

INHIBIDORES DE MAO-A MARCADOS CON CARBONO-11 Y FLÚOR-18 COMO POTENCIALES AGENTES DE DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES PET EN CÁNCER DE PRÓSTATA DE ALTA AGRESIVIDAD

LIC. KEVIN ZIRBESEGGER MUSSBACHER

TESIS DE DOCTORADO

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la República Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas Julio de 2024



INHIBIDORES DE MAO-A MARCADOS CON CARBONO-11 Y FLÚOR-18 COMO POTENCIALES AGENTES DE DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES PET EN CÁNCER DE PRÓSTATA DE ALTA AGRESIVIDAD

Dr. Antero J. Abrunhosa, Presidente del Tribunal Prof. Adj. Dra. Laura Scarone, Integrante del Tribunal Dr. Javier Giglio, Integrante del Tribunal

> Dr. Williams Porcal, Director Dr. Eduardo Savio, Co-Director

A mi madre, Seba, Andrea y Sara por el incondicional apoyo y compañía en el transcurso de esta etapa.

Agradecimientos

A las entidades que de una manera u otra apoyaron este proyecto:

- A Cudim (centro uruguayo de imagenología molecular) por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones, y brindarme todos los recursos, equipamientos y capital humano necesarios para el desarrollo del mismo.

- Programa de Posgrado, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar)

- PEDECIBA-Química (Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas); Ministerio de Educación y Cultura (MEC).

- Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Udelar.

- Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por las becas otorgadas (iniciación a la investigación, maestría y doctorado)

- Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Udelar) a través de apoyo económico en el marco de un proyecto de iniciación a la investigación.

A las personas que me acompañaron y colaboraron en este proyecto:

Al Dres. Williams Porcal y Eduardo Savio, por llevar a cabo la tutoría del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Dardo Centurión por los informes de anatomía patológica.

Al Dr. Pablo Buccino por el apoyo tanto académico como emocional durante mis inicios en el mundo laboral de la ciencia y por acompañarme hasta el día de hoy en todo sentido.

A la Dra. Florencia Arredondo por introducirme y apoyarme en el fascinante mundo de los cultivos celulares.

A Laura y Andrea por el apoyo en la adquisición, procesamiento y discusión de resultados de los estudios imagenológicos, los estudios de biodistribución y todas las enseñanzas en el campo de la experimentación animal y la radioprotección.

A Rosina por la mano enorme que me dio con los cultivos celulares, experimentos *in vitro* y los animales de experimentación.

A Omar por todas las enseñanzas y el apoyo en los momentos de mayor tensión.

A Andrés y Javier, por darme siempre una mano con el ciclotrón o algún desperfecto técnico.

A Andrea por todo el apoyo a lo largo de estos diez años en Cudim, y por convertirse prácticamente en parte de mi familia. ¡Qué sería de mí sin Andrea!

A Sara por acompañarme desde antes que nos iniciáramos en el mundo de la ciencia, y por sacarme el agua del vaso cuando ya no podía respirar.

A Pablo Oudri, pilar fundamental para que pudiera concluir con esta etapa.

A Saira por compartir tantas alegrías, y fortalecer inseguridades recorriendo juntos el mismo camino.

A Nacho por ser un ejemplo a seguir en este camino.

A Dino por enseñarme a usar Zotero y acompañarme en esta etapa.

A Manú que me apoyó y ayudó a motivarme en la finalización de esta etapa.

A Ingris y Flo, quienes me aconsejaron, apoyaron e inspiraron, dada su experiencia en una etapa como esta.

A mis compañeros de Cudim que me brindaron apoyo en todo sentido.

A mis amigos que me acompañaron en este proceso, y en muchos casos a pesar de la distancia.

A mi familia, especialmente mi madre y mi hermano, y a Sofi por acompañarme en la etapa más difícil de este recorrido.

INHIBIDORES DE MAO-A MARCADOS CON CARBONO-11 Y FLÚOR-18 COMO POTENCIALES AGENTES DE DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES PET EN CÁNCER DE PRÓSTATA DE ALTA AGRESIVIDAD

Kevin Zirbesegger Mussbacher

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTOR: Dr. Williams Porcal

(Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química,

Universidad de la República)

CO-DIRECTOR: Dr. Eduardo Savio

(Departamento de Radiofarmacia, Centro Uruguayo de Imagenología

Molecular)

El estudio de enfermedades crónicas no transmisibles, como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas, ha impulsado el desarrollo de una disciplina de investigación biomédica denominada imagenología molecular. Esta disciplina en continuo crecimiento apunta a la investigación y desarrollo de nuevas herramientas, agentes y métodos para visualizar procesos bioquímicos específicos *in vivo*, particularmente en aquellos procesos que son clave en el desarrollo de una

enfermedad. En particular el PET/CT (tomografía de emisión de positrones acoplada a tomografía computada) es una técnica de diagnóstico mínimamente invasiva, capaz de brindar información de gran relevancia clínica sobre los cambios moleculares que están involucrados en el desarrollo de distintas patologías. La misma se basa en detectar y analizar el patrón de distribución que adopta en el interior del organismo un radiotrazador o radiofármaco administrado de forma intravenosa, permitiendo diferenciar una anatomía o fisiología anormal de una normal. En este contexto, actualmente en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (Cudim) se llevan adelante diferentes líneas de investigación orientadas al desarrollo de radiotrazadores PET, incorporando tanto carbono-11 como flúor-18 en biomoléculas y moléculas específicas, para el estudio y diagnóstico del cáncer de próstata (CP) por imagenología molecular. Este tipo de cáncer fue el segundo más diagnosticado en hombres y la quinta causa de muerte por cáncer en el sexo masculino a nivel mundial en el año 2022. En Uruguay, el CP es el tipo de cáncer con mayor incidencia en hombres y el tercero en mortalidad, luego del cáncer de pulmón y colorectal. Estos datos ponen de manifiesto la clara relevancia del cáncer de próstata en la salud pública. A su vez, cabe destacar que el CP es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista biológico y clínico, lo que determina que la evaluación imagenológica sea altamente desafiante. Resulta de suma importancia estadificar con precisión esta patología, y así poder establecer el tratamiento más adecuado para cada caso. En este sentido, en los últimos años diversos estudios han establecido el papel de la enzima monoamino oxidasa A (MAO-A) en la agresividad del cáncer de próstata. La imagen molecular de la expresión de MAO-A podría ofrecer una herramienta no invasiva para la visualización de CP altamente agresivo.

En el presente trabajo de tesis de doctorado se describe la síntesis y evaluación preclínica de inhibidores de la MAO-A marcados con carbono-11 y flúor-18 como radiotrazadores PET para estudios de prueba de concepto en modelos animales de CP. En este aspecto, seleccionamos inhibidores selectivos de la MAO-A (clorgilina, harmina, 2-fluoroetil-harmol y azul de metileno) para su marcación con carbono-11 o flúor-18, con el objetivo de visualizar la expresión de MAO-A *in vivo* a través de

imágenes PET y estudios de biodistribución ex vivo. Para ello se utilizó un modelo de ratones con xenoinjerto de CP con alta expresión de MAO-A (utilizando la línea celular humana LNCaP) y otro con expresión limitada de MAO-A (utilizando la línea celular humana PC3). Se sintetizaron los estándares analíticos y precursores orgánicos de marcación para [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]harmina, 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol y [¹¹C]azul de metileno. Los primeros tres radiotrazadores cumplieron todas las especificaciones preestablecidas de control de calidad. Se estableció un protocolo de radiosíntesis semi-automatizado para obtener [¹¹C]clorgilina con [¹¹C]MeOTf como agente metilante en un módulo TRACERLAB FX C Pro ®GE, así como 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol utilizando un módulo Synthra RN Research Plus. Para la obtencipon de [¹¹C]azul de metileno se planteó una estrategia basada en la síntesis orgánica de azul de metileno, incorporando [¹¹C]dimetilamina en un precursor adecuado. Luego de ensayar diferentes condiciones de marcación, se logró obtener [¹¹C]azul de metileno con 11% de rendimiento radioquímico (sin purificar). Es necesario realizar ensayos a futuro para lograr obtener [¹¹C]azul de metileno de manera eficiente, y establecer los protocolos de producción y de control de calidad del mismo, con el fin de llevar a cabo estudios in vivo.

Por otra parte, la relación de captación tumor-músculo (T/M) obtenida mediante imágenes PET/CT de [¹¹C]harmina (4.5 ± 0.5) fue mayor que la de 2-[¹⁸F]fluoroetilharmol (2.3 ± 0.7) y [¹¹C]clorgilina (2.0 ± 0.1). Se observó un patrón de biodistribución *ex vivo* comparable en todos los radiotrazadores. Además, la captación tumoral de [¹¹C]harmina mostró tanto una notoria reducción (T/M = 1) en el modelo de tumor PC3, como en tumores LNCaP en presencia de harmina no radiactiva (ensayo de bloqueo). Estos resultados sugieren que [¹¹C]harmina podría servir como un radiotrazador PET atractivo para la visualización de la expresión de MAO-A en CP altamente agresivo. Los prometedores resultados promovieron el planteo de un ensayo clínico inicial, en pacientes con cáncer de próstata de alta agresividad, actualmente en curso en Cudim. El planteo representa además a futuro un potencial de traslación clínica hacia el desarrollo de estrategias terapéuticas personalizadas para pacientes con CP.

MAO-A INHIBITORS LABELED WITH CARBON-11 AND FLUORINE-18 AS POTENTIAL DIAGNOSTIC AGENTS BY PET IMAGING IN HIGH-AGGRESSIVE PROSTATE CANCER

Kevin Zirbesegger Mussbacher

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTOR: Dr. Williams Porcal

(Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química,

Universidad de la República)

CO-DIRECTOR: Dr. Eduardo Savio

(Departamento de Radiofarmacia, Centro Uruguayo de Imagenología

Molecular)

The study of chronic noncommunicable diseases, such as cancer and neurodegenerative diseases, has driven the development of a biomedical research discipline denominated molecular imaging. This continuously growing discipline aims at the research and development of new instruments, reagents and methods to visualize specific biochemical processes in vivo, particularly in those processes that are key in the development of a disease. In particular, PET/CT (positron emission tomography coupled to computed tomography) is a non invasive diagnostic

technique, capable of providing information of great clinical relevance about the molecular changes that are involved in the development of different pathologies. This technique is based on detecting and analyzing the distribution pattern that a radiotracer or radiopharmaceutical administered intravenously adopts within the body, allowing the differentiation of abnormal anatomy or physiology from a normal one. In this context, currently at the Uruguayan Center for Molecular Imaging (Cudim) different lines of research are being carried out aimed at the development of PET radiotracers, incorporating both carbon-11 and fluorine-18 in biomolecules and specific molecules, for the study and diagnosis of prostate cancer (PC) by molecular imaging. This type of cancer was the second most diagnosed in men and the fifth cause of cancer death in men worldwide in 2022. In Uruguay, PC is the type of cancer with the highest incidence in men and the third in mortality, after lung and colorectal cancer. These data highlight the clear relevance of prostate cancer in public health. At the same time, it should be noted that PC is a heterogeneous disease from a biological and clinical point of view, which makes imaging evaluation highly challenging. It is of utmost importance to accurately stage this pathology, and thus be able to establish the most appropriate treatment for each case. In this sense, in recent years various studies have established the role of the enzyme monoamine oxidase A (MAO-A) in the aggressiveness of prostate cancer. Molecular imaging of MAO-A expression could offer a non-invasive method for visualization of highly aggressive PC.

The present doctoral thesis describes the synthesis and preclinical evaluation of MAO-A inhibitors labeled with carbon-11 and fluorine-18 as PET radiotracers for proof-of-concept studies in PC animal models. In this regard, we selected selective inhibitors of MAO-A (clorgyline, harmine, 2-fluoroethyl-harmol and methylene blue) for labeling with carbon-11 or fluorine-18, with the aim of visualizing the expression of MAO-A in vivo through PET imaging and by ex vivo biodistribution assays. In order to achieve this, a mouse model with PC xenograft with high expression of MAO-A (using the human cell line LNCaP) and another with limited expression of MAO-A (using the human cell line PC3) were used. Analytical standards and organic labeling precursors for [¹¹C]clorgyline, [¹¹C]harmine, 2-[¹⁸F]fluoroethyl-harmol and

[¹¹C]methylene blue were synthesized. The first three radiotracers met all preestablished quality control specifications. A semi-automated radiosynthesis protocol was developed to obtain [¹¹C]clorgyline with [¹¹C]MeOTf as a methylating agent in a TRACERLAB FX C Pro ®GE module, as well as 2-[¹⁸F]fluoroethyl-harmol using a Synthra RN Research Plus module. To obtain [11C]methylene blue, a strategy based on the organic synthesis of methylene blue was proposed, incorporating [¹¹C]dimethylamine in a precursor. After testing different labeling conditions, it was possible to obtain [¹¹C]methylene blue with 11% radiochemical yield (unpurified). It is necessary to carry out future trials to obtain [¹¹C]methylene blue efficiently, and to establish production and quality control protocols for it, in order to carry out in vivo studies.

On the other hand, the tumor-to-muscle (T/M) uptake ratio obtained by PET/CT images of [¹¹C]harmine (4.5 \pm 0.5) was higher than 2-[¹⁸F]fluoroethyl-harmol (2.3 \pm 0.7) and [¹¹C]clorgyline (2.0 \pm 0.1). A comparable ex vivo biodistribution pattern was observed for all radiotracers. Furthermore, tumor uptake of [¹¹C]harmine showed both a notable reduction (T/M = 1) in PC3 tumor model and in LNCaP tumors in the presence of non-radioactive harmine (blocking assay). These results suggest that [¹¹C]harmine could serve as an attractive PET radiotracer for visualization of MAO-A expression in highly aggressive PC. The promising results promoted the proposal of an initial clinical trial in patients with highly aggressive prostate cancer, currently underway in Cudim. The approach also represents a future potential for clinical translation towards the development of personalized therapeutic strategies for patients with CP.

Índice

1	. Introducción	1
	1.1 Imagenología molecular	2
	1.2 Tomografía por emisión de positrones (PET)	3
	1.3 Producción de radiofármacos PET	9
	1.4 Cáncer de próstata	15
	1.5 Radiofármacos PET en el diagnóstico del cáncer de próstata	20
	1.6 Rol de la MAO-A en el cáncer de próstata	27
2	. Objetivos y estrategia de trabajo	34
	2.1 Objetivo general	35
	2.2 Objetivos específicos	35
	2.3 Estrategia de trabajo	36
3	. Obtención de Inhibidores de MAO-A	38
	marcados con carbono-11 y flúor-18	
	3.1 Obtención de Inhibidores de MAO-A marcados con carbono-11	39
	3.1.1 Introducción	39
	3.1.2 Radiosíntesis y control de calidad de [11C]clorgilina	49
	3.1.2.1 Parte experimental	49
	3.1.2.2 Resultados y discusión	59
	3.1.2.3 Conclusiones	71
	3.1.3 Radiosíntesis y control de calidad de [11C]harmina	72
	3.1.3.1 Parte experimental	72
	3.1.3.2 Resultados y discusión	74
	3.1.3.3 Conclusiones	80
	3.1.4 Radiosíntesis y control de calidad de [11C]azul de metileno	81
	3.1.4.1 Parte experimental	81
	3.1.4.2 Resultados y discusión	85
	3.1.4.3 Conclusiones	96
	3.2 Obtención de Inhibidores de MAO-A marcados con flúor-18	97
	3.2.1 Introducción	97

3.2.2 Radiosíntesis y control de calidad de 2-[¹⁸ F]fluoroetil-harmol	102
3.2.2.1 parte experimental	102
3.2.2.2 Resultados y discusión	110
3.2.2.3 Conclusiones	118
4. Evaluación biológica	119
4.1 Introducción	120
4.2 Parte experimental	123
4.2.1 Materiales y equipos utilizados	123
4.2.2 Cultivos celulares	123
4.2.3 Protocolos experimentación animal	124
4.2.4 Generación de los modelos tumorales	124
4.2.5 Estudios imagenológicos iniciales	125
4.2.6 Evaluación in vivo mediante imagenología PET-CT	126
4.2.7 Ensayos de biodistribución ex vivo	127
4.2.8 Ensayos in vitro en líneas celulares de cáncer de próstata	128
4.2.9 Anatomía patológica	130
4.3 Resultados y discusión	130
4.3.1 Evaluación biológica inicial de [¹¹ C]clorgilina	130
4.3.2 Evaluación biológica de [¹¹ C]clorgilina, [¹¹ C]harmina	136
y 2-[¹⁸ F]fluoroetil-harmol	
4.3.2.1 Evaluación in vivo mediante imagenología PET-CT	136
4.3.2.2 Evaluación <i>ex vivo</i> de [¹¹ C]harmina, [¹¹ C]clorgilina	146
y 2-[¹⁸ F]fluoroetil-harmol mediante biodistribuciones	
4.3.2.3 Ensayos celulares	150
4.4 Conclusiones	153
5. Conclusiones generales, perspectivas y alcance de la tesis	
5.1 Conclusiones generales	155
5.2 Perspectivas	156
5.3 Alcance de la tesis	157
Bibliografía	159

Lista de abreviaturas

*: las abreviaturas marcadas con un asterisco corresponden a una traducción directa del inglés.

ac	Acuoso
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
COSY	Espectroscopia de correlación H-H*
CUDIM	Centro Uruguayo de Imagenología Molecular
СТ	Tomografía Computarizada*
EtOH	Etanol
Et ₂ O	Dietiléter
FM	Fase móvil
GMP	Buenas Prácticas de Manufactura*
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Performance*
HMBC	Correlación de enlace múltiple heteronuclear*
HSQC	Correlación heteronuclear a enlace simple*
MeOH	Metanol
NEt ₃	Trietilamina
MeCN	Acetonitrilo
Mel	Yoduro de metilo
MeOTf	Triflato de metilo
OTf	Triflato (trifluorometilsulfonato)
OTs	Tosilato (Tosilato de metilo)
PET	Tomografía de Emisión de Positrones*
p.i.	Post-inyección
RMN	Resonancia magnética nuclear
p.i. RMN	Post-inyección Resonancia magnética nuclear

PRN	Pureza radionucleídica
PRQ	Pureza radioquímica
RRQ	Rendimiento radioquímico
<i>p</i> -TsCl	Cloruro de 4-toluenosulfonilo*
SPECT	Tomografía computada de emisión de fotón único*
T. amb	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
t _{1/2}	Período de semidesintegración
tr	Tiempo de retención
TLC	Cromatografía en capa fina*
UV	Ultravioleta
¹¹ C:	Carbono-11
¹² C	Carbono-12
¹³ C	Carbono-13
¹⁸ F	Flúor-18
⁶⁸ Ga	Gálio-68
¹⁸ O	Oxígeno-18

1. Introducción

1.1 Imagenología molecular

El concepto de imagenología es utilizado para hacer referencia al conjunto de técnicas y procedimientos que permiten obtener de manera no invasiva imágenes del cuerpo humano, partes del mismo, o de animales, ya sea con propósitos clínicos o de investigación científica. Se define a la imagenología molecular como la visualización, caracterización y medida de procesos biológicos a nivel celular y molecular en humanos, y otros sistemas vivos. Esta disciplina en continuo crecimiento apunta a la investigación y desarrollo de nuevas herramientas, agentes y métodos para visualizar procesos bioquímicos específicos *in vivo*, particularmente aquellos que son clave en el desarrollo de una enfermedad.^{1,2}

Los estudios realizados acerca de diferentes enfermedades generalmente se basan en cambios anatómicos o fisiológicos que son una manifestación tardía de cambios moleculares subyacentes a las mismas. La visualización directa de los cambios moleculares mencionados puede permitir una detección temprana de una enfermedad. Por lo tanto, se podrían potencialmente visualizar dichos cambios aun cuando ésta no presenta signos clínicos evidentes, pudiéndose eventualmente intervenirla a tiempo, realizar un estudio de su evolución o un monitoreo de su recurrencia. Cabe destacar que también las técnicas de imagenología molecular pueden potencialmente permitir una optimización de una terapia dirigida a blancos moleculares específicos. De esta manera se podría a su vez visualizar los efectos producidos por dicha terapia o realizar un monitoreo de una terapia ya existente. Esto desempeña un papel directo en la determinación de la efectividad de un tratamiento apenas luego del inicio del mismo. De esta manera, la imagenología molecular puede contribuir a la rápida evaluación de nuevas terapias y al desarrollo acelerado de fármacos nuevos y más efectivos.^{3,4,5}

En el diagnóstico convencional mediante imágenes, se suele utilizar una fuente externa de energía, como Rayos-X, campos magnéticos u ondas de ultrasonido para producir imágenes de huesos y tejidos blandos (información anatómica). A diferencia de estas, en la medicina nuclear e imagenología molecular, se utilizan radiotrazadores o radiofármacos como agentes que emiten energía que producen

2

señales. Los mismos se introducen en el organismo generalmente por vía intravenosa y sus señales son detectadas por dispositivos de imagenología externos (cámara gamma, escáneres SPECT y PET) para crear imágenes que proporcionan información sobre la actividad celular y el funcionamiento de los órganos (información fisiológica). En este sentido, las modalidades de imagenología convencional (Rayos-X, CT, RMN) permiten obtener información estructural precisa con alta resolución. Mientras que las técnicas de imagenología molecular (PET y SPECT) poseen una baja resolución, pero brindan información farmacocinética y farmacodinámica. Por último, cabe destacar que con el advenimiento de los dispositivos híbridos PET-CT y PET-MR se ha podido alcanzar una especificidad y sensibilidad tal, que abarca desde lo anatómico hasta lo funcional, convirtiéndose en la principal modalidad de imagenología molecular utilizada en la actualidad.^{6,7,8,9}

1.2 Tomografía por emisión de positrones (PET)

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica mínimamente invasiva de imagenología molecular utilizada en medicina nuclear. Su base física radica en la detección externa del decaimiento de radionucleidos emisores de positrones, incorporados en moléculas introducidas en un sujeto de estudio. Moléculas de interés biológico como el agua, aminoácidos, péptidos, azúcares o fármacos, son marcados con radionucleidos emisores de positrones de período de semidesintegración corto (¹¹C: 20 minutos, ¹³N: 10 minutos, ¹⁵O: 2 minutos, ¹⁸F: 109 minutos, ⁶⁸Ga: 68 minutos) sin alterar sus propiedades bioquímicas o farmacológicas.¹⁰

En lo que respecta a las bases físicas de la técnica PET, de manera breve, se describe en primer lugar que los radionucleidos inestables son aquellos que poseen una proporción inadecuada de neutrones y protones, núcleos muy grandes, o un exceso de energía. Esto conduce a los mismos a decaer por emisión de radiaciones tales como partículas α , partículas β^- , partículas β^+ , captura electrónica o radiación electromagnética en forma de rayos- γ . Las partículas β^+ y los rayos- γ son de especial interés para el presente trabajo, ya que los radionucleidos con exceso de

protones pueden decaer espontáneamente emitiendo un positrón (β^+) junto con un neutrino *v*. En este proceso un protón en el núcleo es convertido en un neutrón como muestra la siguiente ecuación:

$$p \rightarrow n + \beta^+ + v$$

Dónde p representa un protón; n un neutrón; β^+ un positrón; y v un neutrino.¹¹ El positrón emitido desde el núcleo atómico que sigue un decaimiento β^+ , posee un tiempo de existencia muy corto en un medio rico en electrones como un tejido, o en solución. El positrón al interaccionar con electrones de los átomos que componen el medio circundante, sufrirá un proceso conocido como "aniquilación". Durante este proceso la masa del electrón y el positrón en cuestión se transforma en dos fotones de radiación γ , emitidos de manera simultánea en direcciones opuestas (180°), con una energía característica de 511 KeV cada uno (Figura 1).



Figura 1. Proceso de Aniquilación. Se muestra un radionucleido que decae mediante la emisión de un positrón, un neutrino y la aniquilación que se produce al interaccionar con un electrón, resultando en la emisión de dos fotones de 511 KeV en direcciones opuestas (180°). Normalmente el sitio de aniquilación es muy cercano a donde se encuentra el emisor de positrones. Adaptado de referencia 11.

