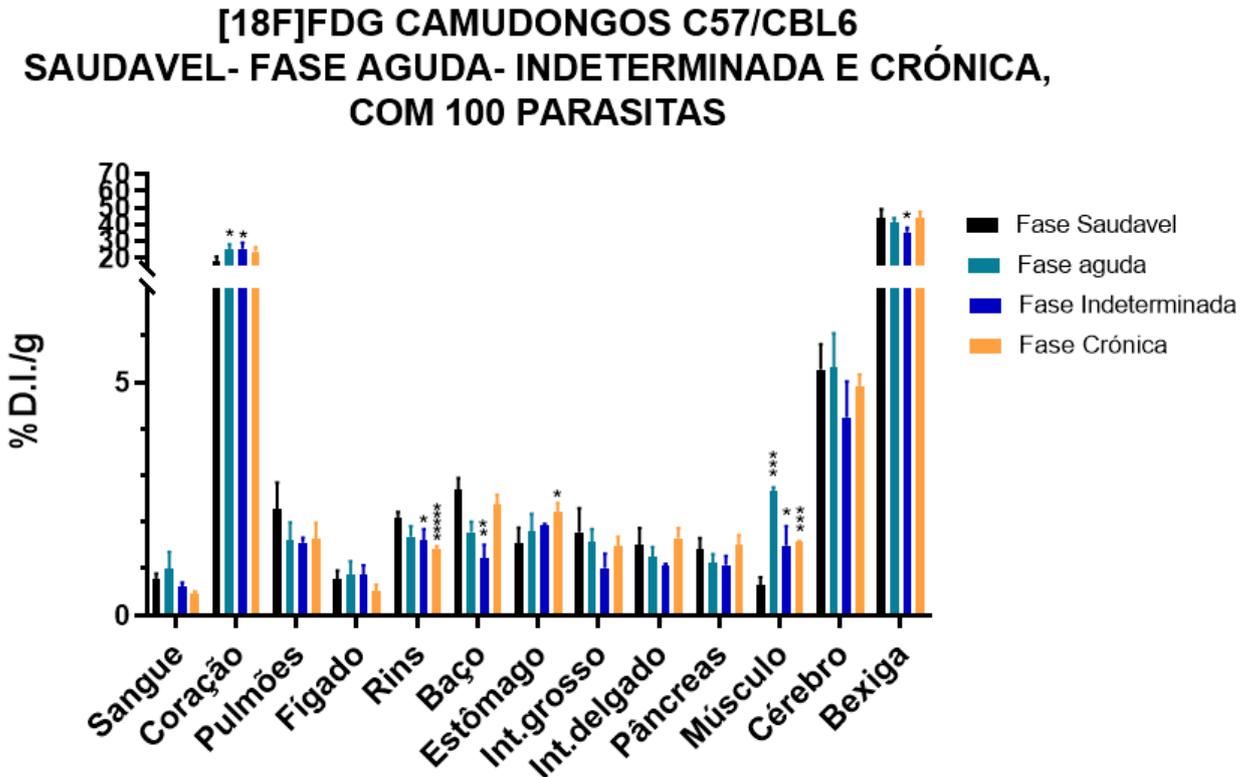
De seguida foram realizados estudos de biodistribuição *ex vivo* de forma a estudar se os radiofármacos [^{18}F]FDG ou [^{18}F]FMISO poderiam servir como bons marcadores diagnósticos por imagem PET/CT de infecção com os parasitas *T. cruzi*. Para isso, animais C57/BL6 foram infectados com 100 ou 1000 formas parasitárias de *T. cruzi*. Ao final de 9 (Fase aguda), 35 (Fase indeterminada) e 90 (Fase crônica) dias pós-infecção, os animais foram injetados com os radiofármacos [^{18}F]FDG ou [^{18}F]FMISO por 1 hora ou 3 horas, respectivamente, e, posteriormente eutanasiados e os órgãos de interesse removidos para pesagem e contagem da radioatividade.

5.3.1. Biodistribuição de [¹⁸F]FDG em animais infectados com *Trypanosoma cruzi*

Pela análise da Figura 21 e 22 e Tabela anexa 1 podemos observar um aumento significativo de captação de [¹⁸F]FDG no coração (fase aguda e indeterminada) e músculo (em todas as fases de infecção) de animais infectados com 100 formas de *T. cruzi* quando comparadas com o grupo controle. Foi também possível observar um aumento significativo de captação de [¹⁸F]FDG no estômago na fase crônica de infecção quando comparado com os restantes grupos.

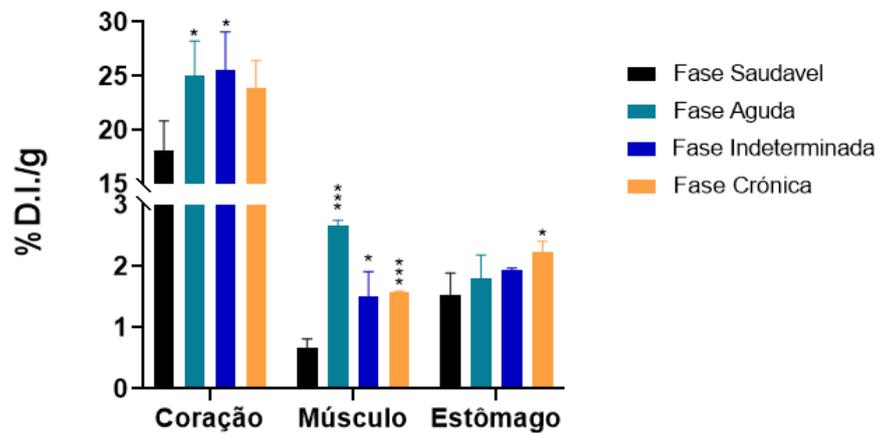
Os dados de captação do [¹⁸F]FDG estão de acordo com o tropismo que a cepa γ DTU II tem no hospedeiro (coração, trato gastrointestinal e músculo) (Loeza *et al* 2020) (Rios Q.T. 2015), indicando que o [¹⁸F]FDG pode ser um bom marcador de inflamação causada por *T. cruzi* nesses órgãos.

Figura 21. Biodistribuição *ex-vivo* do [¹⁸F]FDG em camundongos C57BL/6 saudáveis, e infectados com 100 formas de *T. cruzi* na fase aguda (9 dias após a infecção), indeterminada (35 dias após a infecção) crônica (90 dias após a infecção) da doença de Chagas. O radiofarmaco [¹⁸F]FDG foi injetado através da via intravenosa, com uma actividade de 5,55 MBq. Uma hora após a injeção, os animais foram eutanasiados e os órgãos de interesse foram recolhidos para pesagem, e contagem da atividade em um contador de poços gama. O gráfico apresenta a média \pm D.P da porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) de n=5 por grupo. A diferença entre a captação nos órgãos foi analisada usando o teste *t* de student não pareado (testes *t* múltiplos) onde **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001 e *****p*<0,0001.



Fonte: Autora da dissertação

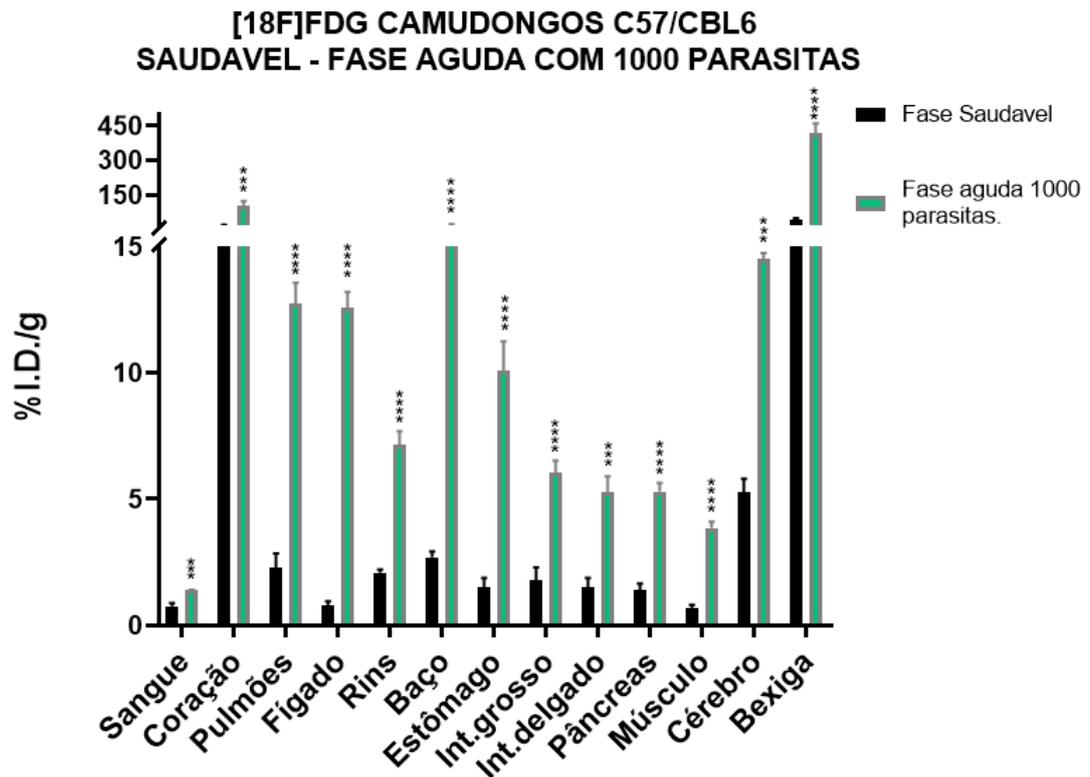
Figura 22. Gráfico de barras apresentando a média \pm D.P da porcentagem de dose injetada de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ por grama (% DI/g) de $n=5$ por grupo dos órgão de maior relevância extraídos da análise do gráfico 21, usando o radiofármaco. A diferença entre a captação nos órgãos foi analisada usando o teste t de student não pareado (testes t múltiplos) onde $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ e $****p<0,0001$.



Fonte: Autora da dissertação

Por outro lado, quando os camundongos foram infectados com 1000 formas parasitárias de *T.cruzi* por 9 dias (fase aguda) foi possível observar um aumento da captação de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ em todos os órgãos analisados quando comparados ao grupo controle, sem infecção (Figura 23, Tabela anexo 2). Estes dados indicam que a infecção de animais com 1000 formas do parasita *T. cruzi* causaram uma inflamação generalizada no hospedeiro quando comparado com a infecção de apenas 100 formas no qual foi possível observar um aumento de captação com $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ em alguns órgãos em particular.

Figura 23. Biodistribuição *ex-vivo* do $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ em camundongos C57BL/6 saudáveis, e infectados com 1000 formas de *T.cruzi* na fase aguda (9 dias após a infecção), O radiofármaco $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ foi injetado através da via intravenosa, com uma actividade de 5,55 MBq. Uma hora após a injeção, os animais foram eutanasiados e os órgãos de interesse foram recolhidos para pesagem, e contagem da atividade que foi feito em um contador de poços gama. O gráfico apresenta a média \pm D.P da porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) de $n=5$ por grupo. A diferença entre a captação nos órgãos foi analisada usando o teste t de student não pareado (testes t múltiplos) onde $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ e $****p<0,0001$.



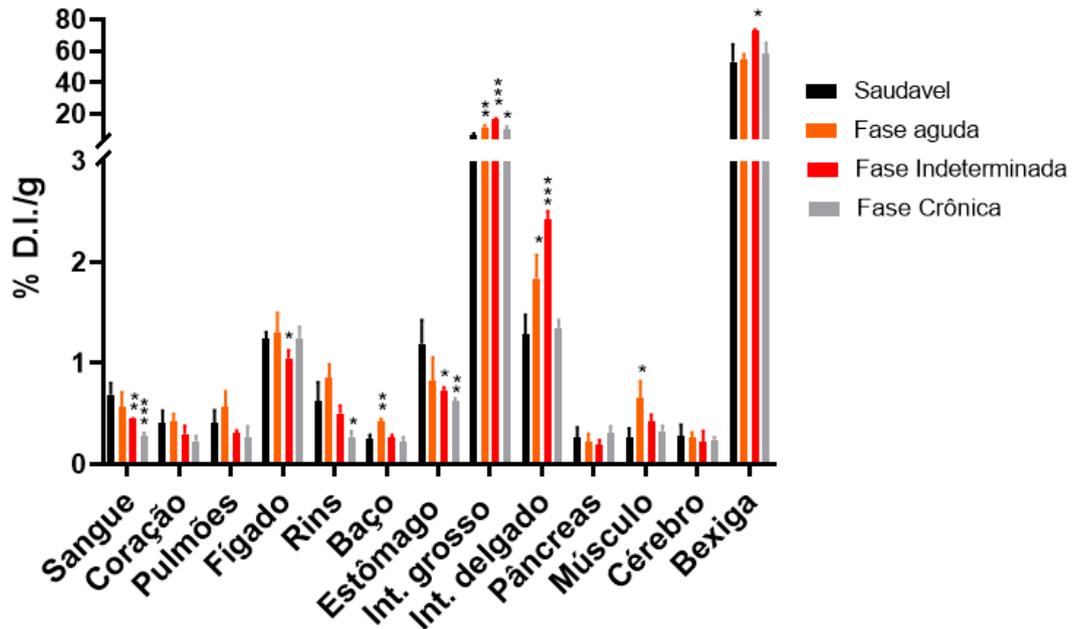
Fonte: Autora da dissertação

5.3.2 Biodistribuição de [¹⁸F]FMISO em animais infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Pela análise da Figura 24 e 25 e Tabela anexa 2 podemos observar um aumento significativo de captação de [¹⁸F]FMISO no intestino grosso (em todas as fases de infecção), no intestino delgado (fase aguda e indeterminada) e, músculo e baço (na fase aguda de infecção) de animais infectados com 100 formas de *T. cruzi* quando comparado com o grupo controle. Pelo contrário, observou uma redução significativa da captação de [¹⁸F]FMISO no sangue, fígado, rins e estômago nas fases intermediária e crônica de infecção quando comparado com animais saudáveis.

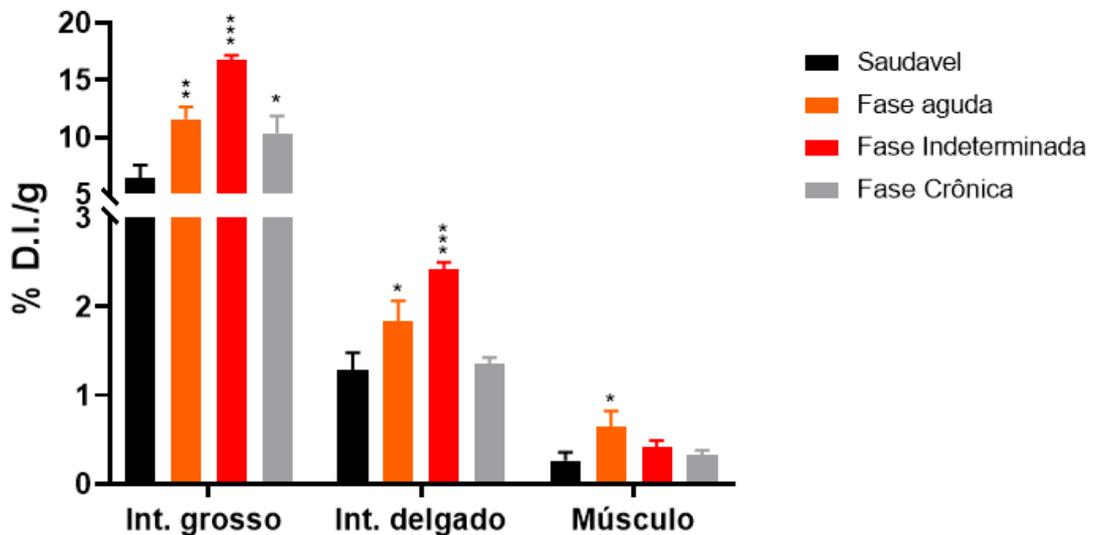
Figura 24. Biodistribuição *ex-vivo* do [¹⁸F]FMISO em camundongos C57BL/6 saudáveis, na fase aguda (9 dias após a infecção, e indeterminada (35 dias após a infecção) da doença de Chagas. O radiofarmaco [¹⁸F]FMISO foi injetado através da via intravenosa, com uma actividade de 11,1 MBq. Três horas após a injeção, os animais foram eutanasiados e os órgãos de interesse foram recolhidos para pesagem, e contagem da atividade que foi feito em um contador de poços gama. O gráfico apresenta o a media ± D.P da porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) de n=5 por grupo. A diferença entre a captação nos órgãos foi analisada usando o teste *t* de student não pareado (testes *t* múltiplos) onde **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001.