Este proceso posee propiedades de gran relevancia para la imagenología PET, ya que los fotones de aniquilación son muy energéticos. Los mismos se encuentran en la región de los rayos- γ del espectro electromagnético (más energéticos que los rayos-X), lo que implica que éstos por ejemplo en un contexto clínico, dado su poder de penetración, permitan su detección desde el exterior al cuerpo de un paciente. Por tanto, son los rayos- γ producidos por el fenómeno de aniquilación los que son detectados en la imagenología PET, y no los positrones.¹²

En este aspecto, cuando dos detectores situados en lados opuestos de un sujeto de estudio registran casi simultáneamente un evento, se dice que los detectores se encuentran "en coincidencia", debido a que en algún lugar en línea recta entre ambos ("línea de respuesta") se produjo un proceso de aniquilación. Los escáneres (o cámaras) PET están diseñados para detectar los fenómenos de coincidencia. Los mismos se construyen con un arreglo anular de pequeños cristales. Los cristales a ambos lados de un sujeto de estudio detienen los fotones-γ producidos por la aniquilación positrón-electrón como se muestra en la Figura 2. Esto se debe a que las líneas de respuesta están determinadas geométricamente, por ello las mismas no dependen de la distancia entre los detectores. De esta manera, en medida de que los fotones provenientes de la aniquilación se emiten a 180º uno con respecto del otro, la distancia de los detectores respecto al sujeto de estudio no afecta la resolución.¹³



Figura 2. Detección de coincidencia. Se muestra a los rayos-γ a 180º producidos por la aniquilación positrón-electrón. Si cada detector de cada lado registra casi simultáneamente un evento, entonces la aniquilación debió haber ocurrido en la línea recta entre ambos. Tomado de referencia 12.

Por otra parte, es conveniente destacar que la técnica PET se basa en los principios de un radiotrazador, que es una sustancia específica que permite obtener información de un sistema o parte del mismo, mediante la observación de su comportamiento cuando éste es agregado a un proceso determinado. Los radiotrazadores pueden ser incorporados tanto en sistemas biológicos, así como en sistemas físicos o químicos. Éstos pueden ser indicadores tanto de un sistema en general, o de una propiedad que se tenga interés por evaluar, como pueden ser propiedades bioquímicas, fisiológicas o fisiopatológicas de un sistema. Idealmente se espera que un radiotrazador no produzca cambios físicos, químicos, o biológicos en un sistema. Sea dicho radiotrazador marcado isotópica, o no isotópicamente, no debería presentar propiedades diferente a su análogo no marcado, y su comportamiento a concentraciones traza (de micro a picomolar) no debería presentar diferencias respecto a concentraciones mayores.^{14,15}

Aplicando los principios cinéticos de un trazador a la información PET obtenida, es posible estimar parámetros fisiológicos que determinan la interacción y el destino de las moléculas marcadas. Con respecto a la farmacología, ésta técnica puede ser

6

utilizada tanto para el estudio in vivo de parámetros de transporte y unión regional de un fármaco en determinado tejido, como también para la investigación de los efectos de un fármaco en los parámetros fisiológicos regionales. Por las características mencionadas y las bajas dosis de radiación que son necesarias para realizar este tipo de estudio, la técnica PET puede ser utilizada de forma segura con fines de investigación clínica. Además de las aplicaciones clínicas, la combinación de esta técnica de imagenología mínimamente invasiva, que permite cuantificar y realizar el seguimiento de un radiotrazador determinado, brinda una oportunidad muy atractiva para la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos.^{16,17} En algunos caso los estudios PET pueden brindar información de gran relevancia para completar un diagnóstico y de este modo contribuir a la toma de decisiones clínicas ante determinados casos particulares, e incluso monitorear la respuesta de una eventual terapia. Ésta técnica posee un amplio rango de aplicaciones, siendo de especial importancia en la Oncología.^{18,19} No obstante, se puede destacar la importancia de la técnica PET en Cardiología, Neurología y más recientemente en Psiquiatría.^{20,21,22} El amplio rango de aplicaciones mencionadas, es posible gracias a un gran conjunto de radiotrazadores y radiofármacos. En este contexto es muy importante destacar la diferencia entre ambos. En este sentido, un radiotrazador es un compuesto químico en el que uno o varios átomos han sido sustituidos por un radionucleido que emite radiación, el mismo se puede aplicar a un sistema no necesariamente biológico, en particular para determinar una condición, ya sea de fuga, medición del caudal, como determinar una propiedad biológica en el caso de un sistema vivo. En este último caso, se deben cumplir especificaciones que aseguren su calidad farmacéutica, sin embargo, esto es tan solo un aspecto parcial. Para que un radiotrazador con una potencial aplicación biológica sea considerado radiofármaco, se tiene que demostrar que el mismo logra discriminar o resolver una situación clínica determinada. Para ello se necesitan llevar a cabo estudios clínicos, que demuestren con evidencia cual es el aporte del agente en cuestión. Por tanto, el uso del término radiofármaco implica que existió una validación clínica de su uso, además de que hay un proceso productivo establecido y una monografía que establece las especificaciones para liberar un lote de producción, es decir un

conjunto de aspectos que apuntan a la seguridad de su uso para el paciente. Los mismos pueden ser utilizados para el seguimiento a nivel molecular de diferentes procesos bioquímicos, tales como el transporte de aminoácidos o de glucosa, marcadores de proliferación celular, marcadores de tumores hipóxicos e incluso marcadores de expresión génica.^{23,24}

Mientras que la técnica PET puede brindar una imagen precisa de áreas metabólicamente activas, la misma no brinda información anatómica. Como resultado de ello, se dio lugar al desarrollo de nuevas modalidades de imagenología que surgen de la combinación de imágenes PET con otra técnica de imagenología que permita obtener información anatómica, siendo la más difundida la tomografía computada (CT). Los equipamientos híbridos como los escáneres PET-CT, combinan imágenes anatómicas y funcionales tomadas durante un solo procedimiento, sin tener que cambiar la posición del paciente entre un estudio y otro (Figura 3).^{25,26}



Figura 3. Escáner híbrido PET-CT. Puede apreciarse que en una región se realiza el estudio PET y en otra el estudio CT. La camilla se mueve de manera horizontal desde una región hacia la otra, sin cambiar la posición del paciente. La distribución de los detectores PET en forma de anillo y la adquisición giratoria en el estudio CT, permiten obtener imágenes en tres dimensiones. Adaptado de referencia 28.

Además, en los últimos años la combinación de resonadores magnéticos clínicos (MR) con escáneres PET ha recibido una creciente atención. En oposición con los equipamientos PET-CT, los PET-MR reducen la cantidad de radiación ionizante al no utilizar Rayos-X (base de la CT), además permiten un mejor contraste en las imágenes de tejidos blandos.²⁷ Los detalles de dichas técnicas híbridas son muy vastos para ser mencionados y excederían el alcance de la presente tesis.

Vistas todas las consideraciones anteriormente mencionadas sobre esta versátil técnica de imagenología, se abordarán a continuación diferentes aspectos fundamentales acerca de la producción y control de calidad de radiotrazadores y radiofármacos utilizados en la imagenología PET. Se hará especial hincapié en el desarrollo de nuevos radiofármacos y el esquema habitual de trabajo que existe en un centro que produce y utiliza radiofármacos PET, tomando Cudim como ejemplo.

1.3 Producción de radiofármacos PET

La producción y el control de calidad de un radiofármaco PET debe tener en cuenta requerimientos específicos del tipo tecnológico, de infraestructura y logísticos. Por consiguiente, dado que la mayoría de los radionucleidos utilizados poseen un corto período de semidesintegración, deben ser producidos en los mismos sitios en los cuales serán utilizados como en el caso del carbono-11, o encontrarse en sitios cercanos a las instalaciones donde se producen los radiofármacos, como en el caso del flúor-18. Las instalaciones y elementos tecnológicos fundamentales que deben estar incluidos en un centro PET son: un ciclotrón (acelerador de partículas), laboratorios especializados en radiofarmacia, y al menos un escáner PET. Esto implica una estrecha colaboración entre un equipo multidisciplinario con conocimientos en química, bioquímica, farmacia, ingeniería biomédica, medicina nuclear, física-médica, seguridad radiológica y técnico radioisotopista. Así como un conjunto de servicios de apoyo (desde la gestión de los procesos administrativosfinancieros hasta la logística de insumos, equipos, servicios, así como higiene ambiental – esto hace a la limpieza especializada en áreas limpias y la preparación del equipamiento para ingresar a un área limpia).²⁸ En este sentido, cabe destacar

brevemente el esquema habitual de trabajo en Cudim, como ejemplo de un centro PET y detallar los aspectos tecnológicos más relevantes (Figura 4).

El proceso productivo comienza en el ciclotrón, donde se producen los radionucleidos emisores de positrones, los cuales son enviados a módulos de síntesis semi-automatizados que se encuentran dispuestos dentro de celdas blindadas ("hot cells"). En estos módulos se llevan a cabo las reacciones de marcación, es decir la incorporación del radionucleido PET en un precursor adecuado para obtener un determinado radiotrazador o un radiofármaco. Esto se realiza mediante diferentes estrategias que serán descriptas más adelante, en una sección correspondiente según la naturaleza del radionucleido en cuestión. Una vez obtenida la molécula marcada, se toma una pequeña muestra para realizar el control de calidad del lote. En el control de calidad se estudian diferentes parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que están establecidos en la farmacopea o monografías que determinan la aptitud del lote para ser administrado a un paciente, o a un animal de experimentación.²⁹ En este sentido, existen casos que no figuran en la farmacopea, ni existen monografías al respecto. Para ellos, en Cudim se establecen especificaciones según el estado del arte en la literatura o por analogía con otros radiofármacos que se estén utilizando y dispongan de las especificaciones mencionadas.



Figura 4. Esquema habitual de trabajo en Cudim. Todas las imágenes fueron tomadas en Cudim.

Algunos de los parámetros estudiados en el control de calidad son: la apariencia (aspecto visual), el pH, la pureza química, pureza radioquímica, identidad radionucleídica, determinación de disolventes residuales y aspectos microbiológicos como la presencia de pirógenos y la esterilidad, entre otros. Por consiguiente, si el lote cumple con los parámetros prestablecidos en farmacopea, monografías, o en la literatura el mismo es "liberado" para su uso.^{30,31} Una vez que la molécula marcada es administrada en un paciente o un animal de experimentación, se lleva a cabo la adquisición de imágenes en el escáner PET. La información adquirida es pre-procesada mediante los métodos informáticos apropiados, para brindar las imágenes que serán analizadas para obtener finalmente un informe de un estudio clínico en el caso de un paciente, o un conjunto de resultados en animales de experimentación, como por ejemplo: un perfil de biodistribución, relación de captación entre diferentes órganos y tejidos, farmacocinética, etc.³²

Uno de los aspectos tecnológicos más relevantes del esquema de producción mencionado, es el uso de ciclotrones o reactores para producir artificialmente los radionucleidos emisores de positrones, ya que los mismos no existen en la naturaleza. Los principales radionucleidos que se obtienen mediante el uso de un ciclotrón son el carbono-11, nitrógeno-13, oxígeno-15 y flúor-18. Los mismos presentan un bajo peso atómico y se producen mediante la irradiación de blancos (*"targets"*) líquidos o gaseosos. Además, el uso de ciclotrones también se extiende a la producción de radiometales como el galio-68, entre otros.³³

Un ciclotrón (Figura 5) está compuesto por dos electrodos de metal hueco (en forma de "D") en una cámara de vacío entre los dos polos de un gran electroimán. Mediante la introducción de Hidrógeno (H₂) o Deuterio (D₂) en forma gaseosa y su posterior ionización mediante un arco de corriente entre dos cátodos situados en una fuente de iones, se producen las partículas que serán aceleradas (H⁻ o D⁻).

12



Figura 5. Ciclotrón. Se muestra la vista exterior (izquierda) y una vista detallada de los *targets* (derecha) de un ciclotrón utilizado para obtener radionucleidos PET (GE PETtrace® 16.5 MeV disponible en las instalaciones de Cudim). En la derecha se muestran 4 blancos: en (A) se puede ver el blanco utilizado para producir ¹⁸F, en (B) se muestra un blanco utilizado para pruebas, en (C) se muestra el blanco utilizado para la producción de ¹¹C, por último, en (D) se muestra un blanco que según si su contenido es [¹⁸O]H₂O u [¹⁶O]H₂O, se pueden producir ¹⁸F⁻ o ¹³NH₄⁺ respectivamente.

A través de la aplicación de voltaje alternado entre los electrodos y un potente campo magnético, los aniones ganan energía siguiendo una trayectoria en espiral. Una vez que el radio de dicha trayectoria alcanza a golpear una lámina denominada *"foil"* en la periferia de la cámara de vacío, ésta quita los electrones de dichas partículas tornándolas positivas (H⁺ o D⁺).



Figura 6. Se muestra una ilustración esquematizada de la trayectoria seguida por una partícula acelerada dentro de un ciclotrón. Adaptado de referencia 36.

El cambio en la carga desvía el haz de partículas, obligándolas a colisionar con el contenido del blanco (Figura 6). Éste último es el componente del ciclotrón donde las partículas de alta energía colisionan bajo diferentes condiciones con un isótopo estable, obteniéndose radionucleidos emisores de positrones, proceso que se conoce con el nombre de reacción nuclear (Figura 5, derecha). En este sentido, es importante resaltar que los ciclotrones deben localizarse en búnkeres blindados por paredes de concreto de gran espesor, debido a los altos riesgos radiológicos que representan las reacciones nucleares y los productos derivados de las mismas, como por ejemplo los neutrones. Por otro lado, existen ciclotrones autoblindados, para los cuales en teoría no se necesitaría contar con un bunker de las características mencionadas.^{34,35,36} En este sentido, cabe mencionar que en Cudim se dispone de un ciclotrón GENtrace[™] (7.8 MeV, General Electric) autoblindado, que se utiliza para la producción de flúor-18 (Figura 7).



Figura 7. Ciclotrón GENtrace[™] (GE). Se muestra el ciclotrón autoblindado GENtrace[™] en un búnker acondicionado para alojarlo en las instalaciones de Cudim.

Cabe destacar que otros radionucleidos PET, como por ejemplo el galio-68, pueden ser obtenidos a partir de generadores. Los mismos están compuestos por columnas de vidrio o plástico con un disco de filtrado en la parte inferior dentro de un blindaje adecuado. La columna se rellena con material adsorbente sobre el cual un radionucleido "padre" (de largo período de semidesintegración) es adsorbido. Una vez que el radionucleido "padre" decae, el "hijo" (con un período de semidesintegración relativamente corto) es liberado y puede ser eluido con un disolvente adecuado cuantas veces la vida útil del generador lo permita, ya que el radionucleido "padre" e "hijo" no son isótopos, éstos pueden ser separados químicamente con facilidad. A su vez, los requerimientos logísticos y de infraestructura para albergar un generador, son mucho menos complejos que los necesarios para disponer de un ciclotrón. Sin embargo, la versatilidad y capacidad de producción de radionucleidos de un ciclotrón es ampliamente superior a la de un generador. Por lo que a la hora de elegir cómo producir los radionucleidos PET, cada centro deberá tener en cuenta criterios de demanda, económicos y logísticos para su implementación.³⁷

1.4 Cáncer de próstata

El término cáncer abarca un conjunto numeroso de enfermedades, que se caracterizan por la alteración del metabolismo y de las vías de señalización celular, lo que conduce a una proliferación y supervivencia descontroladas de células transformadas. La proliferación desmesurada de estas células anormales puede comprometer tanto al tejido involucrado, como propagarse y afectar a otros tejidos (metástasis). En relación a ello se han designado una gran cantidad de moléculas, factores y condiciones como causas subyacentes al inicio y progresión de la enfermedad. Dichos factores pueden ser tanto externos, por ejemplo, agentes químicos, radiaciones e infecciones (virales, bacterianas), como internos, por ejemplo, alteraciones genéticas heredadas, hormonas y mutaciones genéticas como consecuencia del propio metabolismo.^{38,39,40}

Por otra parte, la glándula prostática es un órgano reproductor masculino accesorio, que se ubica debajo de la vejiga y rodeando la uretra. Su función principal es contribuir a las secreciones que formulan los fluidos seminales para mantener la viabilidad de los espermatozoides.⁴¹ En este contexto, el cáncer de próstata (CP) se origina cuando las células prostáticas comienzan а proliferar descontroladamente. Este tipo de cáncer fue el segundo más diagnosticado en hombres y la quinta causa de muerte por cáncer en el sexo masculino a nivel mundial en el año 2022, con un estimado de 1.5 millones de casos nuevos y 397000 muertes.⁴² En Uruguay, el CP es el tipo de cáncer con mayor incidencia en hombres (57/100.000) y el tercero en mortalidad (17/100.000), luego del cáncer de pulmón y colorectal.43,44

Los factores de riesgo que en la literatura aparecen como los más enfáticamente asociados con la probabilidad de desarrollar CP son: la edad, los antecedentes familiares y el grupo étnico. Respecto a la edad, se ha observado que en hombres menores de 50 años solo 1 de 350 es diagnosticado con cáncer de próstata, mientras que la tasa de incidencia aumenta hasta 1 cada 52 hombres entre los 50 y 59 años de edad. En hombres mayores de 65 años la tasa de incidencia es del 60%.⁴⁵ A su vez, se ha observado que a diferencia de la incidencia clínica, la prevalencia específica por la edad del CP encontrada en autopsias de hombres mayores de 80 años presenta una tasa de hasta el 80%.⁴⁶ Por otra parte se estima que alrededor del 20% de los pacientes con CP tienen antecedentes familiares, lo que indica que el mismo puede desarrollarse no solo debido a factores genéticos, sino también por un patrón similar de exposición a carcinógenos ambientales y estilos de vida en común. Además, un estudio reciente indica que el riesgo asociado de desarrollar CP en un hombre con historia familiar es del 68%, y que a su vez presenta un riesgo 72% mayor de enfermedad letal.^{45,47} Por último, la relevancia de los factores étnicos respecto al riesgo de desarrollar CP, ha sido extensamente estudiada debido a la importancia respecto a la etiología de éste tipo de cáncer. Diversos estudios indican que los hombres afroamericanos tienen la mayor incidencia de CP en todo el mundo y más probabilidades de desarrollar la enfermedad más temprano en la vida en comparación con otros grupos étnicos y

raciales, mientras que los asiáticos presentan la menor tasa de incidencia. Esto se observa no solo en los hombres afroamericanos, sino también para los caribeños y hombres afrodescendientes en Europa, lo que sugiere una genética común propensa al desarrollo de esta enfermedad.⁴⁸ A su vez un estudio realizado por Chu y colaboradores, indica que las tasas de incidencia de CP son hasta 40 veces más altas entre los hombres afroamericanos que entre los africanos. Esto sugiere no solo que los factores ambientales presentan un rol importante en la etiología del CP, sino que estas variaciones también pueden ser debidas a un menor número de diagnósticos, diferencias en los métodos de detección y disparidades en el acceso a la atención médica.⁴⁹

Cabe destacar que en la actualidad la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, así como las mejoras en la calidad y expectativa de vida, condujeron a un envejecimiento de la población mundial. En este sentido, se estableció un nuevo perfil epidemiológico en el cual las enfermedades crónicas y degenerativas, particularmente las cardiovasculares y el cáncer, integran las principales causas de mortalidad. Por ello, el cáncer representa uno de los desafíos más relevantes para la salud pública en el presente, y a futuro. En particular, el incremento en la incidencia del CP se relaciona con la implementación de nuevas estrategias de monitoreo y diagnóstico precoz. En consecuencia, el CP constituye un problema sanitario de mayor consideración, que ocasiona una gran carga de morbilidad, mortalidad e importantes impactos socio-económicos.^{50,51}

Respecto a la prognosis del CP, en las últimas décadas se plantearon importantes desafíos relacionados con el diagnóstico, tratamiento y seguimiento óptimo de los pacientes con CP, lo que destaca su clara relevancia en la salud púbica. En tal sentido el CP se caracteriza por ser una enfermedad heterogénea desde el punto de vista biológico y clínico. Pudiendo evolucionar desde un carcinoma indolente bien diferenciado, de lento crecimiento y andrógeno-dependiente, hacia un tumor más agresivo, indiferenciado y andrógeno-independiente. En este contexto, cabe destacar que el CP es una enfermedad impulsada por hormonas y que el crecimiento de las células tumorales depende en gran medida del aumento de la señalización de receptores de andrógenos (RA). Por tanto, la terapia dirigida contra

la síntesis de andrógenos o la activación de los RA, es utilizada ampliamente. Sin embargo, el cáncer de próstata de alta agresividad, se caracteriza por su resistencia a las terapias hormonales, morfología celular menos diferenciada, rápida progresión, independencia de andrógenos y generación de metástasis.^{52,53} Esto determina que tanto el diagnóstico como tratamiento de esta enfermedad sean altamente desafiantes. Por ello, el pronóstico para una persona con CP es muy variable, dependiendo del grado y el estadío del tumor en el diagnóstico primario. En países de alto índice de desarrollo humano, los métodos actuales de detección temprana, como por ejemplo la prueba de PSA (antígeno prostático específico) y el tacto dígito-rectal, permiten el diagnóstico en una etapa temprana de la enfermedad. Debido a ello, el 80% de los hombres son diagnosticados con CP cuando la enfermedad se encuentra confinada al órgano, mientras que un 15% con metástasis local o regional y un 5% con metástasis distales. La esperanza de vida puede llegar a 99% en 10 años si la enfermedad es diagnosticada en una etapa temprana. A su vez, la prueba de PSA refleja en consecuencia la alta tasa de diagnóstico de tumores clínicamente indolentes, que progresan de manera lenta y pueden ser tratados con eficacia. Mientras que los hombres que son diagnosticados con la enfermedad en etapa tardía (metástasis distales) tienen una supervivencia de solamente del 30% a los 5 años. Por tanto, la detección temprana de la enfermedad localizada puede a su vez tener un papel fundamental no solo en los esfuerzos por aumentar la esperanza de vida de los pacientes, sino además prevenir el desarrollo de metástasis. Esto podría ser clave a la hora de orientar la terapia de los pacientes que probablemente puedan beneficiarse con un tratamiento definitivo inmediato, mientras que aquellos que no pueden ser beneficiados representan el mayor desafío clínico actual.54,55,56

Conviene enfatizar que los métodos de estadificación utilizados para evaluar el CP, como el nivel de PSA en sangre, la estadificación clínica TNM y la escala Gleason, deben ser consideradas junto a otros factores tales como la función urinaria basal, comorbilidades y la edad, a la hora de elegir el tratamiento adecuado para cada paciente. Respecto a los sistemas de clasificación, el sistema TNM considera el tamaño y la ubicación del tumor (T), si los ganglios linfáticos regionales están

18

comprometidos (N) y el desarrollo de metástasis (M). Dichos parámetros finalmente se combinan para determinar el estadío del CP.^{57,54} A su vez, la escala de Gleason clasifica el CP según su grado histopatológico. Este método se basa en el grado de diferenciación que presentan las células malignas respecto a las sanas. En tal sentido, los tumores más agresivos, con mayor probabilidad de crecimiento y de desarrollar metástasis, presentan un aspecto menos diferenciado que el tejido sano. Mientras que las células de los tumores menos agresivos, generalmente tienen un aspecto diferenciado, más parecido al del tejido sano. Es un patólogo el que examina la muestra de una biopsia, asignando la puntuación en la escala que corresponda con los patrones más predominantes en la muestra.⁵⁸ Por último, el sistema D'Amico clasifica el CP según el riesgo, teniendo en cuenta los valores de TNM, la escala Gleason y considerando el valor del PSA en sangre de la siguiente manera: bajo riesgo (PSA < 10 ng/mL, cT1-cT2a y Gleason \leq 6), riesgo intermedio (PSA 10-20 ng/mL, o cT2b, o Gleason 7) y alto riesgo (PSA > 20 ng/mL, o TNM ≥ cT2c, o Gleason ≥8).^{59,60} No obstante, actualmente existe una controversia respecto al significado clínico de los métodos mencionados. En particular, si bien el PSA en sangre ha sido validado como marcador de CP y ampliamente utilizado en el monitoreo de esta patología, su mayor limitación es que no es específico para el CP. Existen otros procesos como la hiperplasia benigna de próstata, prostatitis, retenciones urinarias agudas e incluso traumas en la próstata que pueden incrementar los niveles de PSA en sangre. Por tanto, el rango normal de PSA en sangre es incierto. A su vez, éste método no permite distinguir si el CP se encuentra localizado o diseminado. En consecuencia por todo lo anteriormente mencionado, el monitoreo de PSA en sangre puede conducir al sobrediagnóstico y tratamiento inadecuado del CP en estado indolente o no agresivo, con potencial morbilidad de los pacientes por el propio tratamiento.⁶¹

Otro punto a destacar, son los tratamientos disponibles para el CP. Los mismos varían de acuerdo al estado de avance de la enfermedad y su diseminación. En tal sentido, la vigilancia activa, la prostatectomia, la crioterapia y la radioterapia son los tratamientos estándar para pacientes con CP en un estado de avance localizado o regionalmente avanzado (estadíos I-III). La ablación de andrógenos por cirugía o la

19

castración farmacológica permiten potencialmente una remisión duradera en estadíos más avanzados (IV y III de alto riesgo). No obstante, en estados aún más avanzados (estadío IV) puede ocurrir una resistencia a la castración, que se caracteriza por mutaciones en los genes que codifican los receptores de andrógenos, lo que empeora en gran medida el pronóstico de estos pacientes. Otro tipo de tratamiento para los estadíos más avanzados que incluyan metástasis distales son la terapia hormonal y la quimioterapia. Sin embargo, los tratamientos mencionados pueden potencialmente presentar efectos adversos que afectan seriamente la calidad de vida de los pacientes, entre ellas la disfunción eréctil y la incontinencia urinaria son los más comunes. Además, en muchos casos se puede experimentar una recidiva bioquímica, es decir la elevación de los niveles de PSA en sangre sin evidencia de la enfermedad mediante las técnicas convencionales de imagenología, luego del tratamiento.^{62,63} En suma, por todo lo anteriormente mencionado, es necesario contar con marcadores moleculares más precisos, especialmente para los casos de mayor agresividad, de modo que permitan la orientación del tratamiento más adecuado para cada paciente.