**[18F]FMISO CAMUNDONGOS C57/CBL6
SAUDAVEL - FASE AGUDA- FASE INDETERMINADA- FASE CRÔNICA,
COM 100 PARASITAS**



Fonte: Autora da dissertação

Figura 25. Gráfico de barras apresentando a media ± D.P da porcentagem de dose injetada de $[^{18}\text{F}]$ FMISO por grama (% DI/g) de n=5 por grupo dos órgão de maior relevância extraídos da análise do gráfico 21, usando o radiofármaco. A diferença entre a captação nos órgãos foi analisada usando o teste *t* de student não pareado (testes *t* múltiplos) onde **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001 e *****p*<0,0001.

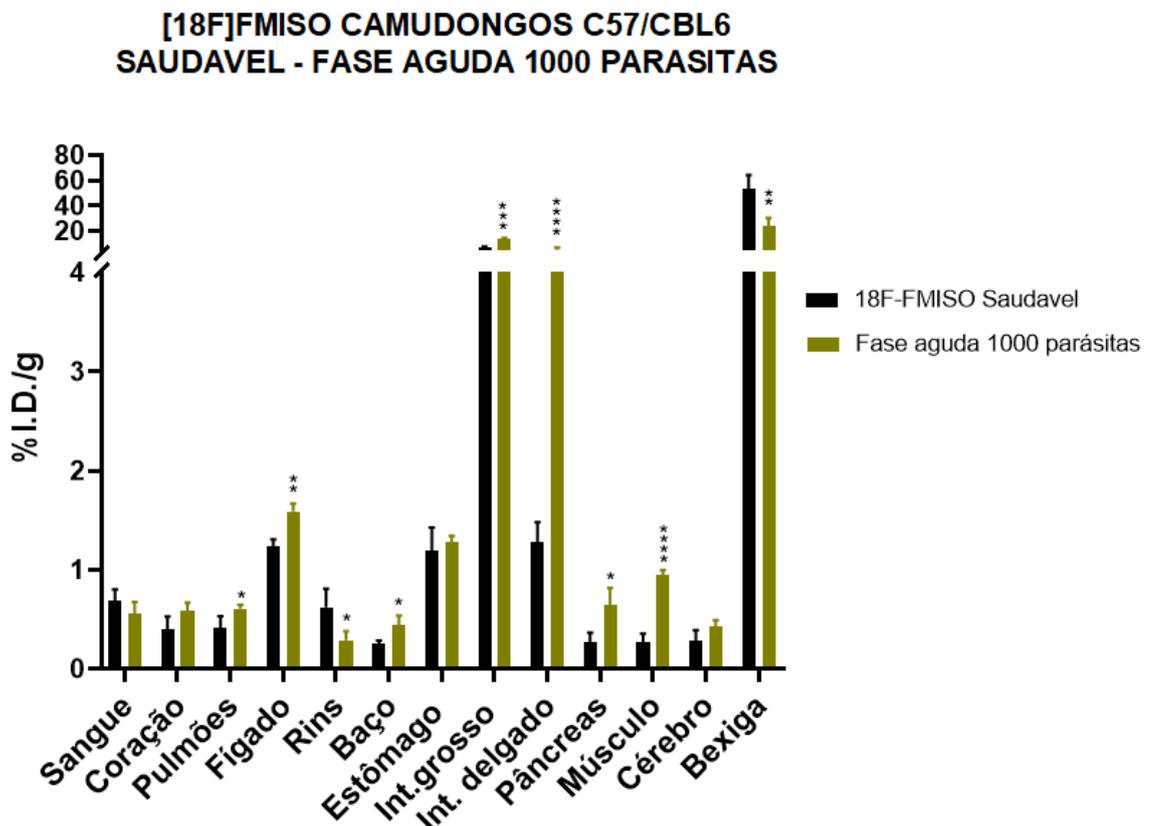


Fonte: Autora da dissertação

Por outro lado, quando os camundongos foram infectados com 1000 formas do parasita *T. cruzi* por 9 dias (fase aguda) foi possível observar uma aumento da captação de $[^{18}\text{F}]$ FMISO no músculo, intestinos, fígado, pulmões, rins, baço e pâncreas em

comparação com animais saudáveis (Figura 26). Estes dados de captação do [^{18}F]FMISO refletem o local de infecção do parasita *T. cruzi* observado nas fases de infecção aguda.

Figura 26. Biodistribuição *ex-vivo* do [^{18}F]FMISO em camundongos C57BL/6 saudáveis, e infectados com 1000 formas de *T. cruzi* na fase aguda (9 dias após a infecção). O radiofarmaco [^{18}F]FMISO foi injetado através da via intravenosa, com uma actividade de 11 MBq. Três horas após a injeção, os animais foram eutanasiados e os órgãos de interesse foram recolhidos para pesagem, e contagem da atividade que foi feito em um contador de poços gama. O gráfico apresenta a média \pm D.P da porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) de $n=5$ por grupo. A diferença entre a captação nos órgãos foi analisada usando o teste *t* de student não pareado (testes *t* múltiplos) onde * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$.



Fonte: Autora da dissertação

5.4. Estudo farmacocinéticos

Após a administração intravenosa do [^{18}F]FDG ou do [^{18}F]FMISO nos animais saudáveis ou infectados com *T. cruzi* nos diferentes estágios da doença, uma amostra de sangue foi coletada aos 5, 10, 15, 30, 45, 60 (para o [^{18}F]FDG) e, adicionalmente, 120 e 180 min (para o [^{18}F]FMISO) e a meia vida α (a distribuição e eliminação do fármaco dos tecidos), a meia vida β (reflete a permanência do fármaco no organismo), o *clearance* (CL, coeficiente de eliminação, que consiste no volume de plasma processado, por unidade de tempo, para remoção do fármaco no corpo) e o volume de distribuição (Vd, o volume aparente que fornece um valor matemático indicativo do grau de distribuição tecidual do

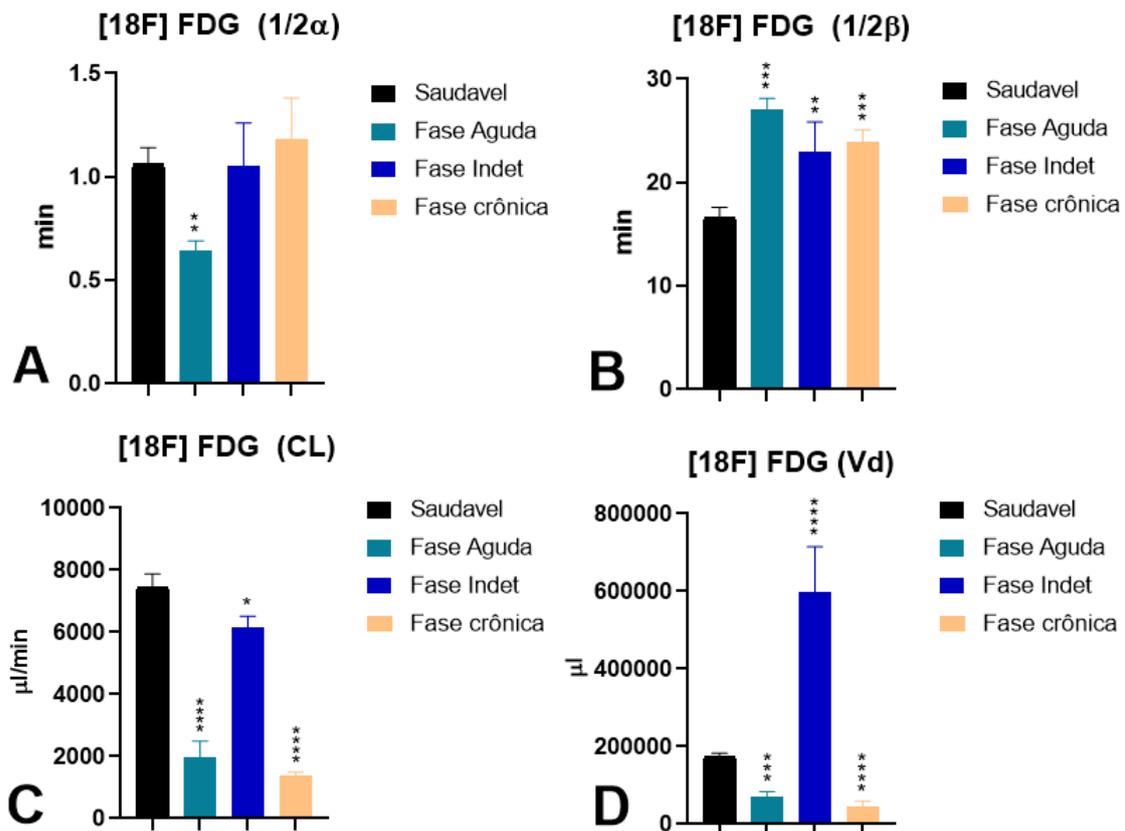
fármaco), foram calculados (Alvariza S. *et al* 2010) (Zurich Z. *et al* 1986) (University of Florida, 2008).

5.4.1. [¹⁸F]FDG

Inicialmente os animais foram infectados com 100 formas de *T.cruzi* e a farmacocinética do [¹⁸F]FDG foi estudada nas diferentes fases da doença de Chagas. Na Figura 27 e Tabela 3 anexa, podemos observar que a infecção aguda de animais C57BL/6 com *T. cruzi* afetou significativamente a meia vida de eliminação α do [¹⁸F]FDG, diminuindo de 1 minuto em animais saudáveis para cerca de 30 segundos nos animais com infecção aguda (Figura 27A). Por outro lado, a infecção dos animais com *T. cruzi* em todas as fases da doença, aumentou significativamente a meia vida de distribuição β em comparação com os animais saudáveis (Figura 27B).

Pode-se observar também que durante a fase aguda o radiofármaco [¹⁸F]FDG apresentou uma maior capacidade de eliminação do corpo do animal nas fases agudas e crônicas (Figura 27C), porém, na fase indeterminada observou-se uma maior retenção do radiofármaco no organismo, aumentando sua meia-vida, devido a sua maior distribuição no tecidos (Figura 27D).

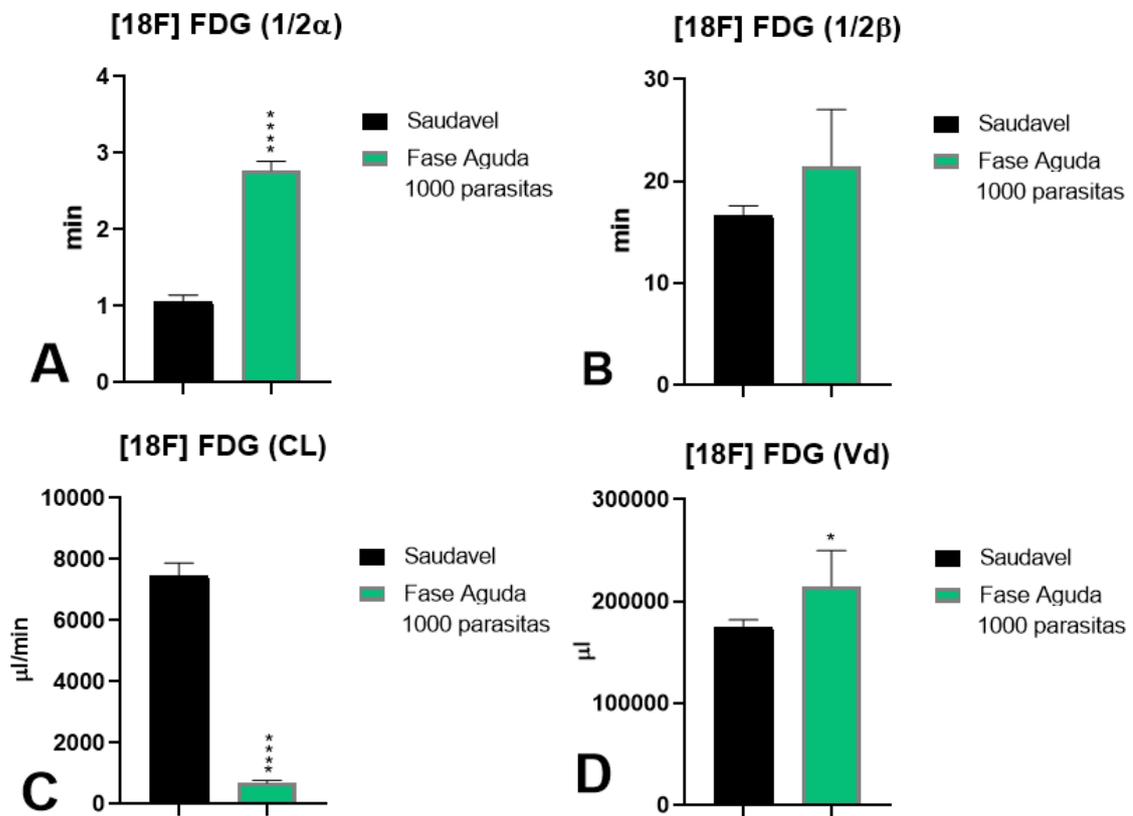
Figura 27. Análise farmacocinética com [¹⁸F]FDG. Após a injeção intravenosa de 5,55 MBq de [¹⁸F]FDG em animais saudáveis ou nas diferentes fases da doença de Chagas (100 formas parasitárias), amostras de sangue foram coletadas por 60 min e a radioatividade medida em um contador gamma. Os parâmetros farmacocinéticos de (A) meia vida α , (B) meia vida β , (C) clearance (CL) e (D) volume de distribuição (Vd) foram calculados. O gráfico apresenta a média \pm D.P de n=5 por grupo onde *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001.



Fonte: Autora da dissertação

Posteriormente, os animais foram infectados com 1000 formas parasitárias de *T. cruzi* e os animais na fase aguda da doença foram avaliados quanto aos parâmetros farmacocinéticos do $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. Como observado na Figura 28, o $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ é distribuído à mesma taxa que os animais saudáveis mas é eliminado mais lentamente dos tecidos quando comparado ao animais saudáveis (Figura 28A e B). Este dado é refletido no clearance onde podemos verificar um menor valor de eliminação do $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (Figura 28C) e maior Vd (Figura 28D) nos animais na fase aguda da doença em comparação com animais saudáveis.

Figura 28. Análise farmacocinética com [^{18}F]FDG. Após a injeção intravenosa de 5,55 MBq de [^{18}F]FDG em animais saudáveis ou na fase aguda da doença de Chagas (1000 formas parasitárias), amostras de sangue foram coletadas por 60 min e a radioatividade medida em um contador gamma. Os parâmetros farmacocinéticos de (A) meia vida α , (B) meia vida β , (C) clearance (CL) e (D) volume de distribuição (Vd) foram calculados. O gráfico apresenta a média \pm D.P de n=5 por grupo onde * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.



Fonte: Autora da dissertação

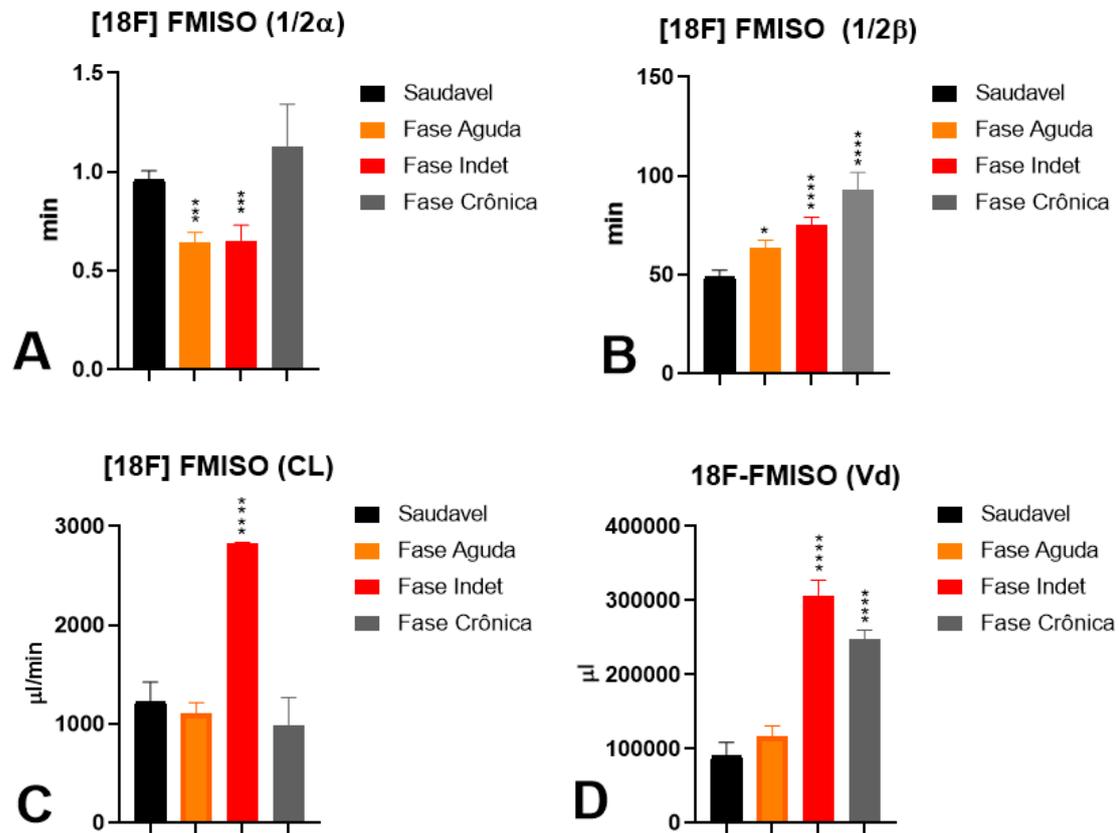
5.4.2. [^{18}F]FMISO

Em seguida os estudos de farmacocinética do [^{18}F]FMISO foram realizados nos animais infectados com 100 formas de *T. cruzi* nas diferentes fases da doença de Chagas. Na Figura 29 e Tabela 4 anexa. Observou-se uma redução na significativa da meia vida de eliminação α do [^{18}F]FMISO na fase aguda e indeterminada da doença quando comparada com os animais saudáveis (Figura 29A). O radiofármaco [^{18}F]FMISO apresentou uma distribuição preferencial nos compartimento periférico, em comparação com o grupo controle, mostrado pelo aumento da meia vida de distribuição β na fase aguda que aumentou na fase indeterminada e foi muito maior na fase crônica (Figura 29B).

Na fase indeterminada da doença foi possível observar uma eliminação mais lenta (Figura 29C) e um aumento na retenção do radiofármaco (Figura 29D) quando comparado com os animais saudáveis. O Vd também foi maior na fase crônica da doença (Figura 29D).

Figura 29. Análise farmacocinética com [^{18}F]FMISO. Após a injeção intravenosa de 11 MBq de [^{18}F]FDG em animais saudáveis ou nas diferentes fases da doença de Chagas (100 formas

parasitárias), amostras de sangue foram colectadas por 180 min e a radioatividade medida em um contador gamma. Os parâmetros farmacocinéticos de (A) meia vida α , (B) meia vida β , (C) clearance (CL) e (D) volume de distribuição (Vd) foram calculados. O gráfico apresenta a média \pm D.P de n=5 por grupo onde *p<0,05, ***p<0,001 e ****p<0,0001.

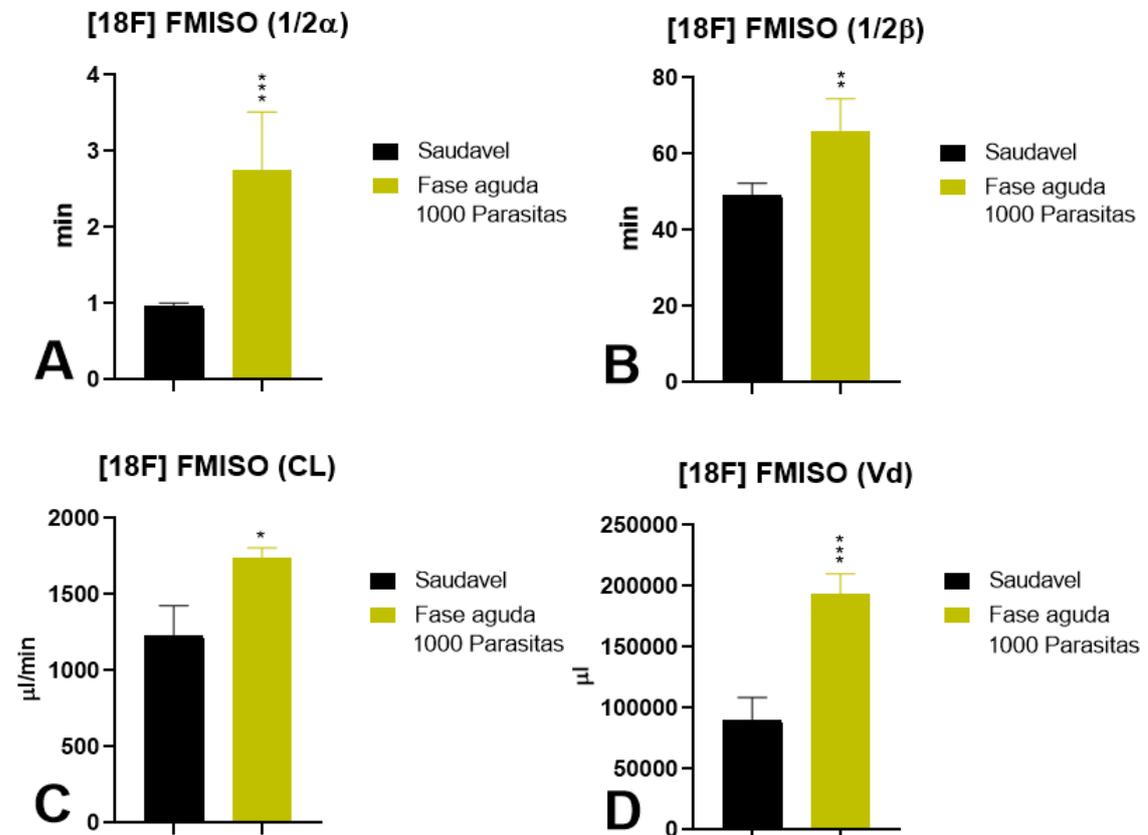


Fonte: Autora da dissertação

A infecção dos animais com 1000 formas parasitárias de *T. cruzi* na fase aguda da doença foi posteriormente avaliada quanto aos parâmetros farmacocinéticos do $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$. Como observado na Figura 30, todos os parâmetros farmacocinéticos estudados encontraram-se significativamente aumentados nos animais infectados quando comparado com os animais saudáveis. A eliminação do sangue e distribuição para os tecidos do $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ foi mais lenta nos animais infectados quando comparado com os animais saudáveis. Possivelmente, os parasitas *T. cruzi* encontrados no circulantes no sangue possam ter contribuído para isso uma vez que o $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ é captado pelo parasitas *in vitro*, contribuindo para uma maior retenção no sangue.

Apesar disso, o $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ é rapidamente eliminado do corpo dos animais infectados (Figura 30C) e apresentou uma maior velocidade de distribuição nos tecidos (Figura 30D) quando comparados com os animais saudáveis.

Figura 30. Análise farmacocinética com [^{18}F]FMISO. Após a injeção intravenosa de 11 MBq de [^{18}F]FDG em animais saudáveis ou na fase aguda da doença de Chagas (1000 formas parasitárias), amostras de sangue foram coletadas por 180 min e a radioatividade medida em um contador gamma. Os parâmetros farmacocinéticos de (A) meia vida α , (B) meia vida β , (C) clearance (CL) e (D) volume de distribuição (Vd) foram calculados. O gráfico apresenta a média \pm D.P de n=5 por grupo onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.



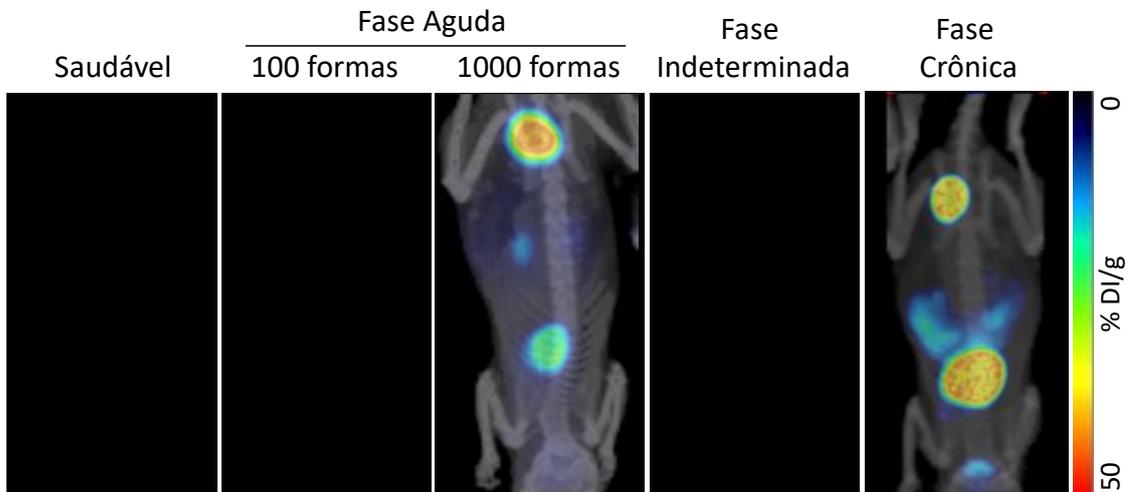
Fonte: Autora da dissertação

5.5. Imagem $\mu\text{PET}/\text{CT}$ utilizando os radiofármacos [^{18}F]FDG ou [^{18}F]FMISO

Por fim, foi realizada uma imagem PET/CT representativa dos animais infectados com o parasita *T. cruzi* nas diferentes fases de infecção (aguda, intermediária e crônica) e animais saudáveis 1 hora e 3 horas após injeção intravenosa dos radiofármacos [^{18}F]FDG (5,5 MBq) e [^{18}F]FMISO (11,1 MBq), respectivamente.

Na Figura 31 é possível observar uma captação de [^{18}F]FDG preferencialmente no coração, cérebro e bexiga tanto nos animais saudáveis quanto nos animais infectados com o parasita *T. cruzi*. Estes dados corroboram os achados da biodistribuição *ex-vivo* onde encontramos uma acumulação do [^{18}F]FDG preferencialmente nesses 3 órgãos.

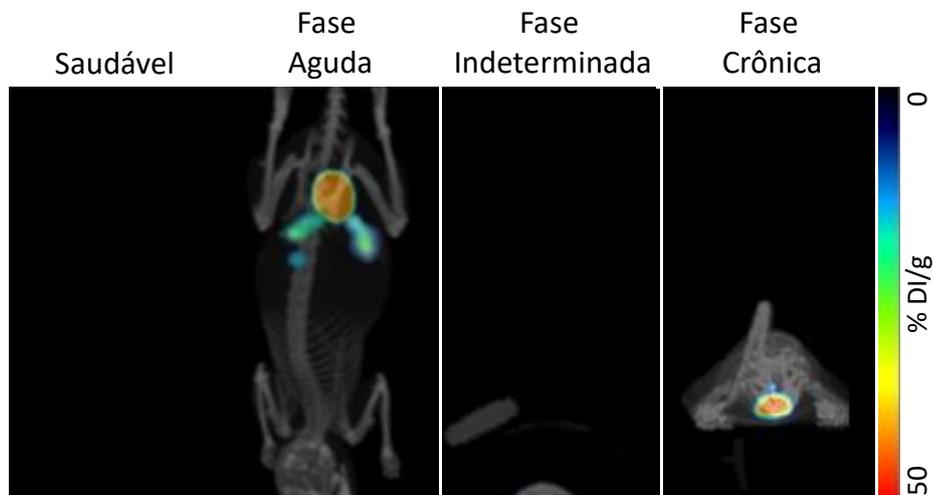
Figura 31. Imagem PET/CT coronal representativa 1 hora após injeção intravenosa de 5,5 MBq de [^{18}F]FDG, n=1.



Fonte: Autora da dissertação

Por outro lado, quando injetados intravenosamente com o radiofármaco [^{18}F]FMISO por 3 horas, foi possível observar uma captação preferencialmente no trato gastrointestinal (intestinos, vesícula biliar) e bexiga tanto nos animais saudáveis quanto nos animais infectados com o parasita *T. cruzi*, corroborando os dados obtidos através dos estudos de biodistribuição *ex-vivo* (Figura 32).

Figura 32. Imagem PET/CT coronal representativa 3 horas após injeção intravenosa de 11,1 MBq de [^{18}F]FMISO, n=1.



Fonte: Autora da dissertação

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho de pesquisa compreendeu vários experimentos, com seus respectivos resultados, cuja discussão será realizada a seguir.

Em relação às aplicações e potencialidades das técnicas de diagnóstico por imagem na pesquisa biomédica da doença de Chagas, Haro P. *et al.* em seu artigo publicado em 2021, indica o PET/CT como uma técnica que permite a visualização de processos fisiológicos, citando entre eles a importância da biodistribuição de moléculas associadas a processos corporais funcionais aplicados em pacientes chagásicos.

Da mesma forma, este estudo levou em consideração os períodos de infecção dos animais de modelos murinos inoculados com *Trypanosoma cruzi*. Assim vários estudos consideram a fase aguda no período de 8 a 9 dias após a infecção, (Ferreira BL *et al.*, 2018), (Mateus, J. *et al.*, 2019).

Com respeito à fase indeterminada, a bibliografia refere que é o período de tempo após a infecção aguda (DNDi, 2022), (OMS 1991) em que não são descritos sintomas perceptíveis da doença, por isso neste estudo foi considerado um período entre 35 e 40 dias após da infecção.