1.5 Radiofármacos PET en el diagnóstico del cáncer de próstata

La incidencia del CP depende de los esfuerzos para detectar esta patología. Por lo que es fundamental poder diagnosticar y estadificar dicha enfermedad de manera precisa, de modo que se pueda seleccionar el tratamiento más adecuado para cada paciente. Como se ha mencionado anteriormente, el CP es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico y biológico, ya que puede presentar un comportamiento y evolución de amplio espectro, desde una enfermedad indolente de bajo riesgo, hasta un CP muy agresivo y resistente a la castración. Esto determina que tanto su evaluación, como su estadificación sean un gran desafío. En este sentido, las técnicas de imagenología convencionales como la tomografía computarizada (CT) y la resonancia magnética (MR), así como la técnica de medicina nuclear convencional de centellograma óseo (CO), son limitadas para la detección de invasión ganglionar o de metástasis óseas a distancia. A su vez, si
bien el CO es recomendado actualmente tanto para la estadificación como la evaluación de respuesta al tratamiento de metástasis óseas, es ampliamente reconocido que la sensibilidad de esta técnica es limitada para la detección de la enfermedad. A su vez, la técnica de CO es limitada e inespecífica para ser clínicamente útil en determinar la respuesta a un tratamiento en un estadío temprano. Las opciones de terapia tanto localizada, como sistémica, impulsan la necesidad de herramientas de diagnóstico precisas, de modo de abordar el enfoque terapéutico individual según el estadío evolutivo de la enfermedad de cada paciente. En este aspecto, en el pasado, la técnica PET desempeñaba un papel relativamente limitado en la imagenología del CP. Sin embargo, en los últimos años han surgido numerosos radiofármacos PET, que presentan mayor sensibilidad y especificidad del diagnóstico basados en la biología tumoral y el estadío de cada paciente, utilizándose tanto para la detección de metástasis en la estadificación inicial, como en los casos más complejos de recidiva bioquímica.^{64,65,66,67}

Actualmente, existen diversos radiofármacos PET para el diagnóstico del CP tanto en uso clínico, como en etapas de desarrollo. Cada uno de ellos se caracteriza por dirigirse a un blanco molecular determinado, lo que determina su especificidad, sensibilidad y limitaciones de acuerdo a cada caso.^{68,69} A continuación se describirán brevemente algunos de los radiofármacos PET más utilizados en el diagnóstico del CP, las estructuras químicas de algunos de los más relevantes se muestran en el Esquema 1.



Esquema 1. Estructuras químicas de los radiofármacos de uso clínico en cáncer de próstata de mayor relevancia.

La 2-desoxi-2-[flúor-18]fluoro-D-glucosa ([¹⁸F]FDG, Esquema 1), un análogo de la D-glucosa, es ampliamente utilizada en imagenología molecular PET, especialmente en la detección de neoplasias. Ya que este radiofármaco brinda información funcional basada en el aumento de la absorción de glucosa y transportadores de glucosa en las células tumorales, donde se produce un aumento de la glucólisis anaerobia (efecto Warburg).⁷⁰ Sin embargo, el uso de [¹⁸F]FDG en CP se limita a la re-estadificación de pacientes con alto grado de hormono-resistencia y lesiones pobremente diferenciadas, debido al alto grado de captación de [¹⁸F]FDG que se da concomitantemente con el alto grado de malignidad de la enfermedad. Además, la sensibilidad de este radiofármaco en CP es limitada, determinando que los resultados obtenidos no sean tan precisos como en otro tipo de tumores, debido a la baja actividad metabólica presente en las células de CP. A su vez, la excreción urinaria del radiofármaco, dificulta la distinción entre los ganglios linfáticos y la recurrencia local, debido a una relación lesión/fondo desfavorable, determinada por la alta actividad en la vejiga.⁷¹

Actualmente, en casos de estadificación o re-estadificación de metástasis óseas, se encuentra consolidado el uso del centellograma óseo (CO) mediante [^{99m}Tc]metildifosfonato ([^{99m}Tc]MDP, Esquema 1). Este radiofármaco se basa en el aumento de la actividad osteoblástica observadas en las metástasis óseas, permitiendo su detección de manera temprana. Sin embargo, se puede observar una alta captación de este radiotrazador en alteraciones óseas no malignas, como en traumatismos, enfermedades articulares degenerativas, entre otras, lo que puede conducir a falsos positivos. Por otra parte, las imágenes PET-CT obtenidas con [¹⁸F]NaF, a pesar de su mayor sensibilidad, aún no se consideran el método de preferencia debido a su baja rentabilidad y mayor riesgo de falsos positivos, determinado por la mayor resolución espacial que resalta un mayor número de lesiones concentradas. Por último, ninguna de estas técnicas mencionadas puede detectar una recaída local o definir la afectación de los ganglios linfáticos.^{68,72}

mediante las cuales inicialmente se utilizaron en el diagnóstico del CP, como

[¹¹C]colina, [¹⁸F]colina, [¹¹C]acetato y [¹⁸F]fluciclovine (Esquema 1). Si bien estos demostraron detectar la enfermedad a nivel ganglionar y óseo en altas tasas en comparación con [¹⁸F]FDG, las mismas no presentan ningún beneficio adicional en la detección de la enfermedad, especialmente en estadíos primarios. En este contexto, estudios recientes con los radiofármacos mencionados, no demostraron una correlación significativa entre la captación tumoral y la agresividad del mismo, además de una limitada precisión en el diagnóstico del CP.⁷³

De los radiofármacos mencionados, cabe destacar a [¹¹C]colina como el más difundido, aunque solo en centros que poseen un ciclotrón en sus propias instalaciones y también a la [¹⁸F]colina (Esquema 1). El primero posee la ventaja de presentar una excreción urinaria menor, lo que favorece el análisis del lecho prostático, sin embargo, el corto período de semidesintegración del carbono-11 (20.4 minutos), condiciona los procedimientos de adquisición de imágenes. Además, si bien la ausencia de actividad urinaria presenta una ventaja respecto a [¹⁸F]colina, al realizarse adquisiciones más cortas, la relación lesión/fondo no suele ser significativa en estos tiempos, por lo que se pueden obtener falsos negativos. Por ello, la interpretación de una recidiva local debe basarse también en parámetros morfoestructurales, para discriminar un posible falso positivo producido por lesiones inflamatorias beningnas.74 Por el contrario, [¹⁸F]colina presenta una mayor excreción urinaria, lo que dificulta el diagnóstico de una recidiva local. Sin embargo, debido al período de semidesintegración más largo del flúor-18 (109.5 minutos), es posible llevar a cabo estudios a mayores tiempos, lo que mejora la eficacia diagnóstica de metástasis ganglionares y esqueléticas. Cabe señalar que la evaluación cuando se utiliza cada uno de estos radiofármacos debe ser muy cuidadosa, debido a la posibilidad de resultados falsos positivos también en la evaluación de metástasis distales.⁷³ Por último, es necesario mencionar dos criterios clave para el uso de los radiofármacos de colina (ya sea marcado con carbono-11 o flúor-18). En primer lugar, su uso se limita exclusivamente a casos de recidiva bioquímica y a su vez en los casos clínicos donde los valores de PSA del paciente sean mayores a 3 ng/mL, ya que a valores menores su sensibilidad no es adecuada. Por otra parte, los radiofármacos de colina tampoco son adecuados para

la estadificación inicial, debido a su alto margen de error. Por ello, los mismos fueron sustituidos por el uso de derivados del antígeno de membrana prostático específico (PSMA, por sus siglas en inglés) marcados con diferentes radionucleidos (como se describirá a continuación), permitiendo bajar la sensibilidad a valores de PSA superiores a 1 ng/mL en pacientes con recidiva bioquímica.⁷⁵

En este contexto, cabe destacar la creciente importancia del antígeno de membrana prostático específico (PSMA), tanto en el diagnóstico mediante imagenología como en el tratamiento del CP. El PSMA es una proteína transmembrana con actividad folato hidrolasa, que se sobre-expresa en las células de CP. A pesar de su denominación, el PSMA también se encuentra expresado en tejidos no prostáticos como las glándulas salivales, túbulos renales e intestino delgado, aunque en un menor grado. Si bien la regulación del PSMA en la patogénesis del CP no se encuentra actualmente del todo clara, en la medida que los ligandos de PSMA son internalizados, hacen de éste un blanco molecular atractivo y actualmente el más validado para la imagenología PET del CP.^{73,76} En este sentido, el uso cada vez mayor de radiofármacos dirigidos a PSMA se basa en una creciente evidencia que se respalda en el rendimiento propicio de las imágenes obtenidas. Actualmente, se encuentran en evaluación muchos agentes de imágenes dirigidos a PSMA y dos están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA): [¹⁸F]DCFPyL (18F-piflufolostat, Esquema 1) y [⁶⁸Ga]PSMA-11(68Gagozetotide, Esquema 1). Además, están siendo evaluados en Estados Unidos en ensayos clínicos de fase III los radiofármacos: [18F]PSMA-1007 (NCT04239742 y NCT04487847), [¹⁸F]-rhPSMA-7.3 (NCT04186819 y NCT04186845), [¹⁸F]CTT1057 (NCT04838626), [⁶⁸Ga]PSMA-R2 [⁶⁴Cu]SAR-bisPSMA (NCT03490032) y (NCT04868604).^{69,77} Aunque puede haber mínimas diferencias entre cada radiofármaco, hasta el momento no hay un consenso de que un radiofármaco específico haya mejorado las características de diagnóstico en comparación con otro.^{78,79}

De los radiofármacos anteriormente mencionados para el diagnóstico del CP, en Cudim se encuentran disponibles en uso clínico los siguientes: [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]NaF, [¹⁸F]PSMA-1007, [¹⁸F]AIF-PSMA-11 (Esquema 1), [⁶⁸Ga]PSMA-11, [¹⁸F]colina y

[¹¹C]colina. Por último, se encuentra el radiofármaco [¹¹C]S-adenosilmetionina en etapa de desarrollo preclínico.

Respecto al escenario clínico y el rol del diagnóstico mediante imágenes en medicina nuclear, en el año 2016 la Asociación Americana de Urología actualizó las quías sobre el CP. Estableció cómo las políticas de monitoreo de la agresividad aumentaron la tasa detección temprana y redujeron la mortalidad de este tipo de cáncer. Sin embargo, existe aún un riesgo concreto de sobrediagnóstico y sobretratamiento, por lo que las políticas de monitoreo de la agresividad siguen siendo uno de los temas más controversiales de la literatura urológica, ya que aún no hay evidencia de nivel 1 al respecto.^{68,80,81} Al momento presente, la única prueba que puede confirmar el diagnóstico continúa siendo la biopsia, es decir tomar una pequeña muestra de tejido para un examen microscópico para brindar una escala gradual (Escala Gleason o *Gleason Score*).^{82,83} Si bien el riesgo de padecer CP a lo largo de la vida es alto, la tasa de mortalidad es baja; lo que significa que la mayoría de los hombres diagnosticados con CP no morirán a causa de la enfermedad. En este contexto, el cribado de PSA favoreció el diagnóstico de cánceres de bajo grado, lo que redujo la incidencia de enfermedad avanzada y la mortalidad, sin embargo, esto condujo en algunos casos al sobrediagnóstico y sobretratamiento. A pesar de algunas excepciones, el CP puede ser considerado un tumor de crecimiento lento, por lo tanto, se deben realizar pruebas menos invasivas antes de una biopsia, que debe limitarse únicamente a los pacientes con alta probabilidad de cáncer. No obstante, aunque no se puede evitar la biopsia, la cual es un paso decisivo antes de realizar una cirugía, el diagnóstico mediante imágenes juega un rol crucial en el algoritmo decisional del CP, que es fundamental en el manejo del paciente.^{84,85} Cabe destacar que en Cudim se cuenta con un Ecógrafo que permite la fusión de imágenes de Resonancia Magnética con Ecografía para realizar punciones dirigidas. Esto mejora el rendimiento de la técnica de biopsia de un 20 % (sin fusión) a un 90 % (biopsia con fusión). Así, en Cudim desde los inicios del año 2019 a la actualidad se han realizados unos 200 procedimientos de Biopsia por Fusión.⁸⁶

En base a lo expuesto, si bien existen diversos radiofármacos y radiotrazadores dirigidos a diferentes blancos moleculares para el diagnóstico del CP; tanto aprobados para su uso clínico, como en diferentes etapas de investigación, es necesario contar con nuevos radiofármacos dirigidos a blancos moleculares específicos que permitan predecir la agresividad de manera no invasiva, con el fin de orientar a cada paciente con un tratamiento adecuado. Por ello, en el siguiente apartado se propone un nuevo blanco molecular hacia la aplicación diagnóstica por imagenología PET, como potencial marcador de agresividad en el CP, lo que podría además orientar a un tratamiento más específico basado en la biología tumoral.

1.6 Rol de la MAO-A en el cáncer de próstata

Tal como se profundizó anteriormente, las técnicas de imagenología molecular pueden proporcionar herramientas eficaces para elucidar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y progresión del CP.^{87,88,89} El desarrollo de nuevos radiofármacos es clave en la búsqueda de moléculas dirigidas específicamente a blancos moleculares que permitan caracterizar procesos patológicos mediante técnicas mínimamente invasivas como el PET. Los radiotrazadores PET con aplicaciones en oncología es una de las áreas más activas de investigación radiofarmacéutica. Se ha descrito una considerable cantidad de artículos demostrando que los tumores malignos pueden ser detectados con una alta sensibilidad y especificidad mediante imagenología PET. 90,91,92,93 En este sentido, las enzimas son un blanco molecular atractivo para la obtención de imágenes mediante PET, debido a la gran versatilidad a la hora de diseñar inhibidores o sustratos marcados que permitan generar imágenes y medir los niveles de expresión enzimática. Ya que tanto la expresión enzimática, como la actividad enzimática, tienen un rol determinante en los procesos fisiológicos normales, así como también sus mecanismos de regulación son críticos en el desarrollo y la progresión de muchas patologías.^{94,95,96} En este contexto, en los últimos años se estableció una relación directa entre el alto grado de agresividad

del CP (Escala Gleason 4 o 5) y la sobreexpresión de la enzima monoamino oxidasa A (MAO-A).^{97,98}

Las monoamino oxidasas son flavoproteínas presentes en la membrana mitocondrial externa, que catalizan la degradación por desaminación oxidativa de aminas tanto endógenas (por ejemplo: neurotransmisores), como aminas exógenas (por ejemplo: aminas de la dieta). En los mamíferos existen dos isoformas de esta enzima, MAO-A y MAO-B, que se distinguen en base a la especificidad por su sustrato y a la sensibilidad frente a inhibidores específicos. Ambas isoformas se expresan en la mayoría de los tejidos, pero su expresión es particularmente importante en el sistema nervioso central (SNC), debido a su rol fundamental en el metabolismo de neurotransmisores. Además, la MAO-A presenta una importante expresión en el tracto gastrointestinal, pulmones, hígado y placenta. Del hecho que MAO-A presente un rol biológico conservado en el metabolismo de las aminas, se infiere que la misma puede participar en funciones celulares cruciales, como el control del crecimiento, diferenciación celular, mantener de reservas de poliaminas y regulación de los niveles de neurotransmisores. El metabolismo de aminas biogénicas como la dopamina y la epinefrina mediante el mecanismo de desaminación oxidativa, para obtener sus correspondientes metabolitos, produce especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Por ello, la alta expresión de MAO-A ha sido relacionada no solo con desórdenes neurológicos como la ansiedad y la depresión, y enfermedades neurodegenerativas, sino que también en las últimas décadas, se han publicado artículos que relacionan la producción de ROS mediada por MAO-A con el desarrollo y la progresión de tumores. 99,100

En este sentido, en los últimos años, han surgido numerosos artículos en revistas de alto impacto, como disparadores en la propuesta de validar a la enzima MAO-A como potencial blanco de terapia en el CP.^{101,102,103,104,105} Diferentes estudios destacan la implicación de la MAO-A como mediadora de la tumorigénesis y metástasis del CP.^{103,106,107} Además, se observó que tanto la inhibición farmacológica de la actividad de MAO-A, utilizando clorgilina (esquema 2) como inhibidor selectivo e irreversible, así como la desactivación a nivel de expresión

génica de MAO-A (modelo *knockdown*), redujo o incluso eliminó el crecimiento de tumores de próstata y la metástasis en modelos de ratón con tumores xenográficos de CP.¹⁰³ A su vez, cabe destacar que la alta expresión de MAO-A se ha correlacionado con peores resultados clínicos en pacientes con CP y con niveles más elevados de PSA sérico en pacientes al diagnóstico.^{108,109,104}

Por otra parte, la terapia de privación de andrógenos es el tratamiento estándar para el CP con desarrollo de metástasis. Desafortunadamente, la mayoría de los antiandrógenos disponibles fallan eventualmente, incluyendo al potente antiandrógeno enzalutamida.^{110,111} Como resultado, la resistencia a la castración representa una etapa letal de la enfermedad con opciones de manejo limitadas. Un estudio reciente, indica que la alta expresión de MAO-A está asociada con la detección positiva de la variante del receptor de andrógenos ARv7, en pacientes con CP resistente a la castración (CPRC) posterior al tratamiento con enzalutamida. En este contexto, se observó que los inhibidores de MAO-A clorgilina y fenelzina (un inhibidor no selectivo de MAO-A aprobado por la FDA para la depresión, Esquema 2), fueron capaces de revertir la resistencia a la enzalutamida en el CPRC.¹¹² Estos resultados resaltan el potencial de la enzima MAO-A como blanco molecular de fármacos antidepresivos ya conocidos como una nueva terapia, ya sea como agentes únicos o en combinación con los antiandrógenos estándar actuales.¹¹³ En este sentido, se llevó a cabo recientemente un ensayo clínico de fase II con el fármaco fenelzina para casos de recidiva de CP sin desarrollo de metástasis.¹¹⁴ Los primeros resultados con una dosis única de fenelzina en un grupo pequeño de pacientes fueron prometedores. Esto hace pensar que inhibidores selectivos de MAO-A podrían ser una opción de tratamiento prometedora para hombres con cáncer de próstata con alta agresividad. Por lo tanto, el conjunto de antecedentes anteriormente mencionados incentivan la consideración de la MAO-A como un blanco de imagenología molecular en el CP de alto grado de agresividad.^{108,115}

Otro punto a destacar, es que el potencial de la técnica PET para generar imágenes de procesos bioquímicos de forma mínimamente invasiva, ha impulsado numerosas aplicaciones en la investigación científica básica y clínica.¹¹⁶ Por ejemplo, la

traslación de la imagenología molecular en etapa preclínica a las aplicaciones clínicas con el fin de lograr una medicina personalizada requiere un enfoque de individualización en todas las etapas, comenzando por el diagnóstico, el tratamiento y el monitoreo de la respuesta o seguimiento. Para poder implementar este enfoque se requiere disponer de agentes moleculares específicos.^{117,118,119} De esta manera, se podría aportar información valiosa sobre la estadificación, del grado de malignidad y metástasis del CP, así como potencialmente proponer una terapia específica en pacientes con tumores que presenten alta expresión de MAO-A. Además, dentro de este marco, otras características de MAO-A proporcionan razón adicional para plantear su potencial utilidad como blanco molecular en imagenología molecular hacia la evaluación del CP de alta agresividad. Cabe destacar que muchos inhibidores de MAO-A actualmente se encuentran en fases de estudios preclínicos avanzados o son aprobados en uso clínico de rutina para enfermedades psiquiátricas, por lo que sus perfiles de seguridad y toxicidad están bien establecidos. A su vez, propiedades enzimáticas de MAO-A a nivel del sistema nervioso central han sido ampliamente estudiadas mediante PET, basados en agentes imagenológicos tanto en modelos animales seres como en humanos.^{120,121,122} Estas características proporcionan razones adicionales para proponer el estudio de MAO-A como blanco molecular en imagenología molecular para su aplicación en la evaluación y diagnóstico de CP de alta agresividad.

Como ya se hizo mención, en los últimos años inhibidores selectivos de MAO-A han sido marcados tanto con carbono-11 como con flúor-18 y evaluados como potenciales radiotrazadores PET, principalmente a nivel del sistema nervioso central. En tal sentido, cabe destacar al grupo del Prof. Bengt Langström, quién ha estudiado en profundidad el desarrollo y aplicación de radiotrazadores PET como por ejemplo [¹¹C]clorgilina ya mencionado, y además [¹¹C]harmina, un inhibidor reversible selectivo de MAO-A. En particular, en el año 2003 se publicó un trabajo por parte del grupo del Prof. Langström, donde el objetivo fue investigar algunas de las vías de procesamiento de monoaminas en tumores gastroenteropancreáticos neuroendocrinos (GEP, ej. carcinoides y tumores pancreáticos endócrinos) e intentar encontrar un radiotrazador para la caracterización y visualización *in vivo*

mediante PET. Dados los prometedores resultados in vitro obtenidos sobre la expresión de MAO-A en estos tumores con el trazador [¹¹C]harmina (alto nivel de unión específica en comparación con el tejido de referencia), se llevaron a cabo estudios PET en 4 pacientes con carcinoides de intestino medio y 7 pacientes con tumores pancreáticos endócrinos. Así, mediante la utilización de [¹¹C]harmina como radiotrazador PET se pudieron visualizar tumores en todos los pacientes, en los cuales los hallazgos morfológicos fueron correlacionados mediante tomografía computada. Esto demostró que los tumores neuroendocrinos se caracterizan por una alta expresión de MAO-A, indicando así una posible aplicación de [¹¹C]harmina como un nuevo radiotrazador PET para tumores neuroendocrinos.¹²³ Además, otro antecedente incluso anterior del grupo del Prof. Langström, evidenció una alta expresión de la enzima MAO-A en muestras de pacientes de cáncer de vejiga urinaria utilizando [¹¹C]harmina. Estos prometedores resultados hicieron pensar a los autores en la posibilidad que la caracterización in vivo de MAO-A en cáncer de vejiga es factible mediante [¹¹C]harmina y podría utilizarse con fines de diagnóstico o para la monitorización del tratamiento.¹²⁴ Más recientemente, otros trabajos han demostrado que un derivado de harmina marcado con fúor-18 (2-[18F]fluoroetilharmol), ha presentado excelente afinidad por la enzima MAO-A tanto in vitro como in vivo, convirtiendo a este radiotrazador en un candidato prometedor para la visualización de MAO-A mediante PET. 125,126

Vale la pena destacar que el versátil colorante azul de metileno (Esquema 2), ha tenido resultados antiproliferativos alentadores *in vitro* en líneas celulares humanas de cáncer de próstata, especialmente en la línea celular LNCaP que sobreexpresa MAO-A. Estos estudios sugieren que el azul de metileno tiene un potencial en la supresión tumoral y que podría a su vez presentar funciones anti-metastásicas.¹²⁷ Coincidentemente azul de metileno es un potente inhibidor de MAO-A, el cual presenta características farmacológicas muy interesantes y tiene la ventaja de ser un fármaco aprobado por la FDA.^{128,129} Además, ha sido marcado con carbono-11 y evaluado en líneas celulares de melanoma.^{130,131} Por lo tanto, en base a los antecedentes anteriormente marcados con emisores de positrones, podrían ser

candidatos apropiados para la visualización de MAO-A mediante imagenología PET en CP de alta agresividad.

Por último, cabe destacar otro antecedente el cual refuerza la idea planteada, donde el grupo de Wu y colaboradores, desarrolló un inhibidor selectivo de MAO-A, basado en un derivado de clorgilina unido a una sonda de infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés). La evaluación in vitro de este compuesto mostró inhibición de MAO-A a una baja concentración micromolar y un efecto de supresión en la proliferación en líneas celulares humanas de CP, reduciendo su capacidad de migración e invasión. A su vez, la evaluación in vivo en ratones con tumores inducidos con las líneas celulares mencionadas, mostraron que el tratamiento con el derivado clorgilina-NIR redujo en gran medida la carga tumoral, respecto al grupo control. La particularidad de este estudio, no solo radica en el punto de vista terapéutico, sino además en el seguimiento y evaluación mediante imagenología óptica que se llevó a cabo con el derivado de clorgilina unido a una sonda NIR.¹³² En suma, a partir de todos los antecedentes mencionados, se desprende la hipótesis de que la visualización de la enzima MAO-A mediante imagenología PET, podría utilizarse como herramienta tanto en el diagnóstico como en la propuesta de tratamiento específico de CP de alta agresividad. Lo que sería de gran utilidad a la

hora de orientar y monitorear una terapia de esta heterogénea patología, ya sea mediante los métodos clínicos estándares utilizados actualmente, o en sintonía con inhibidores selectivos de MAO-A como potenciales agentes terapéuticos. El estado del arte al momento de la escritura del presente apartado, indica que este tipo de evaluación mediante imagenología PET no ha sido reportada previamente, lo que destaca la relevancia del presente trabajo de tesis de doctorado.



Esquema 2. Se muestran estructuras químicas de diferentes inhibidores de MAO-A.

2. Objetivos y estrategia de trabajo

2.1 Objetivo general

Como objetivo general, el presente trabajo de tesis de doctorado en química, plantea el estudio inicial de radiotrazadores emisores de positrones para la evaluación y posible diagnóstico de cáncer de próstata de alta agresividad, mediante la visualización de imágenes PET de la enzima monoamino oxidasa A (MAO-A).

2.2 Objetivos específicos

Para cumplir con el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1:

Establecer protocolos de producción y control de calidad para los radiotrazadores [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]azul de metileno, [¹¹C]harmina y 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol.

Objetivo específico 2:

Generar un modelo tumoral xenográfico de cáncer de próstata en ratones *nude,* inducidos tanto con una línea celular humana de cáncer de próstata que sobreexprese el blanco molecular (MAO-A), así como un control negativo utilizando una línea celular con expresión limitada del mismo.

Objetivo específico 3:

Evaluar los radiotrazadores seleccionados tanto *in vitro* en líneas celulares humanas de cáncer de próstata, así como en los modelos animales tumorales, tanto *in vivo* mediante imagenología molecular PET, como *ex vivo* mediante ensayos de biodistribución.

2.3 Estrategia de trabajo

Los radiotrazadores seleccionados a estudiar son [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]azul de metileno, [¹¹C]harmina y 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol, basándonos en los antecedentes desarrollados en el capítulo introducción (rol de la MAO-A en el cáncer de próstata). Estos reconocidos inhibidores selectivos de MAO-A, serán marcados con carbono-11 o flúor-18 mediante la utilización de plataformas de radiosíntesis semiautomatizadas. Para llevar a cabo estudios biológicos en modelos de cáncer de próstata, nos planteamos inicialmente tanto la realización de experimentos *in vitro* en líneas celulares humanas de cáncer de próstata, como *in vivo* en un modelo de ratón con tumor xenográfico inducido con las mismas líneas celulares. En ambos estudios se utilizará tanto una línea celular que sobre-expresa el blanco molecular MAO-A (control positivo, LNCaP), como una línea celular con expresión limitada de MAO-A (control negativo, PC3). Los estudios de captación tumoral se llevarán a cabo tanto *in vivo* mediante la adquisición de imágenes PET-CT, como mediante ensayos de biodistribución *ex vivo*.

Con el fin de cumplir con los objetivos específicos, se llevará a cabo la siguiente estrategia de trabajo:

Objetivo específico 1

Obtención de precursores orgánicos adecuados para su marcación con carbono-11 o flúor-18, con el fin de generar los radiotrazadores seleccionados mediante diferentes estrategias de radiosíntesis en las plataformas semi-automatizadas de Cudim:

i) Sustitución nucleofílica con [¹⁸F]KF sobre un derivado de harmol adecuadamente sustituido con un buen grupo saliente para obtener 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol.

ii) $N \ y$ O-metilación nucleofílica con [¹¹C]Mel o [¹¹C]MeOTf sobre nor-clorgilina, azure B, o harmol, para obtener [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]azul de metileno y [¹¹C]harmina, respectivamente.

Objetivo específico 2

Inducción de tumores xenográficos en ratones atímicos *nude*, utilizando las líneas celulares humanas de cáncer de próstata LNCaP (sobre-expresa MAO-A) y PC3 (expresión limitada de MAO-A).

Objetivo específico 3

Caracterización biológica inicial *in vitro* e *in vivo* de los radiotrazadores obtenidos mediante:

Estudios *in vitro* de internalización celular en una la línea que sobre-expresa MAO-A (LNCaP) como control positivo, y una línea con expresión limitada de dicho blanco molecular como control negativo (PC3).

Estudios *ex vivo* de biodistribución en modelo de ratón con tumor xenográfico inducido con líneas celulares humanas de CP, tanto con células que sobre-expresan MAO-A (LNCaP) como control positivo, como una línea con expresión limitada de dicho blanco molecular como control negativo (PC3).

Adquisición, procesamiento y análisis de imágenes PET-CT (técnica PET acoplada a tomografía computada), en los dos modelos de ratón con tumores xenográficos inducidos con líneas celulares humanas de cáncer de próstata a distintos tiempos, en cámara PET-CT para pequeños animales con la que cuenta Cudim.

3. Obtención de Inhibidores de MAO-A marcados con carbono-11 y flúor-18

3.1 Obtención de Inhibidores de MAO-A marcados con carbono-11

3.1.1 Introducción

Estrategias de radiosíntesis

Se denomina proceso de marcación o radiomarcado, a la reacción química mediante la cual un radionucleido determinado (precursor radiactivo bajo forma iónica o molecular) es incorporado en una molécula precursora (generalmente orgánica) no radioactiva, para generar un radiotrazador en particular. Las reacciones radioquímicas más comunes son las sustituciones (marcaciones habituales con 11C o 18F) o adiciones (generalmente reacciones de complejación con radiometales). Este proceso presenta como principal desafío el desarrollo de metodologías sintéticas que permitan la incorporación de radionucleidos emisores de positrones con período de semidesintegración relativamente corto de forma eficiente, en las moléculas de interés.¹³³ En este sentido, los procedimientos de marcado, purificación y formulación, que comprenden lo que se conoce como el proceso de producción de una molécula marcada, deben llevarse a cabo generalmente en un tiempo no mayor a dos períodos de semidesintegración del radionucleido en cuestión. Ya que de lo contrario los rendimientos individuales de cada procedimiento, en adición al decaimiento físico del radionucleido utilizado, pueden disminuir en gran medida el rendimiento radioquímico de la molécula marcada obtenido al final del proceso de producción. De la misma manera, los análisis realizados en el control de calidad que determinarán la aptitud de un radiotrazador para ser utilizado en un organismo vivo, no debe superar un tiempo mayor a un período de semidesintegración del radionucleido utilizado.¹³⁴ En la Figura 8 se esquematizan las etapas mediante las cuales generalmente se lleva a cabo la producción de un radiotrazador.



Figura 8. Etapas generales de la producción y control de calidad de un radiotrazador. En términos generales, los procesos involucrados deben ser rápidos y eficientes, pudiéndose describir de manera esquemática de la siguiente manera: i) producción del radionucleido; ii) preparación del agente de marcación (a partir del precursor radioactivo primario); iii) Reacción de marcación (reacción entre el precursor radioactivo y el precursor orgánico donde será incorporado); iv) remoción de grupos protectores (en caso de que estén presentes) del precursor orgánico (este paso es en general requerido en ciertas marcaciones con flúor-18) purificación de la molécula marcada (eliminación de impurezas químicas y radioquímicas), formulación y filtración esterilizante (en un medio adecuado para su aplicación en un organismo vivo); vi) luego de controlar los parámetros prestablecidos en el control de calidad se determinará si el radiotrazador cumple con los requerimientos para ser liberado para su uso.

Por otra parte, las altas dosis de radiación a las cuales el personal se expone al llevar a cabo los procesos de producción de radiotrazadores, no permite que los mismos puedan realizarse en una mesada de laboratorio tradicional, sino que se utilizan módulos de síntesis automatizados dentro de estructuras blindadas denominadas *"hotcells"* (Figura 9). A su vez, la utilización de módulos semi-automatizados tiene como finalidad garantizar la protección radiológica del operador y la reproducibilidad del proceso de síntesis.¹³⁵



Figura 9. Módulo semi-automatizado de síntesis para radiotrazadores de carbono-11 TRACERLAB FX C Pro de GE (izquierda). Celda blindada (*hotcell*) MIP-1 (Comecer) del laboratorio de investigación del Departamento de Radiofarmacia de Cudim.

En este contexto, en las últimas décadas se han desarrollado diversas rutas sintéticas para la obtención de radiotrazadores PET. Principalmente para la incorporación de flúor-18 (el cuál se verá en su sección correspondiente) y carbono-11 (el cual se hará hincapié en la siguiente sección). Dichos radionucleidos son incorporados en precursores de interés mediante diversas metodologías de química orgánica, lo que hace que el número de radiotrazadores que incorporan dichos radionucleidos sea considerablemente mayor a otros, como el oxígeno-15, nitrógeno-13 o el galio-68. El ¹⁵O y el ¹³N, presentan un período de semidesintegración muy corto, aproximadamente de 2 minutos y 10 minutos

respectivamente, lo que se refleja en la escasa cantidad de radiotrazadores que presentan estos radionucleidos (por ejemplo: [¹⁵O]H₂O y [¹³N]NH₄Cl).¹³⁶ Por último, el ⁶⁸Ga al tratarse de un radiometal utiliza otro tipo de estrategias de marcación basadas en anillos quelantes acoplados a moléculas con propiedades biológicas de interés, como polipéptidos derivados de hormonas, etc.¹³⁷ La descripción de dichas estrategias excede el alcance del presente trabajo, el cual se centrará en las estrategias de marcación con flúor-18 (como se describirá en un apartado más delante) y las estrategias de marcación con carbono-11, que se describirán a continuación.

Estrategias de marcación con carbono-11

El carbono es uno de los principales elementos del cual se componen las biomoléculas. Por lo tanto, el radiomarcado de ciertas moléculas de relevancia biológica con carbono-11 es de gran importancia para la imagenología PET.^{138,139} Debido a que el comportamiento de dichos compuestos sería indistinguible de sus homólogos sin marcar, con la excepción de un efecto isotópico cinético muy pequeño. Es importante tener en cuenta este asunto, ya que en algunos casos la introducción de flúor-18 en determinadas moléculas, puede alterar sus propiedades biológicas al tener una diferencia en su estructura química respecto a su homólogo natural correspondiente. Por otra parte, el corto período de semidesintegración del carbono-11 (t1/2 20.4 min), hace que no sea factible su transporte desde el sitio donde se produce a hospitales o centros PET lejanos. A pesar de ello, el creciente interés en imagenología molecular PET por los radiofármacos de carbono-11 ha determinado que sean utilizados en hospitales o centros PET que cuenten con ciclotrones en sus propias instalaciones. En este contexto, cabe destacar que el corto período de semidesintegración del carbono-11 puede resultar ventajoso en estudios longitudinales *in vivo*, donde se tengan que realizar repetidas inyecciones en un sujeto de estudio (paciente o animal) en un mismo día, incluso previamente al estudio con otro radiofármaco que emplee un radionucleido diferente. A su vez, a pesar del corto t1/2 del carbono-11, se han desarrollado una amplia gama de

reacciones para marcar de manera satisfactoria diversas moléculas de interés con este radionucleido. Por lo tanto, las estrategias radiosintéticas representan un desafío desde el punto de vista de la síntesis orgánica tradicional, donde comúnmente los tiempos de reacción y purificación son prolongados. A nivel radioquímico se intenta minimizar el número de etapas sintéticas, reducir el tiempo de las mismas o simplificarlas a los efectos de aumentar el rendimiento radioquímico. Muchas de estas estrategias se basan en reacciones de química orgánica convencional, teniendo en cuenta que existen diferencias significativas inherentes a la naturaleza radioactiva de los precursores.¹⁴⁰ En este contexto, una particularidad de los compuestos radioactivos, es la posibilidad de sufrir descomposición por un fenómeno denominado radiólisis. Este implica la descomposición causada directa o indirectamente por la energía de su propia emisión radioactiva. Se presentan transformaciones promovidas por la energía que una molécula recibe de las moléculas que la rodean (radiólisis primaria) o por especies radicalarias generadas por la irradiación del medio (Ejemplo: disolvente) en el cual se encuentran (radiólisis secundaria).¹⁴¹ Otra particularidad importante a tener en cuenta en las reacciones que involucran precursores radiactivos, es que éstos están presentes en cantidades muy pequeñas (aprox. 1x10⁻¹¹ mol) en comparación con las utilizadas en la síntesis orgánica tradicional (aprox. 1x10⁻⁵ mol). En estas condiciones se puede notar claramente el defecto estequiométrico en el cual se encuentran los precursores radiactivos. Por lo tanto, bajo estas condiciones de reacción se hace necesario una elevada pureza tanto de precursores orgánicos como de disolventes de marcación, evitando o minimizando reacciones competitivas y en consecuencia la formación de productos no deseados. Sin embargo, el defecto esteguiométrico del precursor radiactivo hace que las reacciones sean de cinética de pseudo-primer orden respecto a esta especie. De esta forma, reacciones que no son viables a escala estequiométrica, se vuelven útiles en las condiciones de marcación (por ejemplo: mono-11C-metilación de aminas con [¹¹C]CH₃I o [¹¹C]CH₃OTf).¹⁴⁰ En este marco, la producción de carbono-11 a nivel del ciclotrón puede llevarse a cabo mediante dos estrategias diferentes, las cuales determinan el tipo de precursor primario obtenido. De acuerdo con la

reacción nuclear que se describe debajo, la cual consiste en bombardear ${}^{14}N_2$ (g) 99 % con protones, si se adiciona una impureza de 0.1% de ${}^{16}O_2$, se obtiene [${}^{11}C$]CO₂ como precursor primario y la emisión de una partícula alfa. Por otra parte, si se bombardea con protones ${}^{14}N_2$ (g) 99% impurificado con 0.1 % de H₂, el precursor primario obtenido será [${}^{11}C$]CH₄ y también se emitirá una partícula alfa.

 ${}^{14}N(p,\alpha){}^{11}C ({}^{14}_{7}N + {}^{1}_{1}p \rightarrow {}^{11}_{6}C + {}^{4}_{2}He)$

En este sentido, la mayoría de las síntesis que involucran carbono-11, comienzan con la obtención de [¹¹C]CO₂ o [¹¹C]CH₄. A estas especies se las conoce como "precursores primarios", ya que pueden ser convertidos en otro tipo de "precursores secundarios" de diferente reactividad química, para ser incorporados en moléculas orgánicas de interés mediante diferentes estrategias (esquema 3).^{136,140} Esta multiplicidad de precursores radioactivos de carbono-11, permite obtener una variedad de grupos orgánicos funcionales, los cuales se encuentran presentes en biomoléculas y fármacos. Además, se puede destacar que una misma estructura orgánica puede ser marcada en diferentes posiciones moleculares. Esta posibilidad puede lograr en determinadas situaciones que una metabolización in vivo no elimine el carbono-11 del radiotrazador en estudio.



Esquema 3. Precursores primarios y secundarios utilizados en la marcación de moléculas orgánicas con carbono-11. Se muestra la amplia gama de precursores con carbono-11 que pueden ser utilizados para la producción de radiotrazadores. Dentro del recuadro azul, se muestran los precursores primarios obtenidos en ciclotrones a partir de la reacción nuclear ¹⁴N(p, α)¹¹C. Tomado de referencia 140.

Como se mencionó anteriormente, con el fin de obtener un radiotrazador de carbono-11, se debe incorporar dicho radionucleido en un precursor adecuado, para ello se utiliza un amplio espectro de reacciones basadas en la química orgánica. Entre ellas, las más comúnmente utilizadas y de especial relevancia para el presente trabajo, son las metilaciones directas, que utilizan agentes metilantes como yoduro de metilo ([¹¹C]MeI) o triflato de metilo ([¹¹C]MeOTf). Además, existen otras estrategias como metilaciones mediadas por paladio, reacciones de Grignard, carbonilaciones (que utilizan [¹¹C]CO), cianaciones (que utilizan [¹¹C]HCN), fijación y reducción directa del [¹¹C]CO₂ obtenido del ciclotrón, entre muchas otras, cuyos detalles exceden el alcance del presente trabajo.^{142,143,144} En este contexto, en este trabajo de tesis se utilizó la estrategia de N y O-alquilación directa convencional y

una estrategia poco convencional de sustitución nucleofílica aromática mediada por [¹¹C]dimetilamina. Las mismas se detallarán a continuación.

Como ya se mencionó, las reacciones de alguilación que utilizan [¹¹C]Mel o [¹¹C]MeOTf son ampliamente utilizadas para introducir carbono-11 en moléculas de interés que presenten heteroátomos como Oxígeno (O), Nitrógeno (N) o Azufre (S) en su estructura. De esta manera, el [¹¹C]Mel puede ser preparado como precursor secundario por dos métodos. El primero, casi en desuso, es denominado "método húmedo", el cual consiste en reducir el [¹¹C]CO₂ a [¹¹C]MeOH mediante LiAlH₄, seguido de un tratamiento con HI. Por otra parte, mediante el "método gaseoso", se obtiene el [¹¹C]Mel directamente desde el precursor primario [¹¹C]CH₄ en presencia de vapor de iodo (I₂) a alta temperatura. El [¹¹C]CH₄ puede ser producido directamente en el ciclotrón como se mencionó anteriormente, o puede ser obtenido a partir de la reducción de [¹¹C]CO₂ generado en ciclotrón mediante una reacción favorecida por calor y un catalizador adecuado (Níquel-Shimalite). Si bien esta última estrategia involucra un paso adicional, los rendimientos totales de obtención de [¹¹C]Mel son mejores, ya que por otra parte la reacción nuclear para producir directamente [¹¹C]CH₄ a nivel de ciclotrón, presenta un muy pobre rendimiento. Además, cabe destacar que las reacciones de metilación que utilizan [¹¹C]MeOTf como agente alquilante, pueden ser llevadas a cabo a temperaturas menores, con cantidades más pequeñas de precursor orgánico y en tiempos de reacción más cortos, debido a la mayor reactividad de este agente respecto al [¹¹C]Mel.¹⁴⁵ Las reacciones de metilación mencionadas, pueden ser llevadas a cabo tanto en solución, barboteando el agente metilante directamente en el disolvente, como en fase sólida utilizando un soporte adecuado (por ejemplo un cartucho SEP-PAK) a través del cual se hace pasar el agente alguilante. Con este fin, se utilizan a su vez distintos disolventes orgánicos y de ser necesario, una base para realizar desprotonaciones, favoreciendo la nucleofilia del heteroátomo. En el Esquema 4 se muestra una reacción general de metilación.146,147

$$RX : \xrightarrow{H_3^{11}C-Y} R-X-^{11}CH_3 \qquad X= O,N, S. Y=I, OTf.$$

Esquema 4. Metilaciones con carbono-11. Se muestra un esquema general de [¹¹C]metilación sobre un heteroátomo (O, N, S) con [¹¹C]MeI o [¹¹C]MeOTf. Siendo RX, el precursor orgánico adecuado.

Por otra parte, es importante destacar que la presencia de CO₂ "frío" presente en el aire ([¹²C]CO₂) puede afectar significativamente la actividad molar si no se tienen en cuenta los cuidados necesarios. La actividad molar, se define como la actividad medida por mol de compuesto; expresada generalmente en GBq/ μ mol; y se calcula como la relación entre la actividad final y los moles de compuesto teniendo en cuenta todos los isótopos del radionucleido en cuestión. En el caso del carbono-11, de deben tener en cuenta tanto su isótopo estable más abundante (¹²C) como otros isótopos naturales tales como el ¹³C y el ¹⁴C. En este sentido, es necesario minimizar la presencia de [¹²C]CO₂ mediante el correcto acondicionamiento de los módulos de síntesis y el target del ciclotrón. A estos procedimientos se los conoce como "delivery caliente" y "delivery frío". El "delivery caliente" consiste en realizar una pequeña irradiación y enviarla a descarte con el fin de eliminar la mayor parte del [¹²C]CO₂ que pueda haberse acumulado en el *target* del ciclotrón. Por otra parte, el "delivery frío" consiste en enviar el contenido remanente del target del ciclotrón al módulo de síntesis. De esta manera, se arrastrar el [¹²C]CO₂ que pueda estar presente en las líneas y finalmente se lleva a cabo una reducción del mismo a metano, para luego enviarlo al descarte. En este contexto, la actividad molar es crucial cuando se trabaja con sistemas saturables como enzimas o sistemas ligando-receptor específicos. La introducción de "masa fría" (no radioactiva) puede hacer que el homólogo del radiotrazador que presenta un isótopo no radioactivo, compita con el radiotrazador alterando la adquisición final de imágenes o incluso provocando un efecto farmacológico no deseado.^{148,149}

Por último, como se describirá en el apartado correspondiente a la obtención de [¹¹C]azul de metileno, se utilizó una estrategia poco convencional basada en el uso de [¹¹C]dimetilamina para la incorporación de carbono-11. La misma consiste en la incorporación de [¹¹C]dimetilamina, la cual es obtenida mediante la *N*-metilación por vía clásica de metilamina con [¹¹C]MeI, para luego incorporarse en el precursor adecuado mediante una reacción de sustitución nucleofílica. A diferencia de las metilaciones clásicas, en este caso el precursor orgánico actuaría como electrófilo (Esquema 5).¹⁵⁰



Esquema 5. Metilación con carbono-11 mediante [¹¹C]dimetilamina. Se muestra de manera esquemática, la formación del precursor radioactivo nucleofílico ([¹¹C]dimetilamina) y su posterior incorporación a un precursor orgánico electrofílico (R-X).

En base a lo expuesto en el presente apartado, se puede concluir que el carbono-11, posee una serie de características que le permiten una gran versatilidad para ser incorporado en diferentes radiotrazadores, no alterando las propiedades biológicas respecto a sus homólogos naturales. Por lo tanto, un análogo marcado con carbono-11 (marcado isotópico) presentara un comportamiento fisicoquímico y bioquímico virtualmente idéntico al de la molécula no marcada. A su vez, su corto período de semidesintegración no debe ser contemplado como una desventaja, sino como una característica del mismo que puede ser utilizada de manera ventajosa en casos de estudios con dosis múltiples o múltiples radiotrazadores en un mismo sujeto. Por lo tanto, el cabono-11 puede ser considerado como una excelente y versátil opción, a la hora de desarrollar un nuevo radiotrazador emisor de positrones.