Da mesma forma, para a fase crônica, a bibliografia, indica um período aproximado de 90 dias após a evolução da doença para considerar o estágio na fase crônica em camundongos (Ferreira BL *et al* 2018), (Mateus, J. *et al* 2019),

O modelo experimental murino reproduz a doença de Chagas humana de várias maneiras. Por exemplo, a resposta imune de camundongos e os níveis de expressão de citocinas nas fases aguda e crônica são semelhantes à doença humana. Embora existam muitos fatores complexos que devem ser levados em consideração entre os principais associados à suscetibilidade ou resistência à infecção, como o tipo de linhagem do *Trypanosoma cruzi*, o nível de parasitemia, o sistema Principal histocompatibilidade (MHC), e os fatores genéticos, conforme demonstrado no estudo realizado por Ferreira *et al.*, 2018 e Gonçalves da Costa *et al.*, 2002.

Da mesma forma que acontece em humanos, os modelos murinos de infecção com diferentes linhagens de *T. cruzi* apresentam diferentes histotropismos, graus de suscetibilidade e diferentes padrões de resistência. Assim, por exemplo, na presente pesquisa, a infecção foi realizada com a cepa Y pertencente à DTU II, que foi utilizada para infectar camundongos do tipo C57BL/6. De acordo com a literatura, a cepa Y possui um histotropismo que é a causa de cardiomiopatias e megasíndromes em pessoas e animais (Loeza *et al.*, 2020) Ferreira *et al.*, 2018.

A experiência clínica em pessoas afetadas durante a fase inicial da doença de Chagas indica que entre 5 a 10% (Román GC. 2011) (Mendoza I. *et al* 2015) dos pacientes

são geralmente assintomáticos ou podem apresentar uma síndrome febril autolimitada; porém, em alguns pacientes pode causar a morte, pois os sintomas mais graves nessa fase são miocardite grave, meningoencefalite ou ambos (Pérez M. *et al* 2018). Da mesma forma, estima-se que entre 30% e 40% desenvolverão posteriormente uma forma específica de doença crônica, ou seja, cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (Rassi A Jr 2010) (WHO World Health Organization. 1991).

Estima-se também que aproximadamente 60-70% dos pacientes nunca desenvolvem doença clinicamente aparente; esses pacientes apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas crônica, que se caracteriza pela positividade para anticorpos contra o *T. cruzi* no soro, e exames de imagem normais como eletrocardiograma (ECG) e exames radiológicos (Rx) de tórax, esôfago e cólon (Rassi A Jr 2010) (Pérez M. *et al* 2018).

De acordo com o artigo de Shah-Simpson S. *et al* 2017, os patógenos intracelulares obrigatórios atendem às suas necessidades de nutrientes acoplando-se aos processos metabólicos do hospedeiro, e muitas vezes modulando essas vias para facilitar o acesso aos principais metabólitos. Tais dependências metabólicas representam alvos potenciais para o controle de patógenos. Portanto, a interação entre a infecção com as amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* e o metabolismo energético celular do hospedeiro parece ser caracterizada pelo aumento da captação de glicose nas células infectadas e o aumento da respiração mitocondrial e da biogênese mitocondrial. (Shah-Simpson S. *et al* 2017), em comparação com os tripmastigotas do *Trypanosoma cruzi* apenas.

Metabolicamente falando, embora o crescimento de amastigotas intracelulares não pareça ser alterado pela diminuição da capacidade respiratória do hospedeiro, a restrição de glicose extracelular prejudicaria a proliferação de amastigotas e sensibilizaria os parasitas a uma maior inibição do crescimento pela 2-desoxiglicose. Shah-Simpson S. *et al* 2017).

Da mesma forma, pesquisas científicas indicam que os parasitas de humanos podem ter a capacidade de entrar em um estado de repouso de longo prazo, retardando a replicação e o metabolismo, conforme descrito em *Toxoplasma gondii* (o bradizoíto) (Krishnan *et al.* 2020), assim como em algumas espécies de Plasmodium (Barrett *et al.* 2019), e outros patógenos procarióticos (Fisher *et al.* 2017; Gollan *et al.* 2019). O estado "desligado" envolve a regulação negativa do catabolismo de energia, ativação de respostas ao dano do DNA/estresse celular, bem como níveis mais baixos de síntese e transcrição de DNA.

Assim, Ward A.I. *et al* 2020 menciona que infecções crônicas relacionadas à patologia da doença de Chagas estão associadas a uma taxa reduzida de replicação do parasita, levando em conta que poucas células hospedeiras sobrevivem à infecção por mais de 14 dias, o que sugere que a persistência do *Trypanosoma cruzi* continuaria envolvendo ciclos regulares de replicação, lise da célula hospedeira e reinfecção. Portanto, de acordo com Ward A.I. *et al* 2020 a persistência a longo prazo em órgãos como o cólon é mais provável de estar associada à proliferação reduzida do que à latência.

No caso do [¹⁸F]FMISO, em relação com os resultados da cultura celular que foi descrita na figura 20b, o mecanismo de ação do [¹⁸F]FMISO é comum a todos os nitroimidazóis e baseia-se na redução química que ocorre no tecido hipóxico, ligando-se covalentemente às macromoléculas desse tecido. (Investigator's Brochure [¹⁸F] fluoromisonidazole 2013). O derivado 2-nitroimidazol entra nas células por difusão passiva, permanecendo homogeneamente distribuído no corpo. O grupo nitro tem uma alta afinidade por elétrons. (Nieto A. E. 2013).

Portanto, a especificidade da reação é aumentada pelo fato de que tanto a redução quanto a ligação ocorrem dentro da mesma célula (Chapman JD *et al* 1981), (Nunn A, *et al* 1995). Compostos nitroaromáticos são seletivamente reduzidos por enzimas nitrorredutases, como xantina oxidase, lipoxigenases e oxidases NADPH-dependentes, sob condições hipóxicas para formar produtos reativos que podem se ligar irreversivelmente a nucleófilos de macromoléculas celulares (Nieto A. E. 2013). O grupo nitro tem uma alta afinidade por elétrons, embora essa afinidade seja menor que o O₂, e sua estrutura química possa aceitar um elétron reduzindo no meio ao radical ânion -NO₂.

É muito importante notar que na presença de O₂ (oxigênio), o ânion do radical nitro é reoxidado e o marcador pode deixar a célula. Em contraste, com as condições hipóxicas com baixos níveis de oxigênio, o ânion do radical nitro é reduzido em um segundo estágio, onde não é mais possível reverter o processo; então o radioligante torna-se um agente alquilante que reage indiscriminadamente com macromoléculas intracelulares, ficando irreversivelmente aprisionado (Nieto A. E. 2013), (Brezden, C. B. *et al* 1999), (Brezden, C. B *et al* 1994)

Os farmacos contendo o grupo nitro podem atuar como pró-farmacos, bioativando-se por meio da redução enzimática do grupo funcional, geralmente mediada por nitrorredutases dependentes de flavina usando NADH ou NADPH como agentes redutores (Nepali K. *et al* 2019). As nitrorredutases do tipo I são insensíveis ao oxigênio. Eles reagem transferindo dois elétrons, catalisando assim duas reduções consecutivas dependentes de NAD(P)H, levando à formação de um derivado nitroso e, posteriormente, de uma hidroxilamina (Durchschein K *et al* 2013). A nitrorredutase tipo I é encontrada

principalmente em bactérias e está ausente na maioria dos organismos eucarióticos, excluindo um pequeno grupo de fungos e protozoários. Por exemplo, no *Trypanosoma cruzi* o Benznidazol (BNZ, medicamento aprovado para terapia da doença de chagas) é metabolizado pela enzima nitrorredutase tipo I dependente de NADH (ausente em humanos), a redução do BNZ leva à formação de derivados que terminam com glioxal (agente citotóxico e mutagênico) (Rial SM 2018). Devido à semelhança estrutural entre o BNZ e o [¹⁸F]FMISO, explica-se a maior captação desse último pelo parasita.

Por outro lado, as nitrorredutases do tipo II catalisam a redução de grupos nitro por transferência de um único elétron produzindo um ânion radical nitro. Essas enzimas são sensíveis ao oxigênio, produzindo uma reação diferente dependendo se o ambiente é aeróbico ou anaeróbico. (Camarero A.M.I. 2020) (Durchschein K *et al* 2013)

Da mesma forma, vários estudos mostraram que células envolvidas na infecção e inflamação, especialmente neutrófilos e a família monócitos/macrófagos, podem expressar altos níveis de transportadores de glicose, especialmente GLUT1 e GLUT3, e atividade de hexoquinase (Mortimer JE *et al* 2001), (Fukuzumi M *et al* 1998). Portanto, o melhor consumo de glicose e a posterior absorção de [¹⁸F]FDG também pode ser resultado de uma reação de estresse das células afetadas em resposta ao dano celular (Martínez. I *et al* 2013), como ocorre no caso de processos inflamatórios causada pelo *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas.

Deve-se levar em consideração que neste trabalho utilizaram-se dois inóculos de infecção, por tanto foram levados em conta dois grupos separadamente, tanto para o radiofármaco [¹⁸F]FDG quanto para o [¹⁸F]FMISO. Um primeiro grupo com 100 parasitas levando em consideração a fase aguda, indeterminada e crônica para as análises de biodistribuição, farmacocinética e de imagem. E o outro grupo com 1000 parasitas levando em consideração a fase aguda para a análise dos resultados de biodistribuição e farmacocinética.

Então em relação com os resultados de biodistribuição com [¹⁸F]FDG, pode-se observar, no grupo de camundongos infectados com 100 parasitas, um aumento estatisticamente significativo na atividade radioativa no coração e nos músculos, dos camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda, indeterminada e crônica em relação ao grupo controle de camundongos saudáveis, na Figura 21, os valores encontrados durante o período de estudo são relativamente maiores na fase aguda, e indeterminada, e vão decrescendo na fase crônica. Isso pode ser devido ao fato que o parasita *Trypanosoma cruzi* teve uma maior replicação na fase inicial da infecção, ou seja, entre 8 e 9 dias na fase aguda e entre 35 e 40 dias na fase indeterminada, causando aumento da inflamação e provocando os sintomas agudos da doença de Chagas no

modelo murino (Montes de Oca M. *et al* 2007, Duque D. *et al* 2021). Da mesma forma e comparativamente falando da biodistribuição da fase aguda com [¹⁸F]FDG em camundongos BALB/c de camundongos infectados com 1000 formas parasitárias (figura 22), apresentou valores elevados em todos os órgãos com maior destaque para pulmão, fígado, rim, baço, estômago, intestino grosso, pâncreas, músculo e bexiga, que obtiveram $p < 0,0001$. Portanto provavelmente a capacidade de detectar patologias, principalmente cardíacas na biodistribuição com [¹⁸F]FDG está intimamente relacionada aos aspectos de imunidade, inflamação, moléculas e receptores celulares (Gonçalves da Costa *et al.*, 2002); (Sanoja *et al.*, 2013) Así como la carga parasitaria (Silva A.C.O *et al* 2022).

No caso da fase crônica, os resultados obtidos nesta dissertação coincidem com a bibliografia, a qual indica que o camundongo C57Bl/6 é um modelo murino suscetível à infecção com a cepa Y altamente virulenta do *Trypanosoma cruzi*, mas parcialmente resistente à doença de Chagas, sendo capaz de controlar a replicação do parasita após sua infecção aguda, apresentando uma eliminação eficiente do parasita a partir do 17º dia de infecção e ativação das moléculas de inflamação a partir do 12º dia (Sanoja *et al* 2013) (Abrahamsohn IA *et al* 2000). Assim, por exemplo, após a publicação das investigações realizadas por Sanoja *et al* 2013 entre os modelos murinos BALB/c e C57BL/6, indica que este modelo murino apresentou uma inflamação muito maior do que os camundongos BALB/c. Isso sugere que, embora a inflamação possa controlar a replicação do parasita, são aplicados mecanismos que de alguma forma controlam a infecção e a inflamação para evitar danos excessivos no organismo do hospedeiro (Sanoja *et al* 2013).

Para os resultados de biodistribuição de [¹⁸F]FMISO, os órgãos que obtiveram maior atividade radioativa na fase aguda com diferenças estatisticamente significantes foram: intestino grosso, intestino delgado, baço e músculo. Resultado semelhante também foi obtido na fase indeterminada, onde os órgãos com maior atividade do que na fase aguda foram, novamente, o intestino grosso, intestino delgado e bexiga. No entanto, no caso da fase crônica, apenas o intestino grosso apresentou diferença estatisticamente significativa, em relação ao controle, embora neste caso tenha sido reduzida e semelhante à fase aguda, como pode ser visto na Figura 23.

Em relação à revisão bibliográfica para o radiofármaco [¹⁸F]FMISO (Investigator's Brochure [¹⁸F] 2013 do fluoromisonidazol), os estudos indicam que ele é metabolizado pelo fígado e depois excretado pelo rim e pela bexiga. A atividade mais baixa é observada no sangue, baço, coração, pulmões, músculos, ossos e cérebro, todos esses aspectos são coincidentes com esta pesquisa (Xu Z, *et al* 2017), (Lee ST *et al* 2007).

Os estudos realizados com o [¹⁸F]FMISO, como o de Kilian *et al* 2016, confirmam que o radiofármaco possui afinidade fisiológica em modelos murinos para o trato

gastrointestinal (Thézé, B *et al* 2015) (Kilian *et al* 2016), porém é importante destacar que a imagem pode estar indicando a captação preferencial de acordo com o tropismo parasitário de forma aumentada e majoritária nos intestinos, uma vez que os parasitas se acumulam preferencialmente no trato gastrointestinal. Embora também deva ser levado em consideração que a cepa Y selecionada causa problemas principalmente digestivos de megaesôfago e megacólon, e também problemas cardíacos (Loeza *et al* 2020) (Rios Q.T. 2015).

As alterações farmacocinéticas parecem indicar, de acordo com os resultados obtidos nesta investigação, que os mecanismos de inflamação foram ativados após a infecção durante a fase aguda, mostrando de forma mais acentuada a distribuição e vida média do cada radiofármaco [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]FMISO durante a fase indeterminada principalmente. Posteriormente, os valores diminuem na fase crônica, devido a características da linhagem C57BL/6, já que doença pode-se controlar para níveis semelhantes ao estado saudável (Sanoja *et al* 2013) (Abrahamsohn IA 2000).

Finalmente em relação às imagens obtidas, em primeiro lugar vamos analisar o radiofármaco [¹⁸F]FDG, onde foi evidenciada uma atividade aumentada no coração e bexiga em todas as fases estudadas, aguda indeterminada e crônica (Figura 30, 31, e 32). A bibliografia encontrada a esse respeito indica que o radiofármaco [¹⁸F]FDG apresenta metabolismo habitual preferencial no cérebro, coração e trato urinário; sendo issos os locais mais proeminentes de acúmulo do radiofármaco, após administração intravenosa (Roldán E. 2008). Portanto, o [¹⁸F]FDG representa outro radiofármaco potencialmente útil no contexto de infecção e inflamação da doença de Chagas. Dessa forma, alguns artigos como o de Flávio C. *et al* 2009, Salimy, M *et al.* 2017; Garg G. *et al* 2015, que demonstraram através do uso de [¹⁸F]FDG diferentes alterações em pacientes infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, sendo a mais comum a perfusão miocárdica, causando aumento do tamanho do tecido. Correlacionando os achados observados com a deterioração da função cardíaca que ocorre na cardiomiopatia chagásica em pacientes humanos.