3.1.2 Radiosíntesis y control de calidad de [11C]clorgilina

3.1.2.1 Parte experimental

Materiales y equipos utilizados en la síntesis orgánica de estándares y precursores de [¹¹C]clorgilina

Todos los productos químicos y disolventes se adquirieron de fuentes comerciales (Merck, Dorwil, Sigma-Aldrich, Carlo Erba), grado analítico y a menos que se indique lo contrario, fueron utilizados sin purificación adicional. La TLC analítica se realizó en placas de sílica gel 60F-254, y fueron visualizadas con luz UV (254 nm) y/o *p*-anisaldehído en una solución etanólica ácida o vapores de yodo. Las cromatografías en columna se llevaron a cabo utilizando sílica flash (Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm, Machery-Nagel) u óxido de aluminio (90 neutro, Machery-Nagel). Los espectros de RMN se obtuvieron en diferentes disolventes deuterados a 400 MHz en un equipo Bruker Avance DPX-400. La asignación de los desplazamientos químicos se realizó en base a experimentos de RMN estándares (¹H, ¹H-COSY, HSQC, HMBC y ¹³C). Los valores de los desplazamientos químicos fueron expresados en ppm en relación con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno, y las constantes de acoplamiento se expresaron en Hertz, seguido de la multiplicidad indicada como s: singulete, d: doblete, t: triplete, q: cuarteto o combinación, sa: señal amplia, o m: multiplete.

3-(2,4-diclorofenoxi)-propan-1-ol (1):

Se disuelve 2,4-diclorofenol (1 g, 6.14 mmol) en EtOH (10 mL) y se deja agitar la mezcla a temperatura ambiente por pocos minutos. Seguidamente se agrega 3bromo-1-propanol (0.56 mL, 6.14 mmol) y una solución de NaOH (294.4 mg, 7.36 mmol) en H₂O (1.2 mL). La mezcla se calienta a reflujo durante 4 horas, se detiene el calentamiento y se deja agitando a temperatura ambiente toda la noche. Se detiene la agitación, se evapora el etanol a presión reducida y el residuo se disuelve en 30 mL de Et₂O. Se lava la capa etérea con una solución de NaCl saturado (3 x 15mL) hasta alcanzarse un pH neutro, luego se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida para obtenerse **1** como un sólido blanco cristalino (1.3 g, R: 96%), el cual fue utilizado en la siguiente reacción sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.39 (d, *J*=2.8Hz, 1H), 7.22 (dd, *J*=8.8 Hz, 2.4, 1H), 6.90 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 4.21 (t, *J*=6.0Hz, 2H), 3.95 (sa, 2H), 2.15-2.09 (m, 2H), 2.03 (sa, 1H).



3-(2,4-diclorofenoxi)propil (4-metilfenil)sulfonato (2):

Se prepara una disolución del alcohol 1 (2.56 g, 11.58 mmol) en CH₂Cl₂ seco (30 mL) bajo atmósfera inerte (N₂), se coloca la mezcla en un baño de agua-hielo y se agrega trietilamina (2.58 mL, 18.53 mmol). Seguidamente se agrega gota a gota una disolución de cloruro de p-toluensulfonilo (2.64 g, 13.90 mmol) en CH₂Cl₂ seco (13 mL) durante un período de 20 minutos. La mezcla se deja agitando unos pocos minutos y se retira el baño de agua-hielo. La mezcla se agita a temperatura ambiente por un período de 25 horas, seguidamente se vuelca la disolución en H₂O/hielo (35 mL) y se realizan lavados de la capa orgánica con una solución de NaCl saturado (4 x 15 mL). Luego se realizan sucesivos lavados con HCl 10% (2 x 15mL), NaCl sat. (1 x 15 mL), NaHCO₃ (2 x 15 mL) y NaCl sat. (2 x 15 mL) hasta alcanzar un pH neutro. Seguidamente se seca la capa orgánica con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida hasta obtenerse un sólido. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna (Al₂O₃ flash, Hexano:Acetato de etilo 8:2) obteniéndose 2 como un sólido blanco (2.84 g, R: 67%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.34 (d, J=2.4Hz, 1H), 7.24 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.18 (dd, J=8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.74 (d, J=8.8 Hz, 1H), 4.32 (t, J=6.0Hz, 2H), 3.99 (t, *J*=5.6Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.21-2.15 (m, 2H).



1-(3-azidopropoxi)-2,4-diclorobenceno (3):

Se disuelve el derivado tosilado **2** (0.8 g, 2.13 mmol) en DMF anhidro (10 mL) y se agrega azida de sodio (277 mg, 4.26 mmol), bajo atmósfera inerte (N₂). La mezcla se calienta a 65°C durante 2 hs. Seguidamente se deja enfriar la mezcla hasta alcanzar la temperatura ambiente, se vierte en H₂O (20 mL) y se extrae con Et₂O (1 x 20 mL y 1 x 15 mL). Las capas etéreas se juntan y se lavan con H₂O (3 x 15 mL), luego se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna (SiO₂ flash, hexano:acetato de etilo 8:2) obteniéndose **5** como un aceite incoloro (459 mg, R: 88%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.39 (d, *J*=2.4Hz, 1H), 7.22 (dd, *J*=8.8 Hz, 2.8 Hz, 1H), 6.88 (d, *J*=8.8, 1H), 4.13 (t, *J*=5.6Hz, 2H), 3.62 (t, *J*=6.8Hz, 2H), 2.15-2.08 (m, 2H).



N-propargil 3-(2,4-diclorofenoxi)-propilamina¹⁵¹ (nor-clorgilina) (4):

Técnica 1:

Se suspende en THF anhidro (10 mL) resina de trifenilfosfina (512 mg, 0.82 mmol, resina comercial copolímero de estireno con divinilbenceno, 1.6 mmol/g), bajo atmósfera inerte (N₂) y se calienta a reflujo durante 15 minutos. Seguidamente se disuelve la azida 3 (100 mg, 0.41 mmol) en THF anhidro (2 mL) y se agrega gota a gota a la suspensión de resina. La mezcla de reacción se mantiene a 75°C durante una hora, y se agrega bromuro de propargilo (150 µL, 1.23 mmol). La mezcla se deja agitando a 75°C durante 22 hs. La resina se filtra y se lava con THF (4x10 mL), luego CH₂Cl₂ (4x10 mL) y nuevamente con THF (1x10mL). La resina se resuspende en MeOH (3 mL), se agrega KOH 2% en MeOH (1.2 mL) y la mezcla se calienta a refluio por 2 hs. A continuación, se deja alcanzar la temperatura ambiente, se filtra la resina y se lava con CH₂Cl₂ (4 x 4 mL) seguido de MeOH (2 x 4 mL). Los lavados se evaporan a presión reducida y se particiona el residuo en NaHCO₃ 10% (15 mL) y CH₂Cl₂ (10 mL). Se extrae la capa acuosa con Et₂O (3 x 10 mL), se juntan todos los extractos orgánicos, se secan con Na₂SO₄, se filtran y se evaporaran a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna (SiO₂ flash, CH₂Cl₂:MeOH 8:2, 1% NH₄OH) obteniéndose **4** como un aceite amarillo pálido (32 mg, R: 30%).

Técnica 2:

Se disuelve el derivado tosilado **2** (0.3 g, 0.8 mmol) en DMF anhidro (8 mL) bajo atmósfera inerte (N₂) y posteriormente se agrega trietilamina (0.11 mL, 0.8 mmol). Seguidamente se añade propargilamina (0.08 mL, 1.2 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente por un período de 7 días. Luego la mezcla se diluye en H₂O (20 mL) y se extrae con Et₂O (2 x 15 mL). Se juntan las capas etéreas y se lavan con NaCl sat. (3 x 15 mL). Se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna (SiO₂ Flash,

hexano:acetato de etilo 6:4) obteniéndose **4** como un aceite levemente amarillo (126 mg, R: 61%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):¹⁵¹ 7.38 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, Ar H3), 7.20 (dd, *J*=8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H, Ar H5), 6.88 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, Ar H6), 4.14 (t, *J*=6.0Hz, 2H, OCH₂), 3.48 (d, *J*=2.4Hz, 2H, <u>CH₂CCH</u>), 2.97 (t, *J*=6.4Hz, 2H, CH₂<u>CH₂N</u>), 2.24 (t, *J*=2.4Hz, 1H, CCH), 2.08-2.01 (m, 2H, CH₂<u>CH₂CH₂</u>), 1.48 (sa, 1H, NH). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 153.3 (Ar C1), 129.9 (Ar C3), 127.5 (Ar C5), 125.7 (Ar C4), 123.8 (Ar C2), 114.0 (Ar C6), 82.1 (<u>C</u>CH), 71.4 (C<u>C</u>H), 67.9 (O<u>C</u>H₂), 45.6 (CH₂<u>C</u>H₂N), 38.2 (<u>C</u>H₂CCH), 29.2 (<u>C</u>H₂CH₂N).



*N-*metil-*N*-propargil 3-(2,4-diclorofenoxi)-propilamina¹⁵² (clorgilina) (5):

Se aplicó similar procedimiento que para la obtención de **4** mediante la "técnica 2", utilizando *N*-metil propargilamina (0.10 mL, 1.2 mmol) en lugar de propargilamina. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂ Flash, hexano:acetato de etilo 8:2) obteniéndose **5** como un aceite levemente amarillo (143 mg, R: 66%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):¹⁵² 7.38 (d, *J*=2.4Hz, 1H, Ar, H3), 7.19 (dd, *J*=8.8Hz, 2.4Hz, 1H, Ar H5), 6.88 (d, *J*=8.8Hz, 1H, Ar H6), 4.10 (t, *J*=6.4Hz, 2H, OCH₂), 3.39 (d, *J*=2.0Hz, 2H, <u>CH₂CCH</u>), 2.68 (t, *J*=7.2Hz, 2H, CH₂<u>CH₂N), 2.35 (s, 3H, NCH₃), 2.25 (t, *J*=2.4Hz, 1H, CC-H), 2.04-1.97 (m, 2H, CH₂<u>CH₂CH₂).</u></u>



5

Materiales, equipos y técnicas utilizadas en la radiosíntesis y control de calidad de [¹¹C]clorgilina

Se adquirieron todos los productos químicos y disolventes de fuentes comerciales (Merck, Sigma-Aldrich y Carlo Erba). Los mismos fueron de calidad analítica y se utilizaron sin posterior purificación. El [¹¹C]CO₂ empleado en las reacciones de marcación fue producido en un ciclotrón PET Trace® 16.5 MeV (GE Healthcare). Para dicha producción se utilizó un target de alto rendimiento conteniendo una mezcla de N₂ y 1.0% de O₂ (Praxair o Airliquide). Las marcaciones con carbono-11 fueron llevadas a cabo en un módulo de síntesis automatizado TRACERlab® FX-C Pro (GE Healthcare). Los estudios analíticos fueron realizados en unequipo Shimadzu UFLC equipado con arreglo de diodos y un detector gama, utilizándose una columna EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel), flujo en 1 mL/min, FM (H₂O (TFA 0,1 %) : MeCN 62.5 : 37.5). La purificación de [¹¹C]clorgilina se realizó utilizando un cartucho C18 SEP-PAK plus light y el sistema de HPLC semipreparativo incorporado en el módulo de síntesis automatizado, con una columna VP 250/10 mm Nucleosil 100-5 C18 (Phenomenex) y MeCN: Acetato de amonio 0.1 M (70:30) como fase móvil, a un flujo de 8 mL/min. El cartucho Sep-Pak plus light C18 y los filtros esterilizantes 0,22 µm fueron adquiridos de Waters. El pH fue medido con pH-metro. Los disolventes residuales fueron determinados en un cromatógrafo de gases SHIMADZU Nexis GC-2030 Plus equipado con un detector de ionización de llama y con un inyector automático Shimadzu AOC-20iPlus. La columna de cromatografía de gases analítica (GC) fue una DBWAX de 30 m de largo, 0,53 mm de diámetro y con una película de 1,00 mm de espesor (Agilent). La pureza radionucleídica se determinó en un contador gama (detector de centelleo sólido Nal [TI] tipo pozo de 3" × 3" acoplado a un analizador multicanal), ORTEC. La identidad radionucleídica se analizó cronometrando el decaimiento de la actividad en un calibrador de dosis CAPINTEC CII. Los estudios de pirógenos fueron realizados mediante un kit para detección de endotoxinas LAL Charles Rivers ENDOSAFE PTS[™]. Los ensayos de esterilidad fueron realizados incubando una muestra en TSB a 21.5°C y tioglicolato a 32°C por 14 días.

Consideraciones generales de los métodos de radiosíntesis y control de calidad

Estas consideraciones se aplican tanto a los radiotrazadores de carbono-11, como a los de flúor-18. Antes de la producción de tres lotes piloto de validación de todos los radiotrazadores, se creó la documentación correspondiente (procedimientos operativos, registros, etc). Todas las producciones para ensayos in vivo fueron llevadas a cabo en áreas limpias (área blanca) de acuerdo con los procedimientos de buenas prácticas de manufactura o GMP por sus siglas en inglés. La pureza radioquímica fue calculada considerando la relación entre el producto marcado con cabono-11 (o flúor-18) y la actividad total. La actividad molar fue determinada considerando la actividad total del radiotrazador al final de la síntesis y la cantidad de producto sin marcar determinada por HPLC analítico. Los disolventes residuales tales como acetona, butanona, DMSO, DMF, acetonitrilo y etanol fueron determinados por GC de acuerdo con el capítulo general (467) de la de la farmacopea americana o USP (The United States Pharmacopeia, USP-40) por sus siglas en inglés. La apariencia del producto final fue confirmada mediante inspección visual. Los pirógenos se determinaron en un cartucho Endosafe PTS (Charles River). Los estudios de esterilidad se llevaron a cabo de acuerdo con el capítulo (71) de la USP y el National Formulary ((NF-25) 2017).

Métodos de radiosíntesis: acondicionamiento previo del módulo TRACERIab FX C Pro

En la Figura 10 se muestra el esquema del módulo semi-automatizado de síntesis TRACERIab FX C Pro utilizado para la producción del [¹¹C]clorgilina.



Figura 10. Módulo semi-automatizado de síntesis. Se muestra en la figura un esquema del módulo automatizado de síntesis TRACERIab FX C Pro, las tubuladuras y válvulas utilizadas para la síntesis de [¹¹C]clorgilina.

Acondicionamiento del módulo de síntesis y pasos preliminares

Previamente a cualquier procedimiento de radiosíntesis, los hornos y trampas fueron calentados bajo una corriente de helio con el fin de deshacerse de la humedad y el CO₂ "frío" (¹²C y ¹³C, etc). El horno con tamices moleculares de Niquel/shimalite fue calentado a 150°C bajo corriente de helio (30 mL/min) por 5 minutos y luego calentado a 350°C bajo corriente de hidrógeno (40 mL/min) durante 10 minutos. La trampa carbosphere de CH₄ fue calentada a 120°C durante 10-15 minutos bajo corriente de helio (50 mL/min), posteriormente la trampa Porapak Q de CH₃I y el horno de CH₃OTf fueron calentados simultáneamente a 200 y 190°C respectivamente durante 10-15 minutos, también bajo corriente de helio (50 mL/min). El reactor fue lavado con H₂O miliQ (3 veces con 2 mL c/u) y acetona de grado analítico (3 veces con 2 mL c/u) y posteriormente secado bajo corriente de helio. Con el fin de aumentar la actividad molar, el contenido del blanco del ciclotrón
fue enviado al horno con tamices moleculares de niquel-shimalite y tratado con hidrógeno a 350°C durante 10 minutos ("*delivery* frío"). Inmediatamente antes de comenzar la irradiación para la síntesis, por otro lado el blanco fue bombardeado durante 5 minutos a 70 μ A, y su contenido fue descartado adecuadamente de modo de eliminar el CO₂ "frio" y preparar la superficie del blanco para la irradiación ("*delivery* caliente").

Producción de los precursores secundarios [¹¹C]MeI y [¹¹C]MeOTf

Los agentes metilantes [¹¹C]Mel y [¹¹C]MeOTf fueron producidos en el módulo automatizado GE TRACERIab FX C Pro. El proceso de radiosíntesis comienza con la producción de [¹¹C]CO₂ en el ciclotrón (GE PETtrace 16.5 MeV) mediante la reacción nuclear ¹⁴N(p, α)¹¹C. El [¹¹C]CO₂ fue liberado desde el blanco del ciclotrón hacia el módulo de síntesis y atrapado en tamices moleculares a una temperatura no superior a los 30°C. Seguidamente el [¹¹C]CO₂ fue reducido a [¹¹C]CH₄ en presencia de un catalizador de níquel e hidrógeno a 350°C durante 1 minuto. El [¹¹C]CH₄ fue pasado a través de una trampa doble de ascarita/sicapent con el fin de remover el CO₂ y el H₂O sin reaccionar, producidos en la reacción de reducción. El [¹¹C]CH₄ fue concentrado y purificado por atrapamiento en una columna de carbosphere, previamente enfriada a -75°C. Una vez que el [¹¹C]CH₄ fue liberado por aumento de temperatura, se lo hizo reaccionar con iodo elemental a 740°C para producir [¹¹C]CH₃I en un sistema de recirculación durante 5 minutos. Dos trampas de ascarita removieron el exceso de iodo antes de atrapar el [¹¹C]CH₃I en una columna Porapak Q. El [¹¹C]CH₃I fue liberado por calentamiento a 190°C en una corriente de helio (35 mL/min). El [¹¹C]CH₃I puede ser opcionalmente convertido en [¹¹C]CH₃OTf, mediante el pasaje en línea a través de una columna calentada a 190°C que contiene carbono grafitado impregnado en triflato de plata. El [¹¹C]CH₃I o el [¹¹C]CH₄OTf fueron finalmente barboteados en el reactor (R) cargado con el disolvente, el precursor orgánico y la base (en el caso de haberse utilizado el precursor en forma de clorhidrato). El atrapamiento de los agentes metilantes en la solución del precursor fue llevada a cabo a baja temperatura (-10°C).

Métodos de radiosíntesis (radiomarcado)

El proceso de radiomarcado se llevó a cabo en el reactor del módulo. Se disolvió 1.0 mg del precursor **4** bajo la forma química de base libre en 0.35 mL de butanona, seguidamente se atrapó el agente metilante ([¹¹C]MeOTf) a -15°C. La mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 1 minuto; Luego del tiempo de marcado, el crudo de reacción fue enfriado a 40°C, antes de continuar con el proceso de purificación.

Purificación y formulación

Luego del marcado y el enfriado de la mezcla de reacción, el crudo se diluyó en 1 mL de la fase móvil del HPLC semipreparativo desde el vial 3 hacia el reactor. El contenido del reactor fue transferido a un loop de inyección de 5 mL del sistema HPLC del módulo de síntesis. La purificación del compuesto deseado marcado con carbono-11 se llevó a cabo mediante la inyección del crudo diluido controlado por un detector automático de fluidos. El HPLC semipreparativo se llevó a cabo en la fase móvil MeCN:NH4OAc 0.1 M (70:30), en un flujo isocrático de 8.0 mL/min. Los cromatogramas se registraron utilizando un detector UV (210 nm) y un detector gama en serie. La fracción correspondiente a [¹¹C]clorgilina (que eluyó entre los 6 y 7 minutos post-inyección) fue recolectada y diluida en 50 de agua para inyección en el balón colector (BC). La solución diluida fue enviada a través de un cartucho C18-SPE (SEP-PAK C18 *plus light*, pre-activado con 5 mL de etanol absoluto, seguido de 10 mL de agua para invección), previamente instalado en el módulo entre V11 y V12 y luego fue lavado con 10 mL de agua para invección (desde Vial 6). El producto retenido fue eluido con 1 mL de etanol absoluto (desde Vial 5) y recolectado en el vial de dos bocas (VDB) conteniendo 5 mL de suero fisiológico (NaCl 0.9%). Finalmente, la formulación se llevó a cabo pasando 5 mL de suero fisiológico a través del cartucho (desde Vial 4) y recolectado en el VDB. La solución final se transfirió a un vial estéril pasando a través de un filtro esterilizante de 0.22 μm. El volumen total del radiotrazador fue de 11 mL.

Métodos de control de calidad

Las impurezas químicas y radioquímicas se determinaron mediante radio-HPLC utilizando una columna C18, con la fase móvil TFA 0.1 % (en H₂O):MeCN (62.5:37.5, v/v), a un flujo de 1.0 mL/min. El análisis de HPLC completo fue de 10 minutos. El tiempo de retención del precursor (**4**) y del producto [¹¹C]clorgilina ([¹¹C]**5**) fueron 6.6 y 8.0 minutos respectivamente. La identidad química de [¹¹C]**5** fue determinada por comparación del tiempo de retención del estándar de referencia **5** (clorgilina) sin marcar. Los cromatogramas se registraron con un detector de arreglo de diodos (λ : 210 nm) y gama en serie.

3.1.2.2 Resultados y discusión

Síntesis orgánica de estándar y precursor de [¹¹C]clorgilina

El trabajo comenzó con una búsqueda y revisión bibliográfica que permitieron el diseño de una ruta sintética adecuada para la obtención del precursor de [¹¹C]clorgilina y su estándar analítico (Esquema 6), así como la optimización de las condiciones de marcación con carbono-11.



Esquema 6. Ruta sintética del precursor y estándar analítico de [¹¹C]clorgilina. Reactivos y condiciones: (a) 3-bromo-1-propanol, NaOH (ac), EtOH, reflujo, 4 hs, 96%; (b) *p*-TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, t. amb., 25 hs, 67%; (c) NaN₃, DMF, 65°C, 2 hs, 88%; (d) i) resina de trifenilfosfina, THF, 75°C, 1 h; ii) bromuro de propargilo, 85°C, 22 hs; iii) MeOH, KOH 2% (en MeOH), reflujo 2 hs, 30%; (e) *N*-metilpropargilamina, Et₃N, DMF, t. amb., 7 d, 66% (clorgilina); (f) propargilamina, Et₃N, DMF, t. amb., 7 d, 61% (nor-clorgilina).

El precursor nor-clorgilina 4 y el estándar no radioactivo de clorgilina 5 se sintetizaron de acuerdo con las rutas mostradas en el Esquema 6, utilizando 2,4diclorofenol como material de partida. La primera reacción de la ruta sintética fue adaptada de Ohmomo y col.; e implicó la O-alquilación de 2,4-diclorofenol utilizando 3-bromo-1-propanol como agente alguilante, para obtener el alcohol 1 con un excelente rendimiento.¹⁵² El siguiente paso, consistió en llevar a cabo una activación del alcohol 1 mediante una reacción de tosilación del mismo, siguiendo la técnica de Berardi y col. con ligeras modificaciones, para obtener el compuesto 2.153 A continuación, de acuerdo con una técnica modificada de nuestro propio grupo de investigación, se obtuvo el estándar analítico de clorgilina (derivado 5, estándar "frío" de [¹¹C]clorgilina), mediante una reacción de *N*-alquilación entre el tosilato 2 y N-metilpropargilamina, obteniéndose 5 con un rendimiento de 66 % (condición e, Esquema 6).¹⁵⁴ De la misma manera, utilizando propargilamina a través de reacción de tipo SN₂ de *N*-alquilación sobre el compuesto **2**, se obtuvo el precursor de marcación nor-clorgilina 4 con un rendimiento moderado (condición f, Esquema 6). A su vez, con el fin de obtener nor-clorgilina 4 con un mayor rendimiento, exploramos una metodología que pudiese a priori minimizar las reacciones

competitivas de polialquilación sobre el heteroátomo de nitrógeno. Para ello, nos basamos en el trabajo de Ayesa y col.; donde se describe una metodología de síntesis en fase sólida para la obtención eficiente de aminas secundarias a partir de derivados de azida y agentes alquilantes. A través de un paso inicial mediante reacción de Staudinger, entre derivados de azida y trifenilfosfina soportada, posterior N-alquilación selectiva del intermedio N-alquilfosfoimina formado con haluros de alquilo, para finalmente desanclar la amina formada del soporte polimérico (Esquema 7).¹⁵⁵ En base a este antecedente, previamente se transformó el tosilato 2 por sustitución nucleofílica con azida de sodio en el derivado de azida 3. Luego, se llevó a cabo la reacción de Staudinger entre la azida 3 y trifenilfosfina soportada en polímero (resina), para formar el correspondiente iminofosforano unido al polímero (Esquema 7). Seguidamente, se llevó a cabo la N-alquilación con bromuro de propargilo en exceso como agente alquilante, el cual es fácilmente removido al final de la reacción por lavados de la resina. Finalmente se desancló el producto final del polímero mediante el agregado de KOH 2% en MeOH. De esta manera se obtuvo 4 con un rendimiento de 30%, (condición d, Esquema 4). Si bien se pudo obtener satisfactoriamente el producto de interés mediante dicha metodología, el rendimiento global de esta ruta sintética (R_{global}: 17%, Esquema 6) no fue superior al de la ruta convencional (R_{global}: 39%, Esquema 6). Por último, cabe destacar que todos los productos obtenidos fueron caracterizados por experimentos de RMN (¹H, COSY, HSQC, HMBC y ¹³C), coincidiendo sus respectivas señales con las descriptas en la literatura para los mismos compuestos. A continuación, a modo de ejemplo se muestran los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN, del precursor nor-clorgilina (Figuras 11a y 11b). El análisis de ambos espectros permitió asignar la presencia de todos los protones y carbonos correspondientes a la estructura 4. En particular, se observan las señales correspondientes a los protones metilénicos y metínico (doblete a 3.47 ppm y triplete a 2.23 ppm) características del grupo propargilo y las señales de los protones de la cadena de propilamina (tripletes y multiplete a 4.12, 2.95 y 2.04 ppm, Figura 11a).