Em relação às imagens obtidas pelo radiofármaco [¹⁸F]FMISO, tanto na fase aguda, indeterminada e crônica da infecção chagásica, observa-se captação predominantemente no intestino e bexiga, da mesma forma que o camundongo do grupo controle. As imagens coincidem com a bibliografia, que indica que o radiofármaco tem afinidade fisiológica pelo trato gastrointestinal, embora por outro lado a cepa γ também possa contribuir para essa localização, pois tem histotropismo para esses tecidos, podendo causar síndromes de megaesôfago e megacólon, até problemas cardíacos. Kilian *et al* 2016, (Loeza *et al* 2020), (Miles M.A. 1981) (Rios Q.T *et al.* 2015).

Pode-se notar também que na fase crônica há uma diminuição notável da atividade, principalmente nos intestinos uma vez que um vestígio dele pode ser percebido. Isso pode ser devido a vários aspectos, entre eles, que a linhagem do modelo murino utilizado consegue resolver a infecção a limites despercebidos, os aspectos da dieta e manipulação do modelo animal, bem como aspectos técnicos na dispensação do material radioativo, pois em todos os casos foi utilizado um único camundongo como imagem representativa para cada fase, no caso dos dois radiofarmacos.

No caso de camundongos C57/bl6, o artigo de Ferreira et al 2018 indica que a persistência de parasitas na fase crônica, nos órgãos não está relacionada precisamente à resposta inflamatória, pois o modelo murino poderia controlar infecção e inflamação ao longo do tempo. Esse aspecto também é descrito por (Lewis et al., 2014). Que descreveram seus achados em camundongos infectados com CL Brener desenvolvendo fibrose cardíaca e miocardite, até sem a presença de parasitas no coração. Assim, apesar do desenvolvimento de uma resposta imune específica que permite o controle da infecção aguda, O *Trypanosoma cruzi* não é completamente eliminado, pois permanece um pequeno número de parasitas, o que leva a infecção a um estado crônico (Dias JC et al 2008) (Nogueira N et al 1976). Da mesma forma que os antígenos residuais do parasita, retidos nos tecidos que atuam como estímulo para a reação inflamatória persistente (Andrade, S. 1985) (Ben Younes-C. et al, A., 1988).

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estudado de que forma os radiofármacos [^{18}F]FDG (marcador de inflamação) e o [^{18}F]FMISO (um marcador de hipóxia) poderiam contribuir no diagnóstico através de PET do curso de desenvolvimento da doença de Chagas desde a fase aguda até à fase crônica da doença.

Os nossos resultados mostraram que, *in vitro*, o parasita *T. cruzi* não capta [^{18}F]FDG, apresentando no entanto uma captação pronunciada do radiofármaco [^{18}F]FMISO.

Através de estudos de biodistribuição e imagem PET, na fase aguda da doença, foi possível observar uma maior captação no coração e músculo utilizando o radiofármaco [^{18}F]FDG e, nos intestinos e músculo, utilizando o [^{18}F]FMISO, em camundongos infectados quando comparados aos camundongos saudáveis.

Com a progressão da doença (fase intermediária e crônica), verificamos uma maior captação do [^{18}F]FDG no coração, músculo e estômago e uma maior captação do [^{18}F]FMISO nos intestinos dos animais infectados em comparação com os animais saudáveis. Além disso, foi possível verificar que tanto o [^{18}F]FDG quanto o [^{18}F]FMISO apresentam uma taxa de eliminação dos tecidos mais lenta nos animais infectados (em qualquer fase da doença) quando comparado com os animais não infectados, sugerindo uma maior retenção dos tecidos.

Apesar dos radiofármacos utilizados neste trabalho terem demonstrado um aumento de captação nos locais de inflamação e infecção nos animais infectados com *T. cruzi* em comparação com animais saudáveis, não foi possível obter uma imagem diagnóstica de alto contraste devido à captação intrínseca do [^{18}F]FDG no coração e, da via de excreção do [^{18}F]FMISO passar pelo intestino, limitando a utilização desses dois traçadores na PET diagnóstica da doença de Chagas. No entanto, foi possível demonstrar a importância da ferramenta PET como ferramenta diagnóstica da doença de Chagas abrindo portas para estudos com outros radiofármacos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABRAHAMSOHN IA, DA SILVA AP, COFFMAN RL. Efectos de la privación y tratamiento de interleucina-4 sobre la resistencia a *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* v.68, p.1975–1979, 2000.
 - 2 ABX. Mannose Triflate, ultra pure Precursor for [¹⁸F]FDG (2-[¹⁸F]Fluoro-2-deoxy-D-glucose). Product No. 100 Chemecal Grade Quality. Disponível em: <https://www.abx.de/Product/Index/100>. **Brochure ABX**. Acesso em: 19 de junho 2021
 - 3 ABX 2-[¹⁸F]- fluoro -2- deoxy-D-glucose (ABX→ K-155TM) , Instructions for the synthesis using the GE TRACERlab[®] MX_{FDG} ORA Neptis[®] or the Siemens Explora[™] One synthesizer. ABX. **Advanced biochemical compounds**. PI P 124/06, 22.04.2015
 - 4 ABX. ¹⁸F Fluoromisonidazole, Instructions for the synthesis of ¹⁸F Fluoromisonidazole using the GE TRACERlab[®] MX_{FDG} ORA Neptis[®] or the Siemens Explora[™] One synthesizer. ABX. **Advanced biochemical compounds**. V.2.0, 19.11.2013.
 - 5 ALMEIDA I. C. AND GAZZINELLI R. T., “Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses,” *Journal of Leukocyte Biology*, v. 70, n. 4, p. 467–477, 2001.
 - 6 ALMEIDA I. C., CAMARGO M. M., PROCÓPIO D. O. et al., “Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents,” *The EMBO Journal*, v. 19, n. 7, p. 1476–1485, 2000.
- ALVARIZA S., BENTANCUR C., EIRALDI R., FAGIOLINO P. Guía de Farmacocinética. Departamento de Ciencias Farmacéuticas Facultad de Química Universidad de la República. https://www.cse.udelar.edu.uy/wp-content/uploads/2017/11/001_CSE_alvariza_eiraldi_bentancur_fagiolino-1.pdf. ISBN: 978-9974-0-0659-1 v. 1, p. 1-14, 2010,
- 7 ANDRADE SG, MAGALHÃES JB, PONTES AL. Evaluation of chemotherapy with benzimidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 63, n.4, p.721–72, 1985
 - 8 APT, W.; ZULANTAY, I. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev. Med. Chil*. v.139, p. 247-257, 2011.
 - 9 APT W, HEITMANN I, JERCIC MI, JOFRÉ L, MUÑOZ P, NOEMÍ I, ET AL. Guías clínicas de la Enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev Chil Infect*, v. 25 p.189-93. 2008

- 10 ARCE F. M., GONZÁLEZ V.M. C., RODRÍGUEZ M. O., GRAULLERA R. V., ARANDA F. A., REYES P. A., CARABARIN L.A., ROSALES E. J. L. (2018). Recombinant Enolase of *Trypanosoma cruzi* as a Novel Vaccine Candidate against Chagas Disease in a Mouse Model of Acute Infection. ***Journal of immunology research***, 8964085. <https://doi.org/10.1155/2018/8964085>. v. 2018
- 11 ARGOLO A.M.; FELIX M.; PACHECO R.; COSTA J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil / Chagas disease and its main vectors in Brazil Rio de Janeiro; Fundação Oswaldo Cruz. Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro; mapas, ilus. Monografia em Espanhol, Português, LILACS, ID: lil-690417, , Localização: BR408.1; CD616.9363, D651, ***Biblioteca virtual em saúde BVS*** BR408.1. v. 63. 2008.
- 12 ÁVILA R. M. A, ALVA S. H. Radiofármacos para PET, una nueva perspectiva de la medicina nuclear molecular en México. Unidad PET, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. ***Rev. Medigraphic Org. Mx***, v. 5, n. 3, p: 103-110, 2010
- 13 AVRIL N. GLUT1 expression in tissue and (18)F-FDG uptake. ***J Nucl Med***. PMID: 15181126. v.45, n. 6, p. 930-2, 2004.
- 14 BARRETT MP, KYLE DE, SIBLEY LD, RADKE JB, TARLETON RL. Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. DOI: 10.1038/s41579-019-0238-x ***Nat Rev Microbiol*** v. 17 p. 607–620, 2019.
- 15 BAYER-SANTOS E., AGUILAR-BONAVIDES C., RODRIGUES S. P. et al., “Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins,” ***Journal of Proteome Research***, v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013.
- 16 BEN YOUNES C., HONTEBEYRIE J. A., M., TRICOTTET V., EISEN H., REYNES M., SAID G.. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. Transactions of the Royal Society of ***Tropical Medicine and Hygiene*** . v. 82, p.77–83. 1988.
- 17 BICHER BJ, WEHRL HF, JUDENHOFER MS. Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation. ***J Nucl Med*** v.49, p. 5S-23S, 2008

- 18 BOSSENO MF, ESPINOZA B, SÁNCHEZ B, BRENIÈRE SF. Mexican *Trypanosoma cruzi* Stocks: Analysis of Minicircle kDNA Homologies by Cross-hybridization. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v. 95, n. 4, p: 473–76. 2000
- 19 BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual review of microbiology** v. 27, p. 347-382, 1973
- 20 BRENIERE, S. F., BOSSENO, M. F., TELLERIA, J., CARRASCO, R., VARGAS, F., YAKSIC, N., & NOIREAU, F. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.179>, **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n.2, p. 179–184. (1995).
- 21 BREZDEN CB, MCCLELLAND RA AND RAUTH AM. Mechanism of the selective hypoxic cytotoxicity of 1-methyl-2-nitroimidazole. **Biochem Pharmacol**, v. 48, p. 361–370, 1994.
- 22 BREZDEN, C.B.; HORN, L.; MCCLELLAND, R.A.; RAUTH, A.M. Oxidative stress and 1-methyl-2-nitroimidazol cytotoxicity. **Biochem. Pharmacol.** v. 56 p. 335–344, 1998.
- 23 BRINGAUD F, BARRETT MP, ZILBERSTEIN D. Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front Biosci (Landmark Ed)*; v.17.p.349-74. 2012.
- 24 BRINGAUD F, RIVIERE L, COUSTOU V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbón sources. *Mol Biochem Parasitol* v.149, p.1-9. 2006.
- 25 BUCHANAN-KILBEY G, DJUMPAH J, PAPADOPOULOU MV, BLOOMER W, HU L, WILKINSON SR , ET AL. Evaluating the developmental toxicity of trypanocidal nitroaromatic compounds on zebrafish. doi: 10.1016/j.actatropica.013.07.022. **Acta Trop.**; v. 128, n. 3, p-701-705, 2013.
- 26 CAMARERO ALONSO M.I. Fármacos que contienen el grupo nitro: Antiparasitarios. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 2020. Disponível em: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA%20ISABEL%20CAMARERO%20ALONSO.pdf> Acesso: 23 de janeiro 2022
- 27 CAMPOS M. A. S., ALMEIDA I. C., TAKEUCHI O. et al., “Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite,” **Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 416–423, 2001.
- 28 CDC Enfermedad de Chagas 2012. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/cme/chagas/lesson_2/ Acesso em 11 de junho 2022

- 29 CDC Enfermedad de chagas 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/enfermedad.html> Acesso em: 11 de junho 2022.
- 30 CESTARI I., ANSA-ADDO E., DEOLINDO P., INAL J. M., AND RAMIREZ M. I., Trypanosoma cruzi immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles, *Journal of Immunology*, v. 188, n. 4, p. 1942–1952, 2012.
- 31 CHAPMAN JD, FRANKO AJ, SHARPLIN J. A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *Br J Cancer*.; v.43 p. 546-550. 1981
- 32 CHITNENI, S. K., PALMER, G. M., ZALUTSKY, M. R., & DEWHIRST, M. W. Molecular imaging of hypoxia. *Journal of nuclear medicine : official publication*, <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.075663> *Society of Nuclear Medicine*, v.52, n.2, p. 165–168. 2011.
- 33 COLMENTER R. L F. NOBOA J. A.P., RAMOS O., AGUIRRE J. M., ZUNIGA S., HARO E., LUPERA H.. Importancia del 18F-FDG PET/CT en patología no neoplásicas Role of PET/CT with 18F-FDG in non-neoplastic pathology. *Federación Ecuatoriana de Radiología e Imagen*. v.11, n. 1, 2018.
- 34 CONTI, M., & ERIKSSON, L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion. <https://doi.org/10.1186/s40658-016-0144-5>. *EJNMMI physics*, v. 3, n.1, p.8, 2016
- CUNHA JOHN.; D.O. FACOEP 2022, Radiopharmaceuticals, Fludeoxyglucose F 18 Injection Disponível em: <https://www.rxlist.com/fludeoxyglucose-drug.htm#description> Acesso em: 18 de dezembro 2021
- 35 CUNHA-NETO, E., TEIXEIRA, P. C., NOGUEIRA, L. G., & KALIL, J. Autoimmunity. Advances in parasitology, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00006-2>. *El sevier* v.76, p. 129–152, 2011
- 36 DIAS JC, DIAS E, MARTINS-FILHO OA, VITELLI-AVELAR D, CORREIA D, LAGES E, PRATA A. Más evidencia de cura espontánea en la enfermedad de Chagas humana. *Rev.Soc. Sujetadores. Medicina. trop.* v.41, p. 505–506. 2008
- 37 DÍAZ CA, OLEA CA, ZAPATA GA, LAPIER M, MURA F, AGUILERA B, et al. Biological and chemical study of fused tri- and tetracyclic indazoles and analogues with important

- antiparasitic activity. doi: 10.1016/j.saa.2012.04.076. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.**;v.95, p.670-8. 2012
- DIMEN Medicina nuclear, PET/CT 18F-FDG 2010. Disponível em: <https://www.dimen.com.br/pet-ct/pet-ct-18fdg/> Acesso em: 13 de junho 2022
- 38 DNDi, Enfermedades y proyectos, Enfermedad de Chagas 2022: Disponível em: <https://www.dndial.org/es/enfermedades/enfermedad-chagas/>. Acesso em: 11 de junio 2022.
- 39 DOEPNER ANDREAS M. Synthesising nucleoside analogues for imaging proliferation in cancer and other biomedical applications. Tese grau PhD. Department of Surgery and Cancer Imperial College London South Kensington Campus London SW7 2AZ United Kingdom. September. 2013. Disponível em: <https://spiral.imperial.ac.uk/bitstream/10044/1/24818/1/Doepner-AM-2014-PhD-Thesis.pdf>. Acesso em: 11 de março 2022
- 40 DUQUE M. D., OSPINA R. J. P. Enfermedad de Chagas y sus manifestaciones neurológicas. <https://doi.org/10.22379/24224022348>. **Acta Neurol Colomb.** v.37, n.1, p. 154-162. 2021
- 41 DURCHSCHEIN K, HALL M, FABER K. Unusual reactions mediated by FMN-dependent ene- and nitro-reductases. **Green Chemistry.** v.15, n.7, p.1764-72. 2013
- 42 European Pharmacopeia. European Directorate for the Quality of the medicine. v.9th ed. Spain; p. 1135-37, 2019.
- 43 FERGUSON M. A. J., “The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research,” **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 17, p. 2799–2809, 1999.
- 44 FERREIRA BL, FERREIRA ÉR, DE BRITO MV, SALU BR, OLIVA MLV, MORTARA RA, ORIKAZA CM. BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to *Trypanosoma cruzi* Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. doi: 10.3389/fmicb.2018.00553. PMID: 29662478; PMCID: PMC5890190. **Front Microbiol.** v. 26; n. 9, p.553, 2018
- 45 FERREIRA-FILHO, J. C. R., BRAZ, L. M. A., ANDRINO, M. L. A., YAMAMOTO, L., KANASHIRO, E. H. Y., DA SILVA, A. M. G., KANUNFRE, K. A., & OKAY, T. S. A sensitive and reliable quantitative immunohistochemistry technique to evaluate the percentage of *Trypanosoma cruzi*-infected tissue area. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102210> **Parasitology international**, 102210 v. 80. 2021

- 46 FISHER RA, GOLLAN B, HELAINE S. Persistent bacterial infections and persister cells. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.42. **Nat Rev Microbiol** , v. 15, p. 453–464, 2017.
- 47 FLÁVIO C. H., THIAGO F. L., BENEDITO C. M., JOSÉ A. M. N., MARCUS V. S., Changes in Myocardial Perfusion Correlate with Deterioration of Left Ventricular Systolic Function in Chronic Chagas' Cardiomyopathy, ISSN 1936-878X.2009. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2008.09.012>. **Journals of the American College of Cardiology JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 2, n. 2, p. 164-172. 2009
- 48 FUKUZUMI M, SHINOMIYA H, SHIMIZU Y, OHISHI K, UTSUMI S. Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1. **Infect Immun.**;v.64, n. 10, p.108– 112. 1996
- 49 GARCÍA, A. Variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* y estudio epidemiológico molecular de clones involucrados en la infección transplacentaria Chile. **Intra. Med.** v.2, p.1-6. 2011
- 50 GARG, G., COHEN, S., NECHES, R., & TRAVIN, M. I. Cardiac (18)F-FDG uptake in chagas disease. *Journal of nuclear cardiology: official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, v.23,, n.2, p.321–325. 2016. <https://doi.org/10.1007/s12350-015-0218-0>
- 51 GERHARD F., GIANCARLO S., ANDREA B., STEFAN G. Role of 18FDG PET/CT in non-malignant diseases **Rev Chil Radiol** v. 23, n.3, p.116-129. 2017
- 52 GOLDENBERG S, AVILA AR. Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. **Adv Parasitol**; v.75, p.285-305. 2011.
- 53 GOLLAN, B., GRABE, G., MICHAUX, C., & HELAINE, S. Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115650>. **Annual review of microbiology**, v. 73, p. 359–385. 2019
- 54 GONÇALVES DA COSTA, S. C., CALABRESE, K. S., ZAVERUCHA DO VALLE, T., & LAGRANGE, P. H. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. <https://doi.org/10.14670/HH-17.837>. **Histology and histopathology**, v.17,n.3, p.837–844. 2002

- 55 GONCALVES M.F , UMEZAWA E. S., KATZIN A. M. et al., “*Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles,” **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 43–53, 1991.
- 56 GRAMBHIR, S. S. J. La Radioquímica del [18F]-FDG **Nucl. Med.**, 42, 1S-93S (2001).
- 57 GRATEROL D., ARTEAGA R.Y., CASTILLO A., DÍAZ G., MUNDARAY O., PINEDA W., NAVARRO M.C., DOMÍNGUEZ M.I., DE LIMA A.R., CONTRERAS V.T. Cambios morfológicos, proteicos, glicoproteicos y antigénicos de *Trypanosoma cruzi* cultivado en medio axénico con tensiones de oxígeno diferentes. **Rev. Salus**. v.17, n.1,p.02-13. 2013
- 58 GUNJAN G., STUART C., RICHARD N., MARK I. T., Cardiac 18F-FDG. Uptake in chagas disease. doi:10.1007/s12350-015-0218-0. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12350-015-0218-0.pdf>. **American Society of Nuclear Cardiology**. J Nucl Cardiol; v. 23, p. 321–325. 2016
- 59 GUTIERREZ, F. R., GUEDES, P. M., GAZZINELLI, R. T., & SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x>. **Parasite immunology**, v.31. n.11, p. 673–685. 2009
- 60 HARO E. Utilidad del 18F FDG/PET/CT en Oncología. Instituto Oncológico Nacional, Sociedad de Lucha contra el Cáncer, matriz Guayaquil, Ecuador. ION SOLCA 2009. Disponible em: <https://roe-solca.ec/index.php/johs/article/view/438>. Acceso em: 29 de julho 2022
- 61 HARO P., MONTIEL N.H., LÓPEZ B. X., ROSADO-V. M., GILBERTO LÓPEZ V. G., WALECKX E. Aplicaciones y potencial de las técnicas de diagnóstico por imagen en la investigación biomédica de la enfermedad de Chagas. <http://revistabiomedica.mx> <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v32i1.786>. **Revista Biomédica**, v.32, n. 17. 2021.
- 62 INSPECTION GUIDE ON GOOD CLINICAL PRACTICES (GCP) on clinical trials with medicines and biological products - Inspection in Sponsors and Clinical Research Organizations (CRO) Guide v. 1.No. 36.2020
- KEATING S. M., DENG X., FERNANDES F., CUNHA-NETO E., RIBEIRO A. L., ADESINA B., et al.. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. 10.1016/j.ijcard.2015.07.040. **Int. J. Cardiol**. N.199, p. 451–459. 2015

- 63 Investigator's Brochure [18F] fluoromisonidazole, 1H-1-(3-[18F]-fluoro-2-hydroxy-propyl)-2-nitro-imidazole, [18F]FMISO. IB Edition Number: 5 IB Edition Date/Release Date: February 5, 2013. Disponível em https://imaging.cancer.gov/programs_resources/cancer-tracer-synthesis-resources/docs/FMISO_IB_2013_PDF.pdf . Acesso em: 10 de novembro 2021
- 64 JACOBSON, O.; KIESEWETTER, D. O.; CHEN, X. Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconjugate Chemistry*, www.periodicos.capes.gov.br. v. 26, n. 1, p. 1-18, 2015.
- 65 JIANG, L., TU, Y., SHI, H., & CHENG, Z. PET probes beyond (18)F-FDG. <https://doi.org/10.7555/JBR.28.20130196>. *Journal of biomedical research*, v.28, n. (6), p.435–446. 2014.
- 66 KAWADA K, IWAMOTO M, SAKAI Y. Mechanisms underlying ¹⁸F-fluorodeoxyglucose accumulation in colorectal cancer. doi: 10.4329/wjr.v8.i11.880. PMID: 27928469; PMCID: PMC5120247. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5120247/> . *World J Radiol.* Nov 28;v. 8, n.11, p. 880-886. 2016
- 67 KAWAI, N., MIYAKE, K., YAMAMOTO, Y., NISHIYAMA, Y., & TAMIYA, T.. 18F-FDG PET in the diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma. <https://doi.org/10.1155/2013/247152>. *BioMed research international*, v. 247152. 2013
- 68 KEENAN, M., & CHAPLIN, J. H. A new era for chagas disease drug discovery?. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2014.12.001>. *Progress in medicinal chemistry*, v. 54, p. 185–230. 2015.
- 69 KILIAN, KRZYSZTOF, ROGULSKI, ZBIGNIEW, CHEDA, LUKASZ, DRZAL, AGNIESZKA, GERSZEWSKA, MARINA, CUDNY, MICHAL Y ELAS, MARTYNA. "Imaging of hypoxia in small animals with 18F fluoromisonidasole", <https://doi.org/10.1515/nuka-2016-0037>. *Nukleonika*. v.61, n.2. p. 219-223. 2016.
- 70 KOBAYASHI K, BHARGAVA P, RAJA S, NASSERI F, AL-BALAS HA, SMITH DD, GEORGE SP, VIJ MS. Image-guided biopsy: what the interventional radiologist needs to know about PET/CT.doi: 10.1148/rg.325115159. PMID: 22977031. *Radiographics*. v.32, n.5, p.1483-501. 2012
- KOBAYASHI, H., HIRATA, K., YAMAGUCHI, S., TERASAKA, S., SHIGA, T., & HOUKIN, K.. Usefulness of FMISO-PET for glioma analysis. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra2013-0256>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4508718/>. *Neurologia medico-chirurgica*, v.53, n.11, p.773–778. 2013.

- 71 KOCHER, D.C. "Radioactive Decay Tables" DOE/TIC- p.11026, 89 .1981.
- 72 KRISHNAN A, KLOEHN J, LUNGHI M, CHIAPPINO P. A, WALDMAN BS, NICOLAS D, VAREGIO E, HEHL A, LOURIDO S, HATZIMANIKATIS V, SOLDATI-FAVRE D. Functional and computational genomics reveal unprecedented flexibility in stage-specific *Toxoplasma* metabolism. DOI: 10.1016/j.chom.2020.01.002. **Cell Host Microbe** v. 27 p.290–306. 2020.
- 73 KUBOTA R, YAMADA S, KUBOTA K, ISHIWATA K, TAMAHASHI N, IDO T. Distribución intratumoral de flúor-18-fluorodesoxiglucosa in vivo: alta acumulación en macrófagos y tejidos de granulación estudiados por microautoradiografía. *J Nucl Med*; 33:1972 -1980. 1992
- 74 LEE ST, SCOTT AM. Imágenes de tomografía por emisión de positrones de hipoxia con 18f-fluoromisonidazol. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.07.001>. 2007. PMID: 17920352. **Semin Nucl Med**. v.37 p:451–61. 2007
- 75 LEMES. M., DA SILVA L. H., OLIVEIRA L., MENDES T., SANTOS S., NUNES P, ALKMIM S., Distribuição geográfica de DTU`s do trypanosoma cruzi isolado de infecções humanas no brasil: revisão sistemática / geographical distribution of dtus from trypanosoma cruzi isolated from human infections in brazil: systematic review. DOI:10.34117/bjdv8n2-324. Brazilian journal of development ISSN: 2525-876113334 **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.8, n.2, p.13334-13348. 2022
- 76 LOAEZA R K.J.; MORENO R. A., TORRES R.R., ARGUETA F.L., (2020). Marcadores glicobiológicos en la clasificación de las cepas de Trypanosoma cruzi. Publicado Abril 2020. Publicado en **Research gate**. https://www.researchgate.net/publication/343921655_Marcadores_glicobiologicos_en_la_clasificacion_de_las_cepas_de_Trypanosoma_cruzi
- 77 LÓPEZ D. F. A., & DruckerColín, R. (2004). La radioquímica de la [18-F]-FDG:la primera experiencia en México . ISSN: 1405-888X. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43270203>. Tip Rev. Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, v.7, n. 2, p.76-82. 2004
- 78 LÓPEZ DA, MEJÍAS L. Estudio PET/CT con F18-Fluorodesoxiglucosa en oncología: una herramienta eficaz para una indicación responsable. **Rev Acta Médica**. v.18, n. 2. 2017.

- 79 LÓPEZ DF, Flores MA., Zárata MA Romo E. Radioquímica PET: Síntesis de 2-[18F]-flúor-2-desoxi-D-glucosa. Unidad PET–Ciclotrón, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., CP 04510. 2001. Disponível em: <https://www.osti.gov/etdeweb/servlets/purl/20913144>. Acesso em: 12 de abril 2022
- 80 MACEDO A.M., MACHADO C.R., OLIVEIRA R.P., PENA S.D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. doi: 10.1590/s0074-02762004000100001. Epub 2004 Mar 31. PMID: 15057339. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, p.1–12, 2004.
- 81 MÄDING P., FÜCHTNER F., ZESSIN J. , WÜST F. Preparation of the Hypoxia-Tracer [18F]FMISO for Medical Use Annual Report 2005 Institute of Radiopharmacy Editor: Prof. Dr. J. Steinbach Editorial staff: Dr. S. Seifert Wissenschaftlich-Technische Berichte. <https://www.hzdr.de/publications/PublDoc-1043.pdf>. FZR-449 2006 ISSN 1437-322X. **Forchungszentrum Rosendorf**. 2006
- 82 MALDONADO, E., ROJAS, D. A., MORALES, S., MIRALLES, V., & SOLARI, A. Dual and Opposite Roles of Reactive Oxygen Species (ROS) in Chagas Disease: Beneficial on the Pathogen and Harmful on the Host. <https://doi.org/10.1155/2020/8867701>. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 8867701. 2020.
- 83 MANN, G. S., FRANCISCO, A. F., JAYAWARDHANA, S., TAYLOR, M. C., LEWIS, M. D., OLMO, F., DE FREITAS, E. O., LEORATTI, F. M. S., LÓPEZ-CAMACHO, C., REYES-SANDOVAL, A., & KELLY, J. M. Drug-cured experimental *Trypanosoma cruzi* infections confer long-lasting and cross-strain protection. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007717>. **PLoS neglected tropical diseases**, v.14, n.4 p. e0007717. 2020.
- 84 MARCILI A, LIMA L, CAVAZZANA M, JUNQUEIRA ACV, VELUDO HH, MAIA DA SILVA F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. pmid:19368741. **Parasitology**; v. 136, n. 6, p.641–655. 2009
- 85 MARTÍNEZ. I, CARRIL JM. Actualización del uso de radiotrazadores PET en patología inflamatoria. **Rev Esp Medd Nucl Imagen Mol**.;v. 32, p.378-86. 2013
- 86 MASAKI Y, SHIMIZU Y, YOSHIOKA T, TANAKA Y, NISHIJIMA K, ZHAO S, HIGASHINO K, SAKAMOTO S, NUMATA Y, YAMAGUCHI Y, TAMAKI N, KUGE Y. The accumulation mechanism of the hypoxia imaging probe "FMISO" by imaging mass spectrometry: possible involvement of low-molecular metabolites. pmid 16802 doi: 10.1038/srep16802. PMID:

26582591; PMID: PMC4652161. <https://www.nature.com/articles/srep16802/figures/1>.
Scientific Reports - Nature. v. 19;n. 5, 2015.