61

Cabe destacar que el espectro de 13C-RMN mostró la presencia de las señales en aprox. 82, 71 y 38 ppm, correspondientes al agrupamiento propargilamina (Figura 11b).



Esquema 7. Metodología de fase sólida para la obtención de nor-clorgilina 4.



Figura 11a. Espectro ampliado de ¹H-RMN en CDCI₃ del compuesto nor-clorgilina 4.



Figura 11b. Espectro ampliado de ¹³C-RMN en CDCl₃ del compuesto nor-clorgilina 4.

Radiosíntesis de [11C]clorgilina

El radiomarcado con carbono-11 para la obtención de [¹¹C]clorgilina, se llevó a cabo mediante la metodología de *N*-alquilación nucleofílica. La marcación, se realizó utilizando el precursor nor-clorgilina y los agentes de metilación [¹¹C]MeI o [¹¹C]MeOTf (Esquema 8).



Esquema 8. Radiosíntesis de [¹¹C]clorgilina mediante *N*-alquilación de nor-clorgilina en un paso con [¹¹C]MeI o [¹¹C]MeOTf.

A su vez, los antecedentes descriptos en la literatura para la marcación de norclorgilina con [¹¹C]MeI no presentaba un sistema automatizado de purificación del producto final acorde a las instalaciones de Cudim. Por lo tanto, nos basamos nuevamente en la analogía estructural de [¹¹C]clorgilina con nuestro trabajo previo con [¹¹C]D-deprenil. De esta forma se establecieron condiciones de purificación y de marcado con [¹¹C]MeOTf, para llevar a cabo la producción de dicho radiotrazador.^{154,156} Para ello, se utilizó el módulo de síntesis semi-automatizado TRACERIab FX-C Pro. Se trata de una plataforma dispuesta en una celda blindada (hot cell) que puede ser operada de manera automatizada utilizando programas prestablecidos para cada proceso, y mediante la intervención del operador, a través de un software especializado (Figura 12). Así, el proceso de marcación comienza con la producción de [¹¹C]CO₂ a nivel del ciclotrón mediante la reacción nuclear ¹⁴N(p,α)¹¹C. Posteriormente el [¹¹C]CO₂ es enviado al módulo de síntesis automatizado donde es reducido a [¹¹C]CH₄ mediante hidrogenación catalítica, para luego ser transformado en [¹¹C]MeI, el cual puede ser utilizado directamente como agente metilante, o ser convertido en [¹¹C]MeOTf (Figura 12).



Figura 12. Ciclotrón GE PETtrace® (izquierda), proceso radiosintético en la producción de [¹¹C]MeI y [¹¹C]MeOTf (centro), módulo automatizado de radiosíntesis GE TRACERIab FX C Pro (derecha).

En este contexto, en primera instancia se siguió la técnica desarrollada por el grupo de investigación del Prof. Bengt Långström, la cual describe la síntesis de [¹¹C]clorgilina mediante la marcación de su precursor **4** (Esquema 8) con ^{[11}C]Mel.¹⁵⁷ De esta manera, inicialmente se realizaron una serie de experimentos de marcación hasta reactor, lo que implica la obtención del producto sin purificar, variando diferentes parámetros como se muestra en la Tabla 1. Las mejores condiciones obtenidas para la marcación con [¹¹C]Mel fueron 80°C por 5 minutos en una mezcla de DMF:DMSO (3:1) como disolvente (entrada c, Tabla 1). Esta condición implicó un mayor tiempo de calentamiento que la descripta en la técnica mencionada (3 minutos a 80°C, entrada b, Tabla 1). Además, se realizó un experimento de marcación con [¹¹C]Mel utilizando el mismo disolvente, condiciones de temperatura y tiempo (butanona, 80°C, 1min) a las utilizadas para producir [¹¹C]D-deprenil con [¹¹C]MeOTf en Cudim. La misma resultó en rendimiento radioquímico y pureza radioquímica muy bajos respecto a los ensayos anteriores (Entrada e, Tabla 1).¹⁵⁶ Por otra parte, un aumento en la temperatura de 80°C a 100°C no mejoró significativamente el rendimiento radioguímico de la marcación (Entrada d, Tabla 1).

Tabla 1. Síntesis de [¹¹C]clorgilina. Entadas a-e, y h se corresponden a síntesis a pequeña escala (hasta reactor, sin posterior purificación). *: Síntesis completa con [¹¹C]MeI. **: síntesis completa con [¹¹C]MeOTf. cd: corregido por decaimiento. RRQ: rendimiento radioquímico (%, a partir de MeI, cd). PRQ: pureza radioquímica (%, cd). Act.f : actividad al final de la síntesis.

Entrada	Agente	Disolvente(s)	T (ºC)	t (min)	RRQ	PRQ	Act.f
	metilante						(mCi)
а	Mel	DMF:DMSO (3:1)	80	1	49.8	72.2	74.3
b	Mel	DMF:DMSO (3:1)	80	3	55.8	88.7	65.7
С	Mel	DMF:DMSO (3:1)	80	5	60.8	89.4	66.3
d	Mel	DMF:DMSO (3:1)	100	3	51.9	82.3	58.3
е	Mel	Butanona	80	1	8.7	21.0	41.1
f*	Mel	DMF:DMSO (3:1)	80	5	23.2	98.2	102.9
g*	Mel	DMF:DMSO (3:1)	80	5	28.4	95.6	97.8
h	MeOTf	Butanona	80	1	42.5	86.0	24.4
i**	MeOTf	Butanona	80	1	30.1	98.6	168.0
j**	MeOTf	Butanona	80	1	33.9	97.4	146.2
k**	MeOTf	Butanona	80	1	33.5	95.9	164.7

A continuación, se realizó una síntesis hasta reactor siguiendo las condiciones previamente reportadas por nuestro grupo de investigación (butanona, 80°C, 1 min) utilizando [¹¹C]MeOTf como agente metilante, bajo estas condiciones no resultó una mejora significativa en el rendimiento radioquímico o la pureza radioquímica en comparación con el ensayo realizado en condiciones con [¹¹C]MeI (Tabla 1, entradas h y c). Por último, cabe destacar que la mayor reactividad de [¹¹C]MeOTf sobre [¹¹C]MeI se puede apreciar cuando se probaron las mismas condiciones para ambos agentes metilantes (butanona, 1 minuto, 80°C). Ya que los resultados de estos experimentos muestran RRQ y PRQ cuatro veces mayor cuando se utilizó [¹¹C]MeOTf como agente metilante (Tabla 1, entradas h y e). En este contexto, se puso a punto un sistema de purificación mediante HPLC semipreparativo y cartucho SEP-PAK, basándonos en la analogía estructural con el radiofármaco [¹¹C]D-deprenil, mediante mínimas modificaciones de la técnica ya mencionada.¹⁵⁶ En la Figura 13 se muestra como se colecta y separa el producto marcado de otras impurezas radioquímicas mediante HPLC semipreparativo.



Figura 13. Radiocromatograma de la purificación de [¹¹C]clorgilina por HPLC semipreparativo. Dentro de las barras paralelas se muestra el pico recolectado correspondiente al radiotrazador.

Por último, es relevante resaltar que la síntesis y formulación completa de [¹¹C]clorgilina mostró resultados más prometedores utilizando [¹¹C]MeOTf como agente metilante que [¹¹C]MeI (Tabla 1, entradas i, j y k frente a entradas f y g). Así, se logró obtener mayor RRQ y actividad final en la síntesis completa de [¹¹C]clorgilina, utilizando la metodología reportada por nuestro grupo de investigación. De esta manera, luego de 12 síntesis completas con fines preclínicos, se obtuvo [¹¹C]clorgilina con un rendimiento radioquímico de 44 ± 12 % (al fin de la síntesis, corregido por decaimiento, a partir de [¹¹C]MeI), en un tiempo de síntesis de 38 ± 3 minutos, con actividades molares de 416 ± 62 GBq/µmol y una pureza radioquímica superior al 97 ± 1% (incluida la purificación por HPLC).

Control de calidad de [¹¹C]clorgilina

La finalidad de los radiotrazadores utilizados en el presente trabajo es de un estudio diagnóstico *in vivo*. Si los mismos cumplen con las especificaciones preestablecidas de control de calidad, podrían ser susceptible de ser utilizados como potenciales radiofármacos para la aplicación buscada. Estos potenciales radiofármacos, serán administrados a un animal de experimentación o un paciente mediante vía endovenosa, por lo que deben cumplir con parámetros no solo de pureza química y radioquímica, sino además con parámetros microbiológicos. Para ello, es necesario llevar a cabo una serie de análisis y determinaciones, con el fin de evaluar dichos parámetros.

Con este propósito, una vez obtenidos el precursor nor-clorgilina 4 y el estándar de clorgilina 5, se puso a punto su caracterización mediante un sistema analítico de HPLC. Basándonos en la similitud estructural de un compuesto utilizado en un trabajo previo de nuestro grupo ([¹¹C]D-deprenil), se planteó utilizar las mismas condiciones cromatográficas que para éste (columna C18, flujo en 1 TFA 0,1 % (en H₂O):MeCN , 62.5:37.5 (v/v).¹⁵⁶ Mediante mínimas mL/min variaciones en el sistema cromatográfico, se pudo obtener una buena resolución de los estándares en un tiempo de análisis menor a 10 minutos (criterio utilizado en Cudim para el control de calidad de todos los radiofármacos de carbono-11). Los resultados obtenidos se muestran la Figura 14, donde pueden observarse 3 picos. El de mayor tiempo de retención (8.0 min) corresponde al estándar de clorgilina 5, seguido del precursor nor-clorgilina 4 (6.6 min). Mientras que en 2.3 min, se observa un pico que corresponde a un artefacto generado por la invección y se corresponde a su vez con el volumen muerto del sistema cromatográfico (Figura 14). Por otra parte, en la Figura 15 se muestra un radiocromatograma correspondiente a una muestra de un lote de producción de [¹¹C]clorgilina, que se obtuvo con una PRQ de 98.8%.



Figura 14. Cromatograma, 210nm. Resolución de clorgilina (8.00 min) y nor-clorgilina (6.66 min) 0.01 mg/mL.



Figura 15. Radiocromatograma de HPLC analítico utilizado para determinar la PRQ de [¹¹C]clorgilina. En este ejemplo la PRQ fue de 98.8%.

En este contexto, se realizaron todos los ensayos de control de calidad pertinentes para los tres lotes piloto de validación, cumpliendo con las especificaciones prestablecidas. Tanto los lotes piloto de validación, como en la amplia mayoría de los lotes producidos fueron liberados. Salvo en casos particulares que no cumplieron con las especificaciones para disolventes residuales, ya que presentaban una cantidad de acetonitrilo superior a la preestablecida. En la Tabla 2, se muestra un ejemplo de las especificaciones a determinar y los resultados obtenidos, contenidos en un certificado de análisis de control de calidad para un lote de [¹¹C]clorgilina. Como puede observarse, el lote de este ejemplo cumplió con todos los parámetros establecidos previamente.

Tabla 2. Especificaciones fisicoquímicas y endotoxinas. Resultados contenidos en un certificado de análisis de un lote de [¹¹C]clorgilina. **C**: cumple con los parámetros especificados. *: no hay especificación establecida. ND: no detectado.

Técnica análisis	Análisis	Especificación	Resultado	Observación	
Visual	Apariencia	Solución incolora, transparente libre de partículas visibles	Cumple	С	
pH-metro	pН	4,5 - 8,5	5,5	С	
HPLC	Pureza radioquímica	> 90 %	97,4	С	
HPLC	Identificación radioquímica	tr muestra = tr del estándar (min)	8,1	С	
HPLC	Durozo Químico	Precursor (Nor-CGL) (µg/mL)	0,24	*	
	Fuleza Quimica	CGL (CGL BL) (µg/mL)	0,65	*	
GC	Determinación de	Acetona < 0.5 %	0,0001	С	
	solventes	Acetonitrilo < 0.05 %	0,0065	С	
	residuales	Butanona < 0.5 %	ND	С	
GC	Determinación de Etanol	Etanol < 10 %	6,9	С	
Centelleo sólido	Pureza radionucleídica (espectro)	> 99,5 % de emisión gamma a 511 KeV y/o 1022 KeV	Cumple	С	
T _{1/2}	Identidad radionucleídica (T _{1/2})	19,9 – 20,9 min.	20,1	С	
HPLC	Actividad molar	GBq/µmol (EOS) >30	233	С	
Endosafe ®	Pirógenos	< 175 EU/Vol. Iny.	31,4	С	
-	Volumen máximo a inyectar	Pirógenos (mL)	5,6		

3.1.2.3 Conclusiones

En primer lugar, se obtuvo eficientemente el precursor de marcación nor-clorgilina 4 mediante dos rutas sintéticas, con rendimientos globales de 39 y 17%, en tres y cuatros pasos sintéticos, respectivamente. Además, fue posible sintetizar un estándar "frio" (no radioactivo) de clorgilina, inhibidor irreversible de MAO-A, para su utilización como referencia en los estudios analíticos por HPLC del control de calidad para determinar pureza química y pureza radioquímica. Se llevo a cabo la optimización de la radiosíntesis de [11C]clorgilina de forma semi-automatizada en un modulo TRACERIab FX-C Pro, vía marcación tanto con [¹¹C]CH₃I como con [¹¹C]CH₃OTf mediante una reacción de *N*-metilación nucleofílica. A su vez, se estableció un protocolo de producción y control de calidad para obtener de manera eficiente el radiofármaco [¹¹C]clorgilina. Se obtuvo en promedio: pureza radioquímica 97 ± 1%, rendimiento radioquímico corregido por decaimiento a partir de [¹¹C]MeI, 44 ± 12%, y actividad molar de 416 (±62) GBq/µmol. La mayoría de los lotes producidos cumplieron todas las especificaciones prestablecidas para el control de calidad, lo que habilita el uso del radiotrazador para la realización de estudios in vivo.

3.1.3 Radiosíntesis y control de calidad de [11C]harmina

3.1.3.1 Parte experimental

Se utilizaron materiales y equipos similares a los que se describieron en la síntesis orgánica de estándares y precursores de [¹¹C]clorgilina.

Técnicas utilizadas en la síntesis orgánica de estándar y precursor de [¹¹C]harmina

7-Hidroxi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-b]indol¹²⁵ (harmol, 7):

Se prepara una solución de harmina **6** (7-Metoxi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-b]indol) (1 g, 4.75 mmol) en ácido acético glacial (30 mL), seguidamente se agrega ácido bromhídrico 40% lentamente (6.25 mL) y se calienta a reflujo por 24 hs. La mezcla de reacción se evapora a presión reducida, el crudo resultante se resuspende en KOH 1M (100 mL) y se realizan extracciones con CH₂Cl₂ (6 X 20 mL). El producto deseado es precipitado mediante el agregado de una solución saturada de NH₄Cl (15 mL) a la fase acuosa. El precipitado formado se filtra a vacío y seguidamente es disuelto en MeOH (200 mL), secado con MgSO₄, filtrado y finalmente evaporado el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se secó a vacío hasta alcanzar una masa constante, obteniéndose harmol **(7)** como un sólido amarillo-pálido (0.85 g, R: 90%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm):¹²⁵ 11.22 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, OH), 8.12 (d, *J*= 5.2Hz, 1H, H3), 7.95(d, *J*= 8.8 Hz, 1H, H5), 7.74 (d, *J*= 5.2Hz, 1H, H4), 6.91 (d, *J*= 2Hz, 1H, H8), 6.72 (dd, *J*=8.4 Hz, 2 Hz, 1H, H6), 2.70 (s, 3H, CH₃).



Radiosíntesis y control de calidad de [11C]harmina

Se utilizaron materiales, equipos y metodologías similares a las descriptas para [¹¹C]clorgilina, a excepción de las condiciones de HPLC. Para el HPLC analítico se utilizó una columna EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel), con formiato de amonio 0.1 M (pH 4):MeCN (75:25, v/v) como fase móvil, con un flujo isocrático de 1.5 mL/min. La purificación de [¹¹C]harmina se realizó utilizando un cartucho C18 SEP-PAK *plus light* y el sistema de HPLC semipreparativo incorporado en el módulo de síntesis automatizado, con una columna VP 250/10 mm Nucleosil 100-5 C18 y acetato de amonio 0.1 M:MeCN 60:40 (v/v) como fase móvil, con un flujo isocrático de 8 mL/min.

Métodos de radiosíntesis (radiomarcado)

El proceso de radiomarcado se llevó a cabo en el reactor del módulo. El reactor fue previamente llenado con 2.0–2.3 mg de harmol **7** disuelto en 0.5 mL de DMSO y 1.1 equivalentes de NaOH 5 M. Una vez que toda la actividad bajo la forma de [¹¹C]Mel se encontraba en el reactor, la mezcla se calentó a 80°C durante 2 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se llevó la mezcla a 40°C y la reacción se inactivó mediante la adición de 0.5 mL de fase móvil utilizada en el HPLC semipreparativo, previo a la purificación (desde el vial 3, Figura 9).

Purificación y formulación

La inyección de la mezcla de reacción cruda en la columna semipreparativa de HPLC (VP 250/10 mm Nucleosil 100-5 C18, Phenomenex) se controló mediante un detector de fluido automatizado representado en el software. Para la fase móvil de HPLC semipreparativo se utilizó una mezcla de acetato de amonio 0.1 M:MeCN 60:40 (v/v) con un flujo isocrático de 8 mL/min. Los cromatogramas se registraron utilizando un detector UV (254 nm) y un detector gama en serie. La fracción correspondiente a [¹¹C]Harmina se recolectó en el balón colector conteniendo 50

mL de agua para inyección. Los pasos siguientes de purificación se llevaron a cabo de la misma manera que la técnica descrita para [¹¹C]clorgilina.

Métodos de control de calidad

Las impurezas químicas y radioquímicas se determinaron mediante radio-HPLC utilizando una columna C18, con la fase móvil formiato de amonio 0.1 M (pH 4):MeCN 75:25 (v/v), a un flujo de 1.5 mL/min. El análisis de HPLC completo fue de 10 minutos. El tiempo de retención del precursor harmol **7** y del producto [¹¹C]**6** fueron 2.72 y 5.96 minutos respectivamente. La identidad química de [¹¹C]**6** fue determinada por comparación del tiempo de retención del estándar de referencia **6** sin marcar. Los cromatogramas se registraron con un detector de arreglo de diodos (λ : 330 nm) y gama en serie.

3.1.3.2 Resultados y discusión

Síntesis orgánica del precursor de [¹¹C]harmina

La obtención de harmol **7** se llevó a cabo mediante la *O*-desmetilación de harmina comercial. Esta reacción se llevó a cabo bajo condiciones clásicas (mezcla de HBr concentrado / ácido acético glacial bajo calentamiento a refujo) siguiendo la técnica de Schieferstein y col.; con algunas modificaciones mediante la cual se obtuvo el producto deseado con un excelente rendimiento (Esquema 9).¹²⁵



Harmina 6

Harmol 7

Esquema 9. Obtención de harmol 7, R: 90% (precursor de [¹¹C]harmina).

A su vez, la obtención de harmol no solo es relevante para su utilización como precursor para la obtención de [¹¹C]harmina, sino como se verá más adelante, es también material de partida para la obtención de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol. Por último, cabe destacar que las señales de ¹H-RMN del compuesto **7** obtenido, coincidieron con las reportadas en la literatura.¹²⁵

Radiosíntesis de [¹¹C]harmina

El radiomarcado con carbono-11 para la obtención de [¹¹C]harmina, se llevó a cabo mediante la metodología de *O*-alquilación nucleofílica. La marcación, se realizó utilizando el precursor harmol y el agente de metilación [¹¹C]MeI, siguiendo la técnica de Philippe y colaboradores (Esquema 10).¹⁵⁸



Harmol 7

[¹¹C]Harmina

Esquema 10. Condiciones estudiadas en la radiosíntesis de [¹¹C]harmina. Las condiciones óptimas establecidas fueron: 2.0–2.1 mg de harmol disuelto en 0.5 mL de DMSO y 1.1 equivalentes de NaOH 5 M. La mezcla se calentó a 80°C durante 2 minutos en el reactor del módulo de síntesis.

Inicialmente se realizó una prueba de marcación con carbono-11 hasta reactor (sin purificación), en el módulo semi-automatizado de síntesis TRACERIab FX C Pro, de manera análoga a la descripta para [¹¹C]clorgilina en la parte experimental. En este caso, a diferencia de la reacción llevada a cabo para la obtención de [¹¹C]clorgilina, fue necesario el agregado de una base (NaOH) para desprotonar el grupo fenol del precursor harmol (Esquema 10). A su vez, dado que la técnica de Philippe y col. se trataba de un estudio exhaustivo de los efectos de diferentes condiciones sobre la

reacción de marcación (diferentes cantidades de base, precursor, disolventes y temperatura de marcación), se seleccionaron las condiciones óptimas descriptas en el trabajo mencionado (calentamiento a 80°C por 2 minutos en DMSO). De esta manera se obtuvo [¹¹C]Harmina con un rendimiento radioquímico de 50.3% (a partir de [¹¹C]MeI, corregido por decaimiento) y una pureza radioquímica de 86.4%.

Por otra parte, con el objetivo de estudiar la reactividad utilizando [¹¹C]MeOTf, se intentaron reproducir las condiciones de marcación para [¹¹C]Harmina descriptas por Murthy y col.¹⁵⁹ La mismas establecen un tiempo de marcado de 5 minutos a temperatura ambiente utilizando [¹¹C]MeOTf como agente metilante, en acetona anhidra como disolvente. Durante el ensayo, se constató que el precursor harmol presentaba muy poca solubilidad en acetona anhidra, lo cual pudo incidir en la no obtención del producto deseado trabajando en nuestro módulo de radiosíntesis. En este contexto, se realizó otro ensayo cambiando el disolvente por DMSO, con el objetivo de solubilizar el precursor, pero tampoco se logró generar el producto esperado bajo esta condición.

Una vez determinadas las condiciones de marcación a utilizar, se estableció un protocolo de purificación y formulación. El sistema de purificación por HPLC semipreparativo y cartucho C18 SPE se llevó a cabo de la misma manera que la descripta para [¹¹C]clorgilina. Si bien se utilizó la misma columna de HPLC semipreparativo, la fase móvil utilizada en este caso fue acetato de amonio 0.1 M : MeCN 60:40 (v/v), con un flujo isocrático de 8 mL/min. En la Figura 16 se muestra como se colecta y separa el producto marcado de otras impurezas radioquímicas mediante HPLC semipreparativo.

76



Figura 16. Radiocromatograma de la purificación de [¹¹C]harmina por HPLC semipreparativo. Dentro de las barras paralelas se muestra el pico recolectado correspondiente al radiotrazador.

De esta manera, se obtuvo [¹¹C]harmina con un rendimiento radioquímico de 45 ± 6% (al fin de la síntesis, corregido por decaimiento, a partir de [¹¹C]MeI), en un tiempo de síntesis de 34 ± 3 minutos, con actividades molares de 513 ± 155 GBq/µmol y una pureza radioquímica superior al 99.9 ± 0.1% (incluida la purificación por HPLC).