MATEUS, J., GUERRERO, P., LASSO, P., CUERVO, C., GONZÁLEZ, J. M., PUERTA, C. J., & CUÉLLAR, A. An Animal Model of Acute and Chronic Chagas Disease With the Reticulotropic Y Strain of *Trypanosoma cruzi* That Depicts the Multifunctionality and Dysfunctionality of T Cells. *Frontiers in immunology*, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00918>. v. 10, p.918. (2019)

- 87 MAUGERI DA, CANNATA JJ, CAZZULO JJ. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Essays Biochem* v.51, p.15-30. 2011
- 88 McClelland RA. Molecular interactions and biological effects of the products of reduction of nitroimidazoles. In: Adams GE, Breccia A, Fiedlen EN, and Wardoman P, eds. *NATO Advanced Research Workshop on Selective Activation of Drugs by Redox Processes*, **New York, NY: Plenum Press**, p.125-136. 1990.
- 89 MENDOZA I, MARQUES J. Enfermedad de Chagas. Evaluación clínica y manejo de la cardiopatía aguda y crónica. *Editorial Cardio Tropical*. Madrid, Spain: CTO Editorial; p. 25-32. 2015
- 90 MENEZES, J. C., VAZ, L. B., DE ABREU VIEIRA, P. M., DA SILVA FONSECA, K., CARNEIRO, C. M., & TAYLOR, J. G. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of diaryldiazepines. <https://doi.org/10.3390/molecules20010043>. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n.1, p 43–51. 2014
- 91 MESSENGER LA, MILES MA, BERN C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. pmid:26162928. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**; v.13,n.8,p.995–1029. 2015.
- 92 MILES, MA., PAVOA, MM, PRATA A, CEDILLOS R.A. DE SOUZA A.A. MACEDO V. “Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (Zimodemias) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas Disease”. **Lancet**. p.1,1338-1340, 1981
- 93 MINISTERIO DE SALUD BOLIVIA 2007. Manual Operativo Manual de normas técnicas y operativas para el tamizaje, Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas Cronica reciente infantil). Serie Documentos técnicos normativos. Depósito Legal: 4-1-287-07 P.O. R.M.: 0377. **Public. Min. Salud**. v. 31, p 1-99, 2007

- 94 MOCHIZUKIT, TSUKAMOTO E, KUGE Y, y col. Adición de FDG y expresiones del subtipo del transportador de glucosa en modelos experimentales de tumores e inflamación. **J Nucl Med** v.42, p.1551 -1555. 2001
- 95 MONTES DE OCA M., TORRES S., FINOL H. J, LOYO J.G., VÁSQUEZ F., HERNÁNDEZ N. et al . Alteraciones musculares periféricas en la enfermedad de Chagas.D.O.I http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-47622007000100006&lng=es. **Gac Méd Caracas**. v.115, n.1, p.55-61.2007.
- 96 MORTIMER JE, DEHDASHTI F, SIEGAL BA, et al. Metabolic flare: indicator of hormone responsiveness in advanced breast cancer. **J Clin Oncol**.;v. 19, p.2797–2803. 9. 2001
- 97 NEPALI K, LEE HY, LIOU JP. Nitro-Group-Containing Drugs. **J Med Chem.**; v.62, n. 6, p.2851-93. 2019
- 98 NIETO A. E. Síntesis y Estudio de Derivados de FMISO. Tese grau PhD . Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica. Universidad de Alcalá. Facultad de Química Alcalá de Henares, Mayo de 2013. Disponible em: https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/20352/TESIS_NIETO_ALONSO.pdf?sequence=1&isAllowed=y. <https://1library.co/article/m%C3%A9todos-s%C3%ADntesis-fmiso-anexo-trabajo-realizado-estancia.nq7meooq>. Acceso em: 10 de janeiro 2022
- 99 NITTP Precursor for [18F]FMISO ([18F]Fluoromisonidazole) Product No. 1404. Diponivel em: <https://www.abx.de/Product/Index/1400>. Acceso em: 19 de junho 2022
- 100 NOGUEIRA N, COHN Z. Trypanosoma cruzi: mecanismo de entrada y destino intracelular en células de mamíferos . **Exp. J. Medicina**. v.143, p.1402–1420. 1976.
- 101 NUNES, M. C. P., BEATON, A., ACQUATELLA, H., BERN, C., BOLGER, A. F., ECHEVERRÍA, L. E., DUTRA, W. O., GASCON, J., MORILLO, C. A., OLIVEIRA-FILHO, J., RIBEIRO, A. L. P., MARIN-NETO, J. A., & American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Stroke Council (2018). Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the **American Heart Association**. *Circulation* <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000599>, v. 138, n.12, p. e169–e209. 2018
- 102 NUNN A, LINDER K, STRAUSS HW. Nitroimidazoles and imaging hypoxia. **Eur J Nucl Med**.; v. 22, p.265-280, 1995.

- 103 OMS World Health Organization, Ginebra, Serie de informes técnicos 811. Control de la enfermedad de Chagas, ISBN 92 4 320811 X, ISSN 0509-2507. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38610/924320811_spa.pdf;jsessionid=0CDF8605E800366B2C09A734594244B4?sequence=1 **WHO Tech Rep Ser.**; v. 811, n. 1, p: 1-98, 1991.
- 104 OMS. La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) Detectar y notificar todos los casos para derrotar la enfermedad de Chagas 2022. Disponible em: <https://www.who.int/es/campaigns/world-chagas-disease-day/world-chagas-disease-day-2022> . Acesso em: 09 de junho 2022.
- 105 PADGETT, H. C., SCHMIDT, D. G., LUXEN, A., BIDA, G. T., SATYAMURPHY, N., BARRIO, J. R., "Computed-controlled Radiochemical Synthesis: A Chemistry Process Control Unit for the Automated Production of Radiochemicals", **Appl. Radiat. Isot.**, 40, 5, 433-445. 1989.
- 106 PAUWELS EK, RIBEIRO MJ, STOOT JH, MCCREADY VR, BOURGUIGNON M, Acumulación de Maziere B. FDG y biología tumoral. **Nucl Med Biol**; v.25, p.317 -322. 6. 1998
- 107 PÉREZ-MOLINA JA, MOLINA I. Chagas disease. doi: 10.1016/S0140- 6736(17)31612-4. **Lancet**. v. 6; n. 391(10115), p 82-94. 2018.
- 108 PHELPS ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v. 97, p: 9226-9233, 2000
- POVEDA C., FRESNO M., GIRONES N., MARTINS-FILHO O. A., RAMIREZ J. D., SANTI-ROCCA J., et al. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). 10.1371/journal.pone.0091154 . **PLoS One** v.9: n.e91154. 2014.
- 109 PREKEGES JL, RASEY JS, GRUNBAUM Z, KROHN KH. Reduction of fluoromisonidazole, a new imaging agent for hypoxia. **Biochem Pharmacol.**; v.42 n.12. p. 2387-2395. 1991
- 110 QUERALES, M., TORRES, J., GRATEROL, D., ARTEAGA, R., NAVARRO, M., CONTRERAS, V., PINEDA, W., & DE LIMA, A. R. Cambios metabólicos durante la epimastigogénesis in vitro de *Trypanosoma cruzi*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375933974003>. ISSN: 1316-7138. *Salus*, v. 17, n.3, p 8-16. 2013.

- 111 RAJENDRAN JG, KROHN KA. F-18 fluoromisonidazole for imaging tumor hypoxia: imaging the microenvironment for personalized cancer therapy. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2014.10.006. PMID: 25704387; PMCID: PMC4339212. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339212/>. **Semin Nucl Med**.;v. 45, n.2, p.151-62. 2015
- 112 RAMÍREZ JD, HERNÁNDEZ C, MONTILLA M, ZAMBRANO P, FLÓREZ AC, PARRA E, ET AL. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. pmid:25285940. **Zoonoses Public Health**; v. 61, n.7, p.477–479. 2014
- 113 RASEY JS, CASCIARI JJ, HOFSTRAND PD, MUZI M, GRAHAM MM, CHIN LK. Determinación de la fracción hipóxica en un glioma de rata mediante la captación de fluoromisonidazol radiomarcado. **Radiación Res.**; v.153, p. 84–92. 2000
- 114 RASSI A JR, RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas disease. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X. **Lancet**. v.17; n. 375(9723):p. 1388-402. 2010.
- REQUENA-MENDEZ A., LOPEZ M. C., ANGHEBEN A., IZQUIERDO L., RIBEIRO I., PINAZO M. J., ET AL. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. 10.1586/14787210.2013.824718. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** V.11, p. 957–976. 2013
- 115 RIAL S. M. Efecto de tratamientos antiparasitarios, con bajas dosis de Benznidazol y sus nuevas nanoformulaciones en la infección crónica murina por *Trypanosoma cruzi* Nicaragua y *T. cruzi* Sylvio-X-10/4” Tese grau PhD. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Instituto Nacional de Parasitología “Dr. M. Fatała Chaben”. ANLIS-Dr. Carlos G. Malbrán. Ministerio de Salud. 2018. Disponible em: http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsdli/collect/posgraafa/index/assoc/HWA_2963.dir/2963.PDF F. Acceso em: 14 de setembro 2021
- 116 RIBEIRO AR, LIMA L, DE ALMEIDA LA, MONTEIRO J, MORENO CJG, Nascimento JD, et al. Biological and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from four states of Brazil. pmid:29313485. **Am J Trop Med Hyg**; v. 98, n.2, p.453–463. 2018
- 117 RÍOS J. M. 30va Jornadas Nacionales Sobre Energía Y Educación. Foro Nuclear. Foro de la Industria Española. Aplicaciones en la fabricación de radiofármacos. Madrid, 13 de septiembre de 2013. Disponible em: https://rinconeducativo.org/contenidoextra/jornadas2013/ponencias2013_jmiguel-rios-mitchell.pdf. Acceso em: 20 de setembro 2022

- 118 RIOS Q.T. Caracterización molecular de cepas aisladas de *Trypanosoma cruzi* a partir de pacientes procedentes del primer brote oral y la asociación de la seroconversión port-tratamiento reportado en el municipio de Guayaramerin – Beni el año 2010. Tesis de maestría. Univesidad mayor de san Andrés, Universidad de Barcelona UB España. La Paz Bolivia 2015. Disponible em: <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/bitstream/handle/123456789/10462/TMT044.pdf?sequence=5> .Acesso em: 5 dezembro 2022
- 119 RODRIGUES DA CUNHA, G. M., AZEVEDO, M. A., NOGUEIRA, D. S., CLÍMACO, M. C., VALENCIA AYALA, E., JIMENEZ CHUNGA, J. A., LA VALLE, R. J. Y., DA CUNHA GALVÃO, L. M., CHIARI, E., BRITO, C. R. N., SOARES, R. P., NOGUEIRA, P. M., FUJIWARA, R. T., GAZZINELLI, R., HINCAPIE, R., CHAVES, C. S., OLIVEIRA, F. M. S., FINN, M. G., & MARQUES, A. F. α -Gal immunization positively impacts *Trypanosoma cruzi* colonization of heart tissue in a mouse model. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009613>. PLoS neglected tropical diseases v.15, n. 7, e0009613. 2021
- 120 RODRIGUES-DOS-SANTOS, Í., MELO, M. F., DE CASTRO, L., HASSLOCHER-MORENO, A. M., DO BRASIL, P. E. A. A., SILVESTRE DE SOUSA, A., BRITTO, C., & MOREIRA, O. C. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006939>. PLoS neglected tropical diseases, v. 12, n. 11, e0006939. 2018
- 121 RODRIGUEZ S. A. Establecimiento de Controles de Calidad para 18F FDG sintetizada por hidrólisis básica y evaluación de dosis de cristalinode POE de Radiofarmacia PET con EPD,OSL y TLD. Tese de Mestrado. FUESMEN Fundación Escuela de Medicina Nuclear, Instituto Balseiro, Universidad de Cuyo, CNEA Comisión Nacional de Energía Atómica. Argentina. Diciembre 2016. Disponible em: <https://1library.co/document/qm8jo28z-establecimiento-controles-calidad-sintetizada-hidrolisis-evaluacion-cristalino-radiofarmacia.html>. Acesso em: 4 setembro 2021
- 122 ROLDÁN E., VEGA G. I., VALDIVIESO C. G., RUMOROSO G. A., MORALES S. O., OSORIO C. L. Conceptos básicos del 18F-FDG PET/CT. Definición y variantes normales. Gac Méd Méx v. 144 n.2, 2008.
- 123 ROMÁN GC. The neurology of parasitic diseases and malaria. doi: 10.1212/01.CON.0000394678.13115.ad. **Continuum (Minneap Minn)**. v. 17, n.1, p.113-33. 2011

- 124 SAAVEDRA, M., ZULANTAY, I., APT, W. et al. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1664-5>. *Parasites Vectors* v. 9, n. 382. 2016.
- 125 SALIMY, M. S., PARWANI, P. J., MUKAI, K., PAMPALONI, M. H., & FLAVELL, R. R. (2017). Abnormal 18F-FDG and 82Rb PET Findings in Chagas Heart Disease. . <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001622>. **Wolters Kluwer Health Clinical nuclear medicine**, v. 42, n. 5, p. e265–e268. 2017
- 126 SANCHEZ-MORENO M, FERNANDEZ-BECERRA MC, CASTILLA- CALVENTE JJ, OSUNA A. Metabolic studies by 1H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by 'in vitro' culture. **FEMS Microbiol Lett.**; 133(1-2):119-125. 1995.
- 127 SANOJA, C., CARBAJOSA, S., FRESNO, M., & GIRONÈS, N. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065820>. *PLoS one*, v. 8, n.6, p. e65820. 2013.
- 128 SANTOS KK, MATIAS EF, TINTINO SR, SOUZA CE, BRAGA MF, GUEDES GM, ET AL. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. doi: 10.1016/j.exppara.2012.02.019. **Exp Parasitol.** v.131, n.1, p. 130-2; 2012
- 129 SEFH. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. PKGEN, GRUPO DE FARMACOCINÉTICA. Manual de rotación del residente por la Unidad de Farmacocinética Clínica. Pk gen. 2020. Disponível em: http://gruposedetrabajo.sefh.es/pkgen/images/Manual_FCC/Actividad_1_Volumenedistribucion.pdf. Acesso: 22 novembro 2021.
- 130 SHAH-SIMPSON S, LENTINI G, DUMOULIN PC, BURLEIGH BA. Modulation of host central carbon metabolism and in situ glucose uptake by intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. doi: 10.1371/journal.ppat.1006747. PMID: 29176805; PMCID: PMC5720825. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5720825/> 1006747. *PLoS Pathog* v. 27;n. 13, p.11. 2017
- 131 SILVA O.A.C. Caracterização biológica de tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de células deficientes em LAMP. Tese Mestrado. Programa de PósGraduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. Julho 2017. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/33742/4/Dissertac%CC%A7a%CC%83o_AnnyOliveira_versaofinal.pdf Acesso: 20 febrero 2022.

- 132 SILVA, A. C. O., BONFIM, M., FONTES, J. L. M., DOS-SANTOS, W. L. C., MENGEL, J., & CARDILLO, F. (2022). C57BL/6 Mice Pretreated With Alpha-Tocopherol Show a Better Outcome of *Trypanosoma cruzi* Infection With Less Tissue Inflammation and Fibrosis. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.833560>. *Frontiers in immunology*, v. 13, 833560. 2022.
- SOUSA G. R., GOMES J. A., FARES R. C., DAMASIO M. P., CHAVES A. T., FERREIRA K. S., et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. 10.1371/journal.pone.0087082. *PLoS One* v.9, p.e87082. 2014.
- 133 STURM NR, CAMPBELL DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. v. 115(1-2), n. 35-43. 2010.
- 134 SUDHAKARA R. S., JIYOON L., YOUNGJOO K., YUNSANG L. Y JAEMIN J. Biodistribution and PET imaging of [18F]FMISO in mouse colon cancer xenografted mice. *JRMP Journal of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes*, Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital v.1, n.2, p.137-144. 2015.
- 135 SUOLINNA EM, HAAPARANTA M, PAUL R, HÄRKÖNEN P, SOLIN O, SIPILÄ H. Metabolismo de 2-[18F]fluoro-2-desoxiglucosa en ratas portadoras de tumores: estudios cromatográficos y enzimáticos. *Int J Rad Appl Instrumento B*; v.13, n.5. p.577-81. 1986.
- TALVANI A., ROCHA M. O., BARCELOS L. S., GOMES Y. M., RIBEIRO A. L., TEIXEIRA M. M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. 10.1086/381892. *Clin. Infect. Dis.* v.38, p. 943–950. 2004
- 136 THÉZÉ, B., BERNARDS, N., BEYNEL, A., BOUET, S., KUHNAST, B., BUVAT, I., TAVITIAN, B., & BOISGARD, R. . Monitoring therapeutic efficacy of sunitinib using [18F]FDG and [18F]FMISO PET in an immunocompetent model of luminal B (HER2-positive)-type mammary carcinoma. *BMC Cancer*, v. 15, n.534, p.10. 2015
- 137 TIBAYRENC M, AYALA FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* v.18, n.9, p. 405-410. 2002.
- 138 TIBAYRENC M, AYALA FJ. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* v.7, n. 9, p. 228-232. 1991.