Control de calidad de [11C]harmina

Dado que el radiotrazador [¹¹C]Harmina no cuenta con una monografía en farmacopea, para el control de calidad completo se tuvieron en cuenta las especificaciones establecidas para los radiofármacos de carbono-11 producidos en el Departamento de Radiofarmacia de Cudim. Tal como se vio anteriormente para el caso de [¹¹C]clorgilina.

Una vez obtenido el precursor **7** a partir de harmina comercial **6**, como se describió anteriormente, se establecieron las condiciones del sistema analítico de HPLC para su caracterización, basándonos en la técnica de Philippe y col.¹⁵⁸. En la Figura 17 se muestra el cromatograma obtenido para una mezcla compuesta por harmol (2.7 min) y harmina (5.9 min) en igual concentración. En dicho cromatograma se puede observar la óptima resolución del estándar del producto de interés respecto de su precursor (Figura 17).



Figura 17. Se muestra un cromatograma a 330 nm correspondiente a la resolución de una mezcla compuesta por harmol (tr = 2.7 min) y harmina (tr = 5.9 min) en formiato de amonio 0.1 M (pH 4) : MeCN 75:25 (v/v) a flujo 1.5mL/min.

Por otra parte, en la Figura 18 se muestra un radiocromatograma correspondiente a una muestra de un lote de producción de [¹¹C]harmina, que se obtuvo con una PRQ de 99.9%.





En este contexto, se realizaron todos los ensayos de control de calidad pertinentes para los tres lotes piloto de validación. El control de calidad involucró la determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, que cumplieron con las especificaciones prestablecidas tanto en los lotes piloto de validación, como en la amplia mayoría de los lotes realizados. En la Tabla 3, se muestra un ejemplo de las especificaciones a determinar y los resultados obtenidos, contenidos en un certificado de análisis de control de calidad para un lote de [¹¹C]harmina. Como puede observarse, el lote de este ejemplo cumplió con todos los parámetros establecidos previamente.

Tabla 3. Especificaciones fisicoquímicas y endotoxinas. Resultados contenidos en un certificado de análisis de un lote de [¹¹C]harmina. **C**: cumple con los parámetros especificados. *: no hay especificación establecida. ND: no detectado.

Técnica análisis	Análisis	Especificación	Resultado	Observación
Visual	Apariencia	Solución incolora, transparente libre de partículas visibles	Cumple	С
pH-metro	pН	4,5 - 8,5	5,8	С
HPLC	Pureza radioquímica	> 90 %	99.9	С
HPLC	Identificación radioquímica	tr muestra = tr del estándar (min)	6.3	С
HPLC	Pureza Química	Precursor (harmol) (µg/mL)	0.30	*
		Harmina (µg/mL)	0.19	*
GC	Determinación de solventes residuales	Acetona < 0.5 %	ND	С
		Acetonitrilo < 0.05 %	0,001	С
		DMSO < 0.5 %	0.02	С
GC	Determinación de Etanol	Etanol < 10 %	7.9	С
Centelleo sólido	Pureza radionucleídica (espectro)	> 99,5 % de emisión gamma a 511 KeV y/o 1022 KeV	Cumple	С
T _{1/2}	Identidad radionucleídica (T _{1/2})	19,9 – 20,9 min.	20,3	С
HPLC	Actividad molar	GBq/µmol (EOS) >30	482.3	С
Endosafe®	Pirógenos	< 175 EU/Vol. Iny.	31,4	С
-	Volumen máximo a inyectar	Pirógenos (mL)	5,6	

3.1.3.3 Conclusiones

En primer lugar, se logró obtener harmol como precursor en la radiosíntesis de [¹¹C]harmina con un 90% de rendimiento a partir de harmina comercial. Una vez obtenido el mismo, se establecieron las condiciones de radiomarcado con carbono-11 mediante el seguimiento de una técnica descripta en la literatura, con algunas modificaciones. En este sentido, se pusieron a punto las condiciones de formulación final, y seguidamente se estableció un protocolo de producción y otro de control de calidad para obtener de manera eficiente el radiotrazador [¹¹C]harmina. Se obtuvo [¹¹C]harmina con un rendimiento radioquímico de 45 \pm 6% (al fin de la síntesis, corregido por decaimiento, a partir de [¹¹C]MeI), en un tiempo de síntesis de 34 \pm 3 minutos, con actividades molares de 513 \pm 155 GBq/µmol y una pureza radioquímica superior al 99.9 \pm 0.1% (incluida la purificación por HPLC). La mayoría de los lotes producidos cumplieron todas las especificaciones prestablecidas para el control de calidad, lo que habilita el uso del radiotrazador para la realización de estudios *in vivo*.

3.1.4 Radiosíntesis y control de calidad de [¹¹C]azul de metileno

3.1.4.1 Parte experimental

Se utilizaron materiales y equipos similares a los que se describieron en la síntesis orgánica de estándares y precursores de [¹¹C]clorgilina.

Técnicas utilizadas en la síntesis orgánica de estándares y precursores de [¹¹C]azul de metileno

Hidrato de tetrayoduro de fenotiazin-5-io (11):

Se disuelve fenotiazina (2g, 10 mmol) en diclorometano (50 mL). Luego se agrega gota a gota una solución de yodo (7.6 g, 30 mmol) en diclorometano (150 mL), en un período de una hora. La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente por 5 horas. Seguidamente se filtra la solución y se lavan los cristales obtenidos con diclorometano (50 mL). Se filtran los cristales formados en las aguas madres, se juntan con los cristales de la etapa anterior, y se vuelven a lavar con diclorometano (100 mL) y seguidamente con Et₂O hasta que no se observa más una coloración amarronada (250 mL). Los cristales obtenidos se secan a vacío durante 3 hs, obteniéndose **11** como un sólido verde oscuro que se utiliza sin otra purificación posterior en la siguiente etapa (6.7 g, 92%).¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.54-8.42 (m, 2H), 8.11-8.09 (m, 2H), 8.06 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.96 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.80 (d, *J*=7.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J*=7.3 Hz, 1H).



Triyoduro de 3-(dimetilamino)fenotiazin-5-io¹⁶⁰ (12):

Se disuelve **11** (6.64 g, 9.17 mmol) en diclorometano (460 mL). Seguidamente se agrega gota a gota una solución de dimetilamina 2M en MeOH (4.14 mL, 8.28 mmol), durante un período de cuatro horas. La solución se deja agitando a temperatura ambiente por 48 hs. Luego se filtra el precipitado formado en la mezcla de reacción y se lava el sólido obtenido con diclorometano. Se seca el sólido durante 6 días a temperatura ambiente y se recristaliza en MeOH, obteniéndose **12** como un sólido azul oscuro (1.08 g, 42%).¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm):¹⁶⁰ 8.23 (dd, *J*=8.0 Hz, 1. 2Hz, 1H, H9), 8.16 (dd, *J*=8.4 Hz, 1.2 Hz, 1H, H6), 8.10 (d, *J*=10 Hz, 1H, H1), 8.04 (dd, *J*=10 Hz, 2.8 Hz, 1H, H2), 7.98 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, H4), 7.89-7.81 (m, 2H, H7, H8), 3.65 (s, 3H, NCH₃), 3.61 (s, 3H, NCH₃).



Yoduro de 3,7-Di-(dimetilamino)fenotiazin-5-io, Azul de metileno como sal de ioduro (9):

Se disuelve **11** (1.0 g, 1.38 mmol) en diclorometano (80 mL). Seguidamente se agrega gota a gota una solución de dimetilamina 2M en MeOH (2.76 mL, 5.52 mmol), durante un período 5 minutos. La solución se agita a temperatura ambiente por 24 horas. Seguidamente se agregan 2 equivalentes de dimetilamina 2 M en MeOH (1.38 mL, 2.76 mmol) y se deja agitando a temperatura ambiente por 24 horas. Se lava el crudo con H₂O (3 x 80 mL). Los lavados se juntan y se extrae con diclorometano (5 x 50 mL). Las capas orgánicas se juntan y se secan con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene de esta manera un sólido azul oscuro correspondiente a **9** (450 mg, 79%).¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.00 (d, *J*=9.2 Hz, 2H, H1, H9), 7.53 (dd, *J*=9.2, 2.8 Hz, 2H, H2, H8), 7.40 (d, *J*=2.4 Hz, 2H, H4, H6), 3.42 (s, 12H, NCH₃).



Radiosíntesis y control de calidad de [¹¹C]azul de metileno

Se utilizaron materiales, equipos y metodologías similares a las descriptas para [¹¹C]clorgilina, a excepción de las condiciones de HPLC. Para el HPLC analítico se utilizó una columna EC 150/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel), fase móvil A: ácido metanosulfónico 0.3%, ácido acético 0,9% en agua; fase móvil B: Acetonitrilo. Gradiente de 0 a 6 min 20% de B, de 6 a 15 min 25% de B; flujo 1.5 mL/min.

Consideraciones generales de los métodos de radiosíntesis y control de calidad

Solamente se realizaron estudios mediante HPLC analítico. El rendimiento radioquímico fue calculado considerando el cromatograma gamma del HPLC analítico.

Métodos de radiosíntesis: acondicionamiento previo del módulo TRACERIab FX C Pro

En la Figura 19 se muestra el esquema del módulo semi-automatizado de síntesis TRACERIab FX C Pro utilizado para la producción del [¹¹C]azul de metileno.



Figura 19. Módulo semi-automatizado de síntesis. Se muestra en la figura un esquema del módulo automatizado de síntesis TRACERIab FX C Pro, las tubuladuras y válvulas utilizadas para la síntesis de [¹¹C]azul de metileno.

Acondicionamiento del módulo de síntesis y pasos preliminares

El acondicionamiento del módulo se llevó a cabo de la misma manera que para [¹¹C]clorgilina y [¹¹C]harmina a excepción de que no se realizaron los "*delivery* frío", ni "*delivery* caliente".

Producción del precursor secundario [¹¹C]dimetilamina ([¹¹C]DMA)

Una vez producido el [¹¹C]Mel como se describió anteriormente para la obtención tanto de [¹¹C]clorgilina como de [¹¹C]harmina, el mismo fue barboteado en el reactor donde se encontraba una solución de metilamina 2 M en THF (0.4 mL) y DMSO (50 μ L) a -15°C. Seguidamente se forma el precursor secundario [¹¹C]dimetilamina calentando la mezcla durante 10 minutos a 45°C.

Métodos de radiosíntesis (radiomarcado)

Una vez formada la [¹¹C]DMA, se envía desde el Vial 2 una solución del precursor orgánico **12** (37 mg) y trietilamina (10 μ L, 1.2 Equivalentes) en 600 μ L de DMSO (Figura 18). La mezcla se calienta a 40°C durante 10 minutos. Luego se agregan 250 μ L de DMSO desde V3 y se envía al vial final que contiene 2 mL de DMSO.

Purificación y formulación

El crudo obtenido del apartado anterior, se analizó mediante HPLC analítico sin posterior purificación, ni formulación.

Métodos de control de calidad

Las impurezas químicas y radioquímicas se determinaron mediante radio-HPLC utilizando las condiciones descriptas anteriormente. El análisis de HPLC completo fue de 15 minutos. El tiempo de retención del precursor (**12**), de Azure B comercial (**8**) y Azul de metileno (**9**) fueron 4.0, 10.2 y 12.3 minutos respectivamente. La identidad química de [¹¹C]**9** fue determinada por comparación del tiempo de retención del estándar de referencia **9** sin marcar. Los cromatogramas se registraron con un detector de arreglo de diodos (λ : 590 y 664 nm) y gama en serie.

3.1.4.2 Resultados y discusión

Estrategia inicial para la obtención de [¹¹C]azul de metileno

Inicialmente, se siguieron las únicas dos técnicas descriptas en la literatura para obtener [¹¹C]azul de metileno a partir del precursor azure B (**8**).^{130,131} Para ello, se adquirieron comercialmente un estándar de azul de metileno y el precursor (azure B), con el fin de marcar este último con carbono-11, mediante una reacción de *N*-metilación nucleofílica (Esquema 11).



Esquema 11. Estrategia de radiosíntesis para la obtención de [¹¹C]azul de metileno a partir de azure B. Las condiciones ensayadas se describen en la Tabla 4.

Previamente, se puso a punto un sistema analítico de HPLC, mediante modificaciones de la técnica descrita por Schweiger y col.; ya que al intentar reproducir la misma, no se pudo separar el estándar de azul de metileno de su respectivo precursor.¹³⁰ En la Figura 20 se muestra el cromatograma obtenido, donde el pico de mayor tiempo de retención (7.2 min) corresponde al estándar de azul de metileno, seguido de azure B (5.4 min).



Figura 20. Cromatograma, 664 nm. Resolución de azure B (5.4 min) y azul de metileno (7.2 min) 0.01mg/mL.

Una vez obtenido el sistema analítico de HPLC, se realizaron diversos estudios de marcación hasta reactor, basándonos inicialmente en las técnicas mencionadas anteriormente. Además, se variaron diferentes condiciones de marcado como el tiempo, agente metilante y disolventes (ver Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones de marcación para la obtención de [¹¹C]azul de metileno a partir de azure B. La masa de precursor utilizada fue de 1.0-1.4 mg."*": corresponden a blancos de marcado (sin el agregado de precursor).

Entrad	Agente metilante	Disolvente(s)	T (ºC)	t
а				(min)
а	MeOTf	MeCN	T amb	5
b*	MeOTf	MeCN	T amb	5
С	MeOTf	MeCN	80	1
d*	MeOTf	MeCN	80	1
e*	Mel	MeCN/DMF/DMSO	120	5
f	Mel	MeCN/DMF/DMSO	120	5
g	MeOTf	MeCN/DMF/DMSO	120	5
h*	MeOTf	MeCN/DMF/DMSO	120	5

En este contexto, no se logró obtener el producto de interés bajo ninguna de las condiciones ensayadas. En la Figura 21 se muestra el cromatograma del marcado correspondiente a las entradas a y b de la Tabla 4.



Figura 21. Radiocromatogramas. Izquierda: marcación entrada a, Tabla 4. Derecha: marcación entrada b, Tabla 4 (blanco).

En el cromatograma se puede observar que aproximadamente a 5.9 minutos aparece un pico principal en el marcado (Figura 21, izquierda) que no se corresponde con el producto de interés. Este último debería presentar un tiempo de retención de aproximadamente 7.2 minutos, según lo visto en el sistema de HPLC analítico (Figura 20). La aparición de este pico con t_r 5.9 se observó en todas las condiciones de marcación ensayadas, no evidenciándose su presencia en los blancos de reacción (Tabla 4, entradas: b, d, e y h). Estos resultados dieron lugar al planteo de la hipótesis de que el mismo se correspondería con [¹¹C]MeCl, producto de un intercambio de contraión entre el agente metilante y la sal del precursor

(cloruro). Esto fue corroborado mediante el ensayo de una reacción entre cloruro de benzalconio (sal de amonio cuaternaria) en presencia del agente metilante [¹¹C]Mel (Esquema 12), como había evidenciado nuestro grupo de investigación en un trabajo previo.¹⁵⁴



Esquema 12. Formación de [¹¹C]MeCl a partir de cloruro de benzalconio y [¹¹C]Mel.

En la Figura 22 se muestra el cromatograma obtenido de la reacción mencionada (Esquema 12). En dicho cromatograma se observa un pico con un tiempo de retención de 5.91 minutos, que se corresponde con los resultados obtenidos de todos los intentos de marcación de azure B para obtener azul de metileno (Tabla 4, Entradas: a, c, f y g).



Figura 22. Radiocromatograma. Marcado de 5 μ L de cloruro de benzalconio con [¹¹C]MeI en MeCN, a temperatura ambiente por 5 minutos.

Estos resultados demuestran que las condiciones descriptas en los artículos de Schweiger y colaboradores, dan como resultado la obtención de [¹¹C]MeCI en lugar de [¹¹C]azul de metileno. A su vez, dado que el sistema analítico que describen no es capaz de resolver el precursor (azure B) del estándar de azul de metileno, al realizar una coinyección del estándar de azul de metileno y el producto marcado

como se describe, no les permitiría corroborar que realmente obtuvieron [¹¹C]azul de metileno. En suma, los intentos de reproducir los dos únicos antecedentes reportados para la obtención de [¹¹C]azul de metileno a partir del precursor azure B mediante la vía clásica de *N*-metilación nucleofílica (ver Esquema 11), resultaron en la obtención de otro compuesto ([¹¹C]MeCl). En este contexto, tratando de cumplir con el objetivo específico de obtener este inhibidor reversible de MAO-A marcado con carbono-11, nos planteamos el diseño de una nueva estrategia para su obtención. La misma se basó teniendo en cuenta la síntesis orgánica convencional de azul de metileno y derivados, además de una estrategia reportada para la incorporación de carbono-11 mediante [¹¹C]dimetilamina (Esquemas 13 y 14).^{150,161,162,163} Como se representa en el Esquema 13, utilizando triyoduro de 3-(dimetilamino)fenotiazin-5-io (**12**) como precursor, mediante una reacción de tipo sustitución nucleofílica aromática en presencia de [¹¹C]dimetilamina, se podría generar [¹¹C]azul de metileno ([¹¹C]**9**).



Esquema 13. Síntesis del precursor de azul de metileno (**12**) a partir de fenotiazina (**10**). a) CH₂Cl₂, T amb, 5 hs, 92%; b) i) CH₂Cl₂, dimetilamina 2 M en MeOH (2 eq), T amb, 48 hs, 42% (para obtener **12**); ii) ó CH₂Cl₂, dimetilamina 2 M en MeOH (4 eq), T amb, 48 hs, 79% (para obtener **9**).

Inicialmente, se obtuvo el precursor de marcación de azul de metileno (**12**), en dos pasos sintéticos con un rendimiento global de 38% (Esquema 13). El primer paso de la ruta consistió en una reacción de oxidación de fenotiazina comercial (**10**) en presencia de yodo para obtener el intermediario de fenotiazin-5-io **11**. Posteriormente, se realizó una reacción de tipo sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) sobre el intermediario **11**, utilizando dos equivalentes de dimetilamina para

obtener el precursor 12. Si bien el rendimiento global de la ruta sintética desde el punto de vista de la síntesis orgánica resultó bajo, desde el punto de vista de la radioquímica, donde solo se utilizan solo unos miligramos de precursor para cada experimento, el mismo resulta adecuado para continuar con los experimentos de marcación. A su vez, se llevó a cabo otra reacción de S_NAr a partir del producto **11**, utilizando un exceso de cuatro equivalentes de dimetilamina, con el fin de obtener azul de metileno como sal de ioduro (9). Esto nos permitió contar con un estándar "frío" (no radioactivo) de azul de metileno como sal de ioduro, el cual se comparó mediante HPLC analítico con el azul de metileno comercial (sal de cloruro). Se observó que ambos tenían el mismo tiempo de retención, por lo que se determinó que el contraión no afecta dicho parámetro. En este contexto, todos los productos obtenidos fueron caracterizados por experimentos de RMN (¹H, COSY, HSQC y HMBC). En la Figura 23, se muestra el espectro de ¹H-RMN donde se confirma la estructura del derivado de fenotiazin-5-io **12**, precursor propuesto para la obtención de [¹¹C]azul de metileno mediante la estrategia ya mencionada (Esquema 14). Como se puede observar en el espectro, las señales a desplazamientos químicos 8.07 (doblete con acoplamiento orto), 8.03 (doble doblete) y 7.97 ppm (doblete acoplamiento meta), corresponderían a los hidrógenos H1, H2 y H4, respectivamente, presentes en el anillo bencénico con el sustituyente dimetilamino. La incorporación de este último grupo funcional se confirmaría por la presencia de dos singuletes a 3.64 y 3.61 ppm (ambos con integración 3H).



Figura 23. Espectro ampliado de ¹H-RMN de **12** en DMSO_{d6}, con la asignación de las señales correspondiente.

Establecimiento del sistema analítico de HPLC

Una vez obtenido el precursor **12** y estándar "frío" de azul de metileno (**9**), se puso a punto un sistema analítico de HPLC que permite diferenciar el precursor **12** tanto del azul de metileno, como de azure B (**8**). Este último es un potencial producto secundario de la reacción entre el precursor **12** y metilamina utilizada en exceso para obtener [¹¹C]dimetilamina. El sistema analítico de HPLC se basó en el anteriormente utilizado para diferenciar azul de metileno de azure B (Figura 24) con la incorporación de un gradiente de disolventes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23, donde pueden observarse 3 picos. El de mayor tiempo de retención (12.3 minutos) corresponde al estándar de azul de metileno (**9**, tanto con el contraión cloruro, como ioduro), seguido de Azure B (**8**, 10.2 min) y el de menor

tiempo de retención (4.0 min) corresponde al precursor **12.** Se utilizaron dos longitudes de onda, ya que el azul de metileno y el azure B tienen una longitud de onda máxima de absorción a 664 nm, mientras que para el precursor **12** la longitud de onda máxima de absorción es a 590 nm.



Figura 24. Cromatograma 590 y 664 nm. Resolución de Azul de metileno (12.3 min), Azure B (10.2 min) y el precursor **12** (4.0 min). Columna C18 150/4.6 mm, 5µ. Fase móvil A: ácido metanosulfónico 0.3%, ácido acético 0,9% en agua; fase móvil B: Acetonitrilo. De 0 a 6 min 20% de B, de 6 a 15 min 25% de B; flujo 1.5 mL/min.

Radiosíntesis de [¹¹C]azul de metileno mediante estrategia con [¹¹C]dimetilamina

Una vez establecido el sistema analítico de HPLC, se diseñó un método semiautomatizado para la obtención de [¹¹C]azul de metileno mediante S_NAr con [¹¹C]dimetilamina (Esquema 14).


Esquema 14. Ruta propuesta para la síntesis de [¹¹C]azul de metileno mediante sustitución nucleofílica aromática de su precursor (**12**) con [¹¹C]dimetilamina.

Esto representó un desafío a la hora de llevarlo a cabo en el módulo de síntesis automatizado. En las *N*-metilaciones nucleofílicas convencionales, se barbotea directamnte el agente metilante ([¹¹C]MeI o [¹¹C]MeOTf) en el reactor que contiene al precursor (nucleófilo). En este caso el precusor es un electrófilo, el cual se adiciona (desde V2) luego de formar la [¹¹C]dimetilamina (nucleófilo) en el reactor (Figura 19). La [¹¹C]dimetilamina se obtiene en el reactor a partir de la reacción de *N*-metilación nucleofílica de metilamina (2M en THF) con [¹¹C]MeI, calentando a 45°C durante 10 minutos. En este contexto, una vez diseñado el método semi-automatizado, se probaron diferentes condiciones para la obtención de [¹¹C]azul de metileno a partir de la marcación del precursor **12** con [¹¹C]dimetilamina (ver Esquema 14), las mismas se resumen en la Tabla 5. Los datos expuestos en la Tabla 5 corresponden a marcaciones hasta reactor (sin posterior purificación).

Entrada	T (ºC)	m de precursor (mg)	Observaciones
а	40	3	-
b	80	3	-
С	T amb	3	-
d	40	3	1.5 eq de ácido ascórbico
е	40	3	2 eq de DMA "fría"
f	40	37	

Tabla 5. Condiciones de experimentos de marcación hasta reactor de **12** con [¹¹C]dimetilamina. El tiempo de marcación en todos los casos fue de 10 minutos y el disolvente utilizado dimetilsulfóxido (DMSO).

En este contexto, tanto las variaciones de temperatura (Tabla 5, entradas a, b y c), como la adición de un antioxidante para determinar si había un problema de radiólisis (Tabla 5, entrada d) y la adición de dimetilamina no marcada con el fin de desplazar el equilibrio de formación (Tabla 5, entrada e), no resultaron en la obtención del producto de interés. En este sentido, todos los experimentos mencionados (Tabla 5, entradas a-e) tuvieron el mismo resultado, un pico único en el radiocromatograma con un tiempo de retención de 1.14 minutos (Figura 25). El pico obtenido se corresponde con el tiempo de retención de [¹¹C]DMA sin reaccionar, como se determinó en un experimento de blanco de marcación.



Figura 25. Radiocromatograma correspondiente a entrada c (Tabla 5). Los mismos resultados se obtuvieron para las condiciones ensayadas de las entradas a-e (Tabla 5).