- 139 TORRECILHAS A.C., SCHUMACHER R. I., ALVES M. J.M., and COLLI W., "Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases," *Microbes and Infection*, v. 14, n. 15, p. 1465–1474, 2012.
- 140 TROCOLI TORRECILHAS A. C., TONELLI R. R., PAVANELLI W. R. et al., "*Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response," *Microbes and Infection*, v. 11, n. 1, p. 29–39, 2009.
- 141 TYLER KM, ENGMAN DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 5-6: p. 472-81. 2001
- 142 United States Pharmacopeial Convention. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 41-The National Formulary 36. 2017.
- 143 UTAH University of Utah. Huntsman Cancer institute 2000. Disponível em: <https://uofuhealth.utah.edu/huntsman/cqci/clinical-patient-imaging/information-for-patients.php> Acesso em: 16 de junio 2022
- UFL, University of Florida. Biofarmacia y farmacocinética. Modelo Biocompartimental 2008. *Nature search*. Tema 11 Pg. 1-19. Disponível em: <https://1library.co/document/zxxj984z-tema-11-modelo-bicompartimental-administracion-intravenosa-rapida.html>; <http://vam.anest.ufl.edu/simulations/secondorderstochasticsim2.html#sim>. Acesso em: 23 junio 2022
- 144 URBINA, JA. The phosphoenolpyruvate carboxiquinase of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas: molecular, kinetic and regulatory properties. *Arch Biochem Biophys*; v. 258:p.186-195. 1987.
- 145 VERDERA E. S., GOMEZ DE CASTIGLIA S., Figols de Barboza M. CONTROL DE CALIDAD DE RADIOFARMACOS. Comité de Radiofarmacia. Asociación Latinoamericana De Sociedades De Biología Y Medicina Nuclear 2011. Disponível em: https://sbmn.org.br/wp-content/uploads/2015/10/control_de_calidad_de_radiofarmacos.pdf. Acesso em: 19 de abril 2021
- VISIONI, A., & KIM, J. Positron emission tomography for benign and malignant disease. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.10.012>. *The Surgical clinics of North America*, v.91, n.1, p.249–266. 2011..

- 146 WARD, A. I., OLMO, F., ATHERTON, R. L., TAYLOR, M. C., & KELLY, J. M. Trypanosoma cruzi amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate. <https://doi.org/10.1098/rsob.200261>. **Open biology**, v. 10, n. 12, 200261. 2020.
- 147 WIEBE LI, STYPINSKI D. Pharmacokinetics of SPECT radiopharmaceuticals for imaging hypoxic tissues. **Q J Nucl Med.**; v.40, p.270-284. 1996.
- 148 XU, Z., LI, X. F., ZOU, H., SUN, X., & SHEN, B. 18F-Fluoromisonidazole in tumor hypoxia imaging. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21662> Oncotarget, v.8, n.55, p.94969–94979. 2017
- 149 ZINGALES B, ANDRADE SG, BRIONES MR, CAMPBELL DA, CHIARI E, FERNANDES O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. pmid:20027478. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.104, n. 7, p.1051–1054. 2009
- 150 ZINGALES B, MILES MA, CAMPBELL DA, TIBAYRENC M, MACEDO AM, TEIXEIRA MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. 2012 pmid:22226704. **Infection, Genetics and Evolution**; v. 12, n.2, p. 240–253. 2012.
- 151 ZINGALES B, MILES MA, MORAES CB, LUQUETTI A, GUHL F, SCHIJMAN AG, RIBEIRO I; Drugs for Neglected Disease Initiative; Chagas Clinical Research Platform Meeting. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. doi: 10.1590/0074-0276140156. Epub 2014 Aug 22. PMID: 25317712; PMCID: PMC4238778. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;v.109, n.6, p.828-33. 2014.
- 152 ZINGALES B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity.pmid:28941731. **Acta Tropica**; v.184, p. 38–52. 2018.
- ZURICH Z., LAZARO; CALDERÓN G., MARÍA T.;YAUQUIN M., HERMAN. Estudio cinético de ampicilina en equinos. Avances en Medicina Veterinaria, https://web.uchile.cl/vignette/avancesveterinaria/CDA/avan_vet_completa/0,1424,SCID%253D6243%2526ISID%253D297,00.html. Vol.1(1), Enero-junio 1986.
- 153 ZWEIFEL, M., MATOZAN, K., DAHINDEN, C., SCHAFFNER, T., & MOHACSI, P. Eotaxin/CCL11 levels correlate with myocardial fibrosis and mast cell density in native and

transplanted rat hearts. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.05.152>.
Transplantation proceedings, v. 42, n. 7, p. 2763–2766. 2010.

Tabela Anexa 1.

Biodistribuição *ex-vivo* do [¹⁸F]FDG em camundongos C57BL/6 saudáveis, e infectados com 100 formas de *T.cruzi* na fase aguda (9 dias após a infecção), indeterminada (35 dias após a infecção) crônica (90 dias após a infecção) da doença de Chagas. O radiofarmaco [¹⁸F]FDG foi injetado através da via intravenosa, com uma actividade de 5,55 MBq. Uma hora após a injeção, os animais foram eutanasiados e os órgãos de interesse foram recolhidos para pesagem, e contagem da atividade em um contador de poços gama. A tabela apresenta a media ± D.P da porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) de n=5 por grupo. A diferença entre a captação nos órgãos foi analisada usando o teste *t* de student não pareado (testes *t* múltiplos) onde **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001 e *****p*<0,0001.

Órgãos	[¹⁸ F]FDG							
	Animal saudável - Animal Infectado Fase aguda		Animal saudável - Animal Infectado Fase indeterminada		Animal saudável - Animal Infectado Fase crônica		Animal saudável - Animal Infectado Fase aguda 1000 parasitas	
	Média +/- DP	Valor p	Média +/- DP	Valor p	Média +/- DP	Valor p	Média +/- DP	Valor p
Sangue	0,2242 ± 0,947	0,3017	0,1500 ± 0,07743	0,1008	-0,3165±0,06602	0,0020	0,6475±0,07659	***0,0004
Coração	7,008 ± 2, 025	* 0,0105	7,458 ± 2,272	*0,0168	5,780± 2,377	0,0719	82,59±10,90	***0,0006
Pulmões	-0,67733 ± 0,3898	0,1447	-0,70125 ± 0,2931	0,0511	-0,6375±0,3376	0,1079	10,47±0,5673	**** <i>p</i> <0.0001
Fígado	0,08417 ± 0,1748	0,6505	0,09250 ± 0,1322	0,5102	-0,2650±0,1105	0,0534	11,80±0,3222	**** <i>p</i> <0.0001
Rins	-0,3967 ± 0,1537	0,0817	-0,4817±0,1581	*0,0286	-0,6687±0,06583	****<0,0001	5,080±0,3115	**** <i>p</i> <0.0001
Baço	-0,9100 ± 0,2338	0,0601	-1,483 ±0,2774	**0,0039	-0,3200±0,1889	0,1655	17,80±1,500	**** <i>p</i> <0.0001
Estômago	0,2767±0,2760	0,3621	0,4000 ±0,2105	0,1158	0,6900±0,2290	*0,0297	8,580±0,5933	**** <i>p</i> <0.0001
Intestino grosso	-0,2042±0,3264	0,5591	0,7742± 0,3356	0,0692	-0,3142 ±0,3193	0,3704	4,250±0,3563	**** <i>p</i> <0.0001
Intestino delgado	-0,2767±0,2646	0,2913	-0,4467 ± 0,2094	0,0861	0,1350±0,2077	0,5397	3,750±0,3742	*** <i>p</i> <0.0002
Pâncreas	-0,3000 ±0,1739	0,1595	-0,3425± 0,1604	0,0858	0,09000±0,1815	0,6460	3,883±0,2398	**** <i>p</i> <0.0001
Músculo	1,998 ± 0,1266	***0,0006	0,8400± 0,2558	*0,0304	0,9167±0,09141	***0,0006	3,203 ± 0,1716	**** <i>p</i> <0.0001
Cérebro	0,04500±0,6470	0,9509	-1,020±0,6189	0,1747	-0,3617±0,3460	0,3727	9,262±0,3339	*** <i>p</i> =0.0001
Bexiga	-3,129 ± 3,277	0,3834	-8,548 ± 2,799	*0,0224	-0,3025±3,477	0,9341	371,5±21,54	**** <i>p</i> <0.0001

Fonte: Autora da dissertação

Tabela Anexa 2.

Biodistribuição *ex-vivo* do [¹⁸F]FDG em camundongos C57BL/6 saudáveis, e infectados com 100 formas de *T.cruzi* na fase aguda (9 dias após a infecção), indeterminada (35 dias após a infecção) crônica (90 dias após a infecção) da doença de Chagas. O radiofarmaco [¹⁸F]FMISO foi injetado através da via intravenosa, com uma actividade de 11,1 MBq. Três horas após a injeção, os animais foram eutanasiados e os órgãos de interesse foram recolhidos para pesagem, e contagem da atividade em um contador de poços gama. A tabela apresenta a media ± D.P da porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) de n=5 por grupo. A diferença entre a captação nos órgãos foi analisada usando o teste *t* de student não pareado (testes *t* múltiplos) onde *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001.

Órgãos	[¹⁸ F]FMISO							
	Animal saudável - Animal Infectado Fase aguda		Animal saudável - Animal Infectado Fase indeterminada		Animal saudável - Animal Infectado Fase Crônica		Animal saudável - Animal Infectado Fase aguda 1000 parasitas	
	Média +/- DP	Valor p	Média +/- DP	Valor p	Média +/- DP	Valor p	Média +/- DP	Valor p
Sangue	-0,1200 ± 0,08844	0,2237	-0,2467 ± 0,06631	**0,00999	-0,4075 ± 0,05741	***0,0002	-0,1300 ± 0,08219	0,1648
Coração	0,01500 ± 0,07323	0,88445	-0,1050 ± 0,07402	0,2058	-0,1758 ± 0,7785	0,0735	0,1775 ± 0,08510	0,0914
Pulmões	0,1600 ± 0,1019	0,1772	-0,1050 ± 0,06131	0,1376	-0,1533 ± 0,09041	0,1507	0,1975 ± 0,06329	*0,0206
Fígado	0,06000 ± 0,1205	0,6396	-0,1950 ± 0,05827	*0,0204	0,006667 ± 0,07379	0,9324	0,3500 ± 0,05888	**0,0040
Rins	0,2342 ± 0,1266	0,1236	-0,1225 ± 0,1161	0,3395	-0,3525 ± 0,1126	*0,0259	-0,3325 ± 0,1184	*0,0376
Baço	0,1733 ± 0,02404	**0,0020	0,01000 ± 0,02582	0,7183	0,02667 ± 0,03127	0,4418	0,19600 ± 0,05744	*0,143
Estômago	-0,3650 ± 0,1642	0,0679	-0,4667 ± 0,1393	*0,0203	-0,5700 ± 0,1388	**0,0093	0,09333 ± 0,1411	0,5376
Intestino grosso	5,160 ± 0,8876	**0,0044	10,34 ± 0,6828	***0,0001	3,907 ± 1,157	*0,0432	7,363 ± 0,7285	***0,0005
Intestino delgado	0,5567 ± 0,1761	*0,0341	1,140 ± 0,1244	***0,0008	0,07000 ± 0,1230	0,5998	3,720 ± 0,8846	****p<0,0001
Pâncreas	-0,04250 ± 0,06369	0,5294	-0,07250 ± 0,05573	0,2410	0,03750 ± 0,06906	0,6104	0,3808 ± 0,1030	*0,0140
Músculo	0,38255 ± 0,1026	*0,0203	0,1575 ± 0,07484	0,1031	0,06417 ± 0,05930	0,3286	0,6875 ± 0,05824	****p<0,0001
Cérebro	-0,01250 ± 0,05935	0,8402	-0,05750 ± 0,07565	0,4760	-0,04000 ± 0,06623	0,5722	0,1500 ± 0,07132	0,0894
Bexiga	1,198 ± 5,793	p<0,8431	19,84 ± 6,539	*0,0290	4,687 ± 8,856	0,6246	-29,75 ± 7,312	**0,0096

Fonte: Autora da dissertação

Tabela Anexa 3.

Coefficientes farmacocinéticos utilizando o radiofármaco [¹⁸F]FDG. O desenho da tabela com os resultados encontrados foi realizado calculando-se o teste *t* de Student não pareado (testes *t* múltiplos) com GraphPad Prism 8. Do grupo controle dos camundongos sadios (n=5), com os dados dos camundongos infectados nas fases: Aguda (n=5), indeterminada (n=5), crônica (n=5) e a fase aguda de 1.000 parasitas (n=5), respectivamente. Obtendo a média ± D.P e do valor de *p*. representado como **** *p*<0,0001, *** *p*<0,001, ***p*<0,01, **p*<0,05.

Órgãos Animal saudável	[¹⁸ F]FDG							
	Animal saudável - Animal Infectado Fase aguda		Animal saudável - Animal Infectado Fase indeterminada		Animal saudável - Animal Infectado Fase Crônica		Animal saudável - Animal Infectado Fase aguda 1000 parasitas	
	Média ± DP	Valor <i>p</i>	Média ± DP	Valor <i>p</i>	Média ± DP	Valor <i>p</i>	Média ± DP	Valor <i>p</i>
Coeficiente ½ α	-4200 ± 0,094	** 0,0021	-0,01000 ± 0,12037	0,9376	1200 ± 0,1203	0,3479	1,7100 ± 0,0967	**** <0,0001
Coeficiente ½ β	10,27 ± 1,457	*** 0,0001	6,310 ± 1550	** 0,0036	7,180 ± 1,036	*** 0,0001	4,810 ± 2,638	0,1057
Coeficiente Clearance	-5490 ± 657,8	**** 000,1	-1329 ± 439,9	* 0,0165	-6100 ± 409,4	**** <0,0001	-6783 ± 407,8	**** <0,0001
Volume de distribuição Vd	-104389 ± 15114	*** 0,0001	423430 ± 52539	**** <0,0001	-129897 ± 9712	**** <0,0001	40379 ± 17255	* 0,0474

Fonte: Autora da dissertação

Tabela Anexa 4.

Coefficientes farmacocinéticos utilizando o radiofármaco [¹⁸F]FMISO.- O desenho da tabela com os resultados encontrados foi realizado calculando-se o teste t de Student não pareado (testes t múltiplos) com GraphPad Prism 8. Do grupo controle dos camundongos saudáveis (n=5), com os dados dos camundongos infectados nas fases: Aguda (n=5), indeterminada (n=5), crônica (n=5) e a fase aguda de 1.000 parasitas (n=5), respectivamente. Obtendo a média ± D.P e do valor de p. representado como **** p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

Animal saudável	¹⁸ F]FMISO							
	Animal saudável - Animal Infectado Fase aguda		Animal saudável - Animal Infectado Fase indeterminada		Animal saudável - Animal Infectado Fase Crônica		Animal saudável - Animal Infectado Fase aguda 1000 parasitas	
	Média ± DP	Valor p	Média ± DP	Valor p	Média ± DP	Valor p	Média ± DP	Valor p
Coeficiente ½ α	-0,03200 ± 0,069	*** 0,0018	-0.3100 ± 0,05727	*** 0,0006	0,1700 ± 0,1040	0,1408	18000±0,3384	*** 0,0007
Coeficiente ½ β	14,48 ± 4,929	* 0,0188	26,05 ± 3,515	**** <0,0001	43,76 ± 4,992	**** <0,0001	16,97 ± 4,835	** 0,0080
Coeficiente Clearance	132,9 ± 228,7	0,5772	1594 ± 195,1	**** <0,0001	-237,1 ± 230,4	0,3336	512,6 ± 197,0	* 0,0315
Volume de distribuição Vd	25366 ± 23960	0,3207	216924 ± 20432	**** <0,0001	158083 ± 19056	**** <0,0001	103506 ± 19759	*** 0,0008

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone (11) 2810-1570 ou (11) 2810-1572
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://mprofissional.ipen.br>

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Econômico do Governo do Estado de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) do Governo Federal.