Cabe destacar que en los experimentos correspondientes a las entradas a-e (Tabla 5) se utilizaron 3 mg de precursor, debido a que usualmente en radiofarmacia las masas de precursor utilizadas en marcaciones con carbono-11 son de entre 1 y 5 mg. Cuando la masa se aumentó a 37 mg, respetando la utilización de 0.06 mmol de precursor como establecía la técnica de Jacobson y col., para marcaciones con

[¹¹C]dimetilamina (Tabla 5, Entrada f), se logró obtener el producto de interés con un rendimiento radioquímico de 11% (Figura 26). Además, la base utilizada fue trietilamina en lugar de DIPEA como lo establecía la técnica mencionada.



Figura 26. Radiocromatograma correspondiente a la entrada f (Tabla 5). El pico en 12.44 minutos se corresponde con el tiempo de retención del estándar de azul de metileno. Pureza radioquímica 11%.

A su vez, remarcar que todos los productos marcados mediante la vía [¹¹C]dimetilamina descriptos en la técnica de Jacobson y colaboradores, fueron obtenidos con un 10-25% de rendimiento radioquímico.¹⁵⁰ Utilizaron precursores electrofílicos alifáticos con diferentes sustituyentes que afectaban la reactividad del mismo. En nuestro caso, se trata de una reacción de S_NAr, sobre un precursor electrofílico aromático, obteniéndose un rendimiento coherente dentro del rango reportado para los compuestos mencionados.

Por último, dado que los resultados obtenidos inicialmente no fueron alentadores y en el contexto del trabajo de tesis se estaban llevando a cabo ensayos biológicos *in vivo*, no se continuó con la optimización de marcaciones, para su producción y formulación final para uso en estudios in vivo. Sin duda, continuar con los estudios para la obtención de [¹¹C]azul de metileno es una puerta que permanecerá abierta para llevarlo a cabo a futuro. Además, debido al bajo rendimiento obtenido en los experimentos iniciales, tampoco se continuó con la puesta a punto de un sistema de purificación, ni se establecieron los protocolos para el control de calidad completo.

95

3.1.4.3 Conclusiones

Los intentos de reproducir los antecedentes descriptos en la literatura para la obtención de [¹¹C]azul de metileno mediante la vía clásica de *N*-metilación nucleofílica del precursor azure B, resultaron infructuosos. En este sentido, se demostró que lo obtenido mediante estos antecedentes es [¹¹C]MeCl. Por ello, se planteó una estrategia alternativa, basada en la síntesis orgánica de azul de metileno y una técnica para incorporar [¹¹C]dimetilamina en un precursor adecuado. De esta manera, se sintetizó eficientemente el precursor triyoduro de 3-(dimetilamino)fenotiazin-5-io (**12**) y se ensayaron diferentes condiciones de marcación. Así, se logró obtener [¹¹C]azul de metileno con 11% de rendimiento radioquímico (hasta reactor, sin purificar). Por lo tanto, es necesario realizar ensayos a futuro para lograr obtener [¹¹C]azul de metileno de manera eficiente, y establecer los protocolos de producción y de control de calidad del mismo, con el fin de llevar a cabo estudios *in vivo*.

3.2 Obtención de Inhibidores de MAO-A marcados con flúor-18

3.2.1 Introducción

Estrategia de marcación con flúor-18

A pesar de que solo existen una pequeña cantidad de compuestos fluorados en la naturaleza, la incorporación de flúor-18 en diferentes moléculas es de gran relevancia para la imagenología PET. En este contexto, se mencionó anteriormente que la incorporación de flúor-18 podría alterar las propiedades biológicas de un compuesto marcado con dicho radionucleido respecto a su homólogo natural. No obstante, sus excepcionales características como emisor de positrones, la extraordinaria estabilidad del enlace carbono-flúor (C-F) y las similitudes estéricas y electrostáticas del enlace C-F con los enlaces carbono-hidrógeno (C-H) y carbonohidroxilo (C-OH), determinan que sea el radionucleido emisor de positrones de mayor importancia para la imagenología PET. Resaltar además que existe un número importante de fármacos de uso clínico y en desarrollo preclínico conteniendo flúor, por lo tanto, resulta un área importante en el desarrollo de 18Fradiofármacos. Otro punto importante a destacar es el óptimo período de semidesintegración (109.7 minutos) que presenta el fluor-18, lo cual permite aumentar los pasos de síntesis involucrados en la producción de un radiotrazador. Además de mayores tiempos de investigación in vivo y la posibilidad de distribución a centros PET relativamente cercanos, que no tengan los medios para producir este radionucleido.133,164,165

En este caso, la producción de flúor-18 a nivel de ciclotrón se puede llevar a cabo mediante diferentes estrategias, dependiendo de las reacciones químicas subsecuentes que permitirán introducir este radionucleido en un precursor orgánico adecuado. De acuerdo con la reacción nuclear que se describe a continuación, la cual consiste en bombardear con protones un isótopo natural estable del oxígeno

97

(¹⁸O), permite obtener ¹⁸F bajo dos especies químicas diferentes según el contenido del blanco del ciclotrón, con la concomitante emisión de un neutrón:

$${}^{18}O(p,n){}^{18}F ({}^{18}_{8}O + {}^{1}_{1}p \rightarrow {}^{18}_{9}F + {}^{1}_{0}n)$$

De esta manera, si el contenido del blanco es [¹⁸O]H₂O (I), se obtiene una solución acuosa del ión [¹⁸F]fluoruro ([¹⁸F]F⁻); de otra manera si se bombardea un blanco que contenga $[^{18}O]O_2$ (g), entonces se obtiene $[^{18}F]F_2$ (g). A su vez, esta última especie ([¹⁸F]F₂) puede ser obtenida al bombardear Neón (Ne) con deuterones (²₂d). El ión fluoruro se utiliza posteriormente en reacciones químicas como un nucleófilo (fluoraciones nucleofílicas), mientras que el [¹⁸F]F₂ (g) se produce para su uso en métodos electrofílicos (fluoraciones electrofílicas). En este contexto, la producción de una especie u otra, condiciona la actividad molar obtenida. El [18F]fluoruro se obtiene con alta eficiencia, con actividades generalmente superiores a los 370 GBq/lote, con una actividad molar superior a los 100 Gbq/µmol. Por el contrario, la especie electrofílica [18F]F2 es obtenida con una actividad molar mucho menor (0.1-0.6 GBg/µmol), debido a que se debe adicionar flúor-19 como carrier para extraer el [¹⁸F]F₂ del blanco. Esta adición de [¹⁹F]F₂ conlleva a un aumento de la masa final del radiotrazador, lo que puede tener como consecuencia una saturación de un receptor y una reducción de la señal PET de unión específica. Incluso una alta masa puede causar un efecto farmacológico. En este sentido, dadas las elevadas actividades obtenidas desde ciclotrón, la alta actividad molar obtenida, la cual es fundamental para la imagenología de receptores específicos, determinan que las fluoraciones nucleofílicas sean las estrategias más extendidas para la obtención de radiofármacos PET.^{165,166}

Como se comentó anteriormente, la estrategia de obtención del ¹⁸F a nivel de ciclotrón determinan las posteriores reacciones químicas para incorporar dicho radionucleido en un precursor adecuado. En este contexto, se mencionó que el [¹⁸F]F₂ utilizado en metodologías electrofílicas requería la adición de [¹⁹F]F₂ para la extracción del blanco. De esta manera, los radiotrazadores obtenidos mediante esta estrategia tendrán una actividad molar baja. Además, los rendimientos

98

radioquímicos teóricos que empleen dicha metodología serán de 50%, debido a que habrá un átomo de ¹⁹F por cada átomo de ¹⁸F, en cada molécula de F₂. En las reacciones químicas involucradas, el [¹⁸F]F₂ es barboteado en una solución que contiene el precursor adecuado. De esta manera el flúor reacciona con reactivos donadores de electrones tales como alquenos, anillos aromáticos o carbaniones para formar un enlace covalente flúor-carbono. Los tipos de reacciones comúnmente involucradas son adiciones a dobles enlaces o sustituciones electrofílicas aromáticas de grupos trialquilestaño o mercurio. Cabe destacar que debido a la alta reactividad y peligrosidad del F₂, los pobres rendimientos de producción, bajas actividades molares y el alto costo de los blancos específicos que se utilizan a nivel del ciclotrón, las fluoraciones electrofílicas no son comúnmente utilizadas en la actualidad. ^{167,168}

Por otra parte, la obtención del ¹⁸F como anión fluoruro ([¹⁸F]F⁻), permite realizar reacciones de fluoración nucleofílicas, donde el radionucleido participa como un nucleófilo. Dichas estrategias son las más utilizadas para la obtención de radiotrazadores y radiofármacos PET de flúor-18. En su mayoría, se trata de reacciones de sustitución nucleofílicas bimoleculares (SN₂) en compuestos alifáticos y sustituciones nucleofílicas aromáticas (S_NAr), tanto en derivados de benceno como en sistemas heterocíclicos aromáticos que tengan un grupo saliente adecuado. De esta manera, las fluoraciones nucleofílicas permiten obtener una gran diversidad de radiotrazadores y radiofármacos, con una alta actividad molar e importantes rendimientos radioquímicos. Sin embargo, a pesar de que el anión fluoruro es un nucleófilo fuerte, en solución acuosa forma enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua circundantes lo que disminuye drásticamente su reactividad para llevar a cabo una reacción de sustitución nucleofílica. Por ello, es necesaria la eliminación del agua, que generalmente se lleva a cabo por destilación azeotrópica en presencia de acetonitrilo, para la posterior solubilización del fluoruro en un disolvente orgánico aprótico (por ejemplo: DMF, DMSO, Acetonitrilo). Además, se favorece la solubilidad y nucleofilia del [¹⁸F]F⁻ mediante el uso de catalizadores de transferencia de fase (como el éter corona Kryptofix 2.2.2 que forma un complejo con K⁺), o bien mediante la adición de cationes de tetrabutilamonio voluminosos. En este contexto, también se utilizan bases (cuando sean necesarias) que presenten una nucleofilia muy pobre, como carbonatos o iones bicarbonato. En suma, la solución acuosa de [¹⁸F]F⁻ obtenida desde el ciclotrón, se trata con la sal adecuada (catión y si es necesario agente complejante y el anión adecuado), previo a la evaporación del agua, para su posterior solubilización en el disolvente donde se llevará a cabo la reacción de fluoración nucleofílica sobre un precursor adecuado. Por último, si fuera necesario se procede a la eliminación de grupos protectores que esten presentes en la molécula (Esquema 15).^{169,165} En el esquema 16, se muestra la aplicación de la estrategia mencionada a la radiosíntesis de 2-desoxi-2-[flúor-18]fluoro-D-glucosa ([¹⁸F]FDG), el radiofármaco PET más utilizado en la clínica con fines diagnósticos. ¹⁷⁰



Esquema 15. Fluoración nucleofílica. Se muestra de manera general, los pasos involucrados en un proceso de fluoración nucleofílica. En el ciclotrón se produce el [¹⁸F]F⁻ el cual generalmente es retenido en un cartucho SEP-PAK QMA; luego se eluye el mismo utilizando K₂CO₃, de esta manera se obtiene [¹⁸F]KF; se utiliza Kryptofix como catalizador de transferencia de fase para aumentar la nucleofilia del fluoruro; luego se produce la sustitución nucleofílica sobre un precursor orgánico con un grupo saliente adecuado (Gs); finalmente se eliminan grupos protectores (Gp) que puedan haber en la molécula precursora, quedando los grupos funcionales que conforman el radiotrazador deseado.



Esquema 16. Radiosíntesis de [¹⁸F]FDG. Se muestra la fluoración nucleofílica del precursor 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonilo-β-D-manopiranosa (triflato de manosa), y en un segundo paso la eliminación de los grupos protectores acetato mediante hidrólisis básica para formar [¹⁸F]FDG. Tomado de referencia 134.

Por último, cabe destacar que existen otras estrategias para la incorporación de ¹⁸F en moléculas de interés biológico como las radiofluorinaciones mediadas por metales de transición y estrategias para la incorporación de dicho radionucleido en biomoléculas como péptidos, proteínas y oligonucleótidos. En este sentido, es conveniente destacar de manera breve una metodología en particular para marcar péptidos, la cual utiliza un complejo flúor-aluminio para introducir ¹⁸F en dichas moléculas. Si bien las pequeñas moléculas son típicamente marcadas con ¹⁸F mediante la formación un enlace C-F, estos procesos son diseñados de manera única para cada biomolécula en cuestión y requiere una gran cantidad de pasos y tiempo para obtenerlas de manera eficiente. Sin embargo, la formación del complejo Al¹⁸F, permite la unión del mismo a un agente guelante unido a un péptido, formando un complejo estable Al¹⁸F-quelante-péptido en un eficiente proceso en una sola etapa (Esquema 17). Esta estrategia es la misma que se utiliza para marcar con radiometales como el ⁶⁸Ga, de esta manera es posible marcar con ¹⁸F muchas moléculas que comúnmente son marcadas con radiometales, manteniendo todas las ventajas que presenta el uso de ¹⁸F en radiofarmacia PET. Esta metodología, es la utilizada actualmente en Cudim para producir el radiofármaco de diagnóstico [¹⁸F]AIF-PSMA-11, con uso clínico en cáncer de próstata.^{171,172,173}



Esquema 17. Radiomarcado con Al¹⁸F. Se muestra un esquema general de marcado de un péptido (representado con el círculo gris), que presenta un anillo quelante NOTA en su estructura, el cual forma un complejo Al¹⁸F-quelante-péptido. Las condiciones típicas utilizadas son un buffer que mantenga un pH alrededor de 4 (por ejemplo: acetato de sodio), temperatura y tiempo adecuado para cada radiotrazador. Adaptado de referencia 165.

En suma, existen varias estrategias para la incorporación de ¹⁸F en diferentes moléculas, dadas las versátiles propiedades que presenta dicho radionucleido para su uso en imagenología PET. En este sentido, en el presente trabajo se describirá la obtención de un derivado de harmina marcado con flúor-18, el 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol, mediante la estrategia de fluoración nucleofílica. El marcado de este compuesto con flúor-18, permitirá estudios *in vivo* más prolongados que los llevados a cabo con [¹¹C]harmina.

3.2.2 Radiosíntesis y control de calidad de 2-[18F]fluoroetil-harmol

3.2.2.1 parte experimental

Materiales, equipos y técnicas utilizadas en la síntesis orgánica de estándar y precursor de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol

7-(2-Tosiloxietoxi)-1-metil-9*H*-pirido[3,4-b]indol¹⁷⁴ (13):

Bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelve harmol **7** (150 mg, 0.76 mmol) en DMF seco (1 mL), se agita la mezcla durante 5 minutos, se agrega Cs₂CO₃ (362 mg, 0.81 mmol) y se agita por 20 minutos. La mezcla se lleva a baño de agua-hielo y se agrega una solución del derivado ditosilado **15** (300 mg, 1.11 mmol) en DMF seco

(1.5 mL) previamente preparada bajo atmósfera de nitrógeno. La solución se agita por 20 minutos en baño de agua hielo y luego se deja agitando a temperatura ambiente por 26 horas. Seguidamente se disuelve el crudo en H₂O (20 mL) y se extrae con acetato de etilo (1x20mL y 6x10mL). Debido a la formación de emulsiones se agregan 5 mL de NaCl sat. Se juntan las capas orgánicas, se secan con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida. El exceso de DMF se evapora a presión reducida con el agregado de 10 mL de tolueno. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna (SiO₂, diclorometano : metanol 9 : 1) obteniéndose **13** como un aceite amarillo (138 mg, 46%).¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):¹⁷⁴ 11.42 (s, 1H, NH), 8.15 (d, *J*=5.2 Hz, 1H, H3), 8.05 (d, *J*= 8.8, 1H, H5), 7.84-7.80 (m, 3H, H4, HAr Tosil), 7.49 (d, *J*=8.0Hz, 2H, HAr Tosil), 6.94 (d, *J*=2Hz, 1H, H8), 6.75 (dd, *J*=8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H, H6), 4.41-4.39 (m, 2H, CH₂OSO₂), 4.28-4.26 (m, 2H, CH₂O-Ar), 2.72 (s, 3H, CH₃-Piridina), 2.40 (s, 3H, CH₃-Tosilo).



7-(2-Fluoroetoxi)-1-metil-9*H*pirido[3,4-b]indol¹²⁵ (2-fluoroetil-harmol) (14):

Bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelve harmol **7** (37.7 mg, 0.19 mmol) en 5 mL de etanol seco, seguidamente se agrega K₂CO₃ (37.3 mg, 0.27 mmol) y se agita la mezcla durante 15 minutos. Luego se agrega una solución de **16** (41.6 mg, 0.19 mmol) en 2.5 mL de etanol seco y se calienta la mezcla a 75°C durante 3 horas y seguidamente se deja agitando a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Luego, se agregan otros 0.5 equivalentes de **16** (22 mg, 0.10 mmol) en 2 mL de etanol seco y se calienta la reacción a 75°C durante 3 horas, se deja enfriar y se

deja agitando a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Finalmente, se evapora el etanol a presión reducida y se purifica mediante cromatografía en columna el crudo en SiO₂ flash (diclorometano : metanol 9 : 1), obteniéndose **14** como un sólido amarillo pálido (41.1 mg, 89%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d6) $\overline{0}$ (ppm):¹²⁵ 11.52 (s, 1H, NH), 8.18 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, H3), 8.10 (d, *J*= 8.8, 1H, H5), 7.59 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, H4), 7.05 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, H8), 6.91 (dd, *J*=8.4 Hz, *J*=2.0 Hz, 1H, H6), 4.89-4.77 (dt, *J* = 47 Hz, *J* = 4 Hz, 2H, CH₂CH₂F), 4.41-4.33 (dt, *J* = 27 Hz, *J* = 4.4 Hz, 2H, <u>CH₂CH₂F), 2.74 (s, 3H, CH₃).¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d6) $\overline{0}$ (ppm): 159.5 (C7), 142.5 (C1), 141.6 (C8a), 137.7 (C3), 135.0 (C1a), 127.9 (C4a), 123.3 (C5), 115.6 (C5a), 112.6 (C4), 109.9 (C6), 96.0 (C8), 83.5 (d, *J*=165.7, CH₂CH₂F), 67.9 (d, *J*=18.8 Hz, <u>C</u>H₂CH₂F), 20.6.</u>



Etilenglicol ditosilado¹⁷⁵ (15):

Bajo atmósfera de nitrógeno, se agregan 3.2 g de *p*-TsCl (16.8 mmol), seguido de 6 mL de CH₂Cl₂ seco y 0.45 mL de etilenglicol (8 mmol). La mezcla de reacción se lleva a baño de agua-hielo y se agrega gota a gota en un período de 5 minutos una solución de trietilamina (2.34 mL) en CH₂Cl₂ (4 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente por 7 días. Luego la mezcla de reacción se diluye en 20 mL de CH₂Cl₂ y se filtra. Las aguas madre se lavan con NaCl saturado (3x20mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se rotaevapora el disolvente hasta tener aproximadamente 5 mL. Seguidamente se agregan 10 mL de dietil éter hasta que se forma un precipitado blanco, luego se rotaevapora todo el disolvente. El precipitado obtenido se purifica mediante cromatografía en columna (Al₂O₃, n-hexano: acetato de etilo 6:4), obteniéndose **15** como un sólido blanco (2.1 g, 70%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):¹⁷⁵ 7.75 (d, *J*=8.0 Hz, 4H), 7.35 (d, *J*=8.0 Hz, 4H), 4.19 (s, 4H), 2.46 (s, 6H).



Tosilato de 2-fluoroetilo¹⁷⁶ (16):

Bajo atmósfera nitrógeno, se disuelve **15** (750 mg, 2.0 mmol) en acetonitrilo (25 mL), seguidamente se agregan KF (117.5 mg, 2.0 mmol) y Kryptofix[®] K222 (760 mg, 2.0 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 4 horas y luego se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna en Al₂O₃ (n-hexano: acetato de etilo 6:4) obteniéndose **16** como un aceite transparente (69.6 mg, 16%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):¹⁷⁶ 7.82 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, H2,6), 7.37 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, H3,5), 4.64-4.53 (dt, *J* = 47 Hz, *J* = 4 Hz, 2H, CH₂CH₂F), 4.31-4.24 (dt, *J* = 27 Hz, *J* = 4.4 Hz, 2H, <u>CH₂CH₂F), 2.46 (s, 3H, CH₃).</u>



Radiosíntesis y control de calidad de 2-[18F]fluoroetil-harmol

Materiales, equipos y técnicas utilizadas en la radiosíntesis y control de calidad de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol

Se compraron todos los productos químicos y disolventes de fuentes comerciales (Merck, Sigma-Aldrich y Carlo Erba). Los mismos fueron de calidad analítica y se utilizaron sin posterior purificación. El [¹⁸F]F⁻ solubilizado en [¹⁸O]H₂O empleado en las reacciones de marcación fue producido en un ciclotrón PET Trace® 16.5 MeV (GE Healthcare) mediante la reacción nuclear ¹⁸O(p,n)¹⁸F. Para dicha producción se utilizó un blanco de niobio y se bombardearon 2.5 mL de agua enriquecida ([¹⁸O]H₂O). Las marcaciones con flúor-18 fueron llevadas a cabo en un módulo de síntesis automatizado Synthra RN Plus Research module (Synthra GmbH). Los estudios analíticos fueron realizados en un equipo Shimadzu UFLC equipado con arreglo de diodos y un detector gama, utilizándose una columna EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel), flujo en 1 mL/min, FM: NaH₂PO₄ 25 mM : MeCN; Gradiente: 0 a 6 min 30% MeCN, de 6 a 8 min 80 % MeCN, y de 8 a 15 min 80 % MeCN. La purificación de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol se realizó utilizando un cartucho C18 SEP-PAK plus light y el sistema de HPLC semipreparativo incorporado en el módulo de síntesis automatizado, con una columna VP250/10mm Nucleosil100-5C18 Nautilus (Macherey-Nagel), con fase móvil NaH₂PO₄ (en H₂O, 25 mM) : MeCN(70:30v/v), en un flujo isocrático de 4.0 mL/min. El cartucho Sep-Pak plus light C18 y los filtros esterilizantes 0,22 µm fueron adquiridos de Waters. El pH fue medido con pH-metro. Los disolventes residuales fueron determinados en un cromatógrafo de gases SHIMADZU Nexis GC-2030 Plus equipado con un detector de ionización de llama y con un inyector automático Shimadzu AOC-20iPlus. La columna de cromatografía de gases analítica (GC) fue una DBWAX de 30 m de largo, 0,53 mm de diámetro y con una película de 1,00 mm de espesor (Agilent). La pureza radionucleídica se determinó en un contador gama (detector de centelleo sólido Nal [TI] tipo pozo de 3" × 3" acoplado a un analizador multicanal), ORTEC. La identidad radionucleídica se analizó cronometrando el

decaimiento de la actividad en un calibrador de dosis CAPINTEC CII. Los estudios de pirógenos fueron realizados mediante un kit para detección de endotoxinas LAL Charles Rivers ENDOSAFE PTS[™]. Los ensayos de esterilidad fueron realizados incubando una muestra en TSB a 21.5°C y tioglicolato a 32°C por 14 días.

Métodos de radiosíntesis: radiosíntesis hasta reactor utilizando el módulo Synthra RN Plus Research (Synthra GmbH)

En la Figura 27 se muestra el esquema del módulo semi-automatizado de síntesis Synthra RN Plus Research utilizado para la producción de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol.



Figura 27. Esquema del módulo Synthra RN Plus Research. Se muestra la configuración de tubos y válvulas tal como se utiliza para la síntesis de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol.

Acondicionamiento del módulo de síntesis y pasos preliminares

El reactor se lavó primero con agua para inyección, y seguidamente con acetona de calidad analítica (desde los viales A1, A3 y A6), luego se secó con helio. Los viales que contenían las soluciones de purificación y formulación (C1, C2 y C3) y otros reservorios como el vial SPE 2 (Balón Colector) y el vial de dos bocas (donde finalmente se formula el radiofármaco) se lavaron con agua para inyección, seguidamente se lavaron con etanol absoluto, y luego se secaron completamente con helio (ver Figura 27).

Producción y secado azeotrópico de [¹⁸F]Fluoruro de sodio

El proceso de síntesis se realizó en la plataforma de síntesis semi-automatizada Synthra RN Plus Research. El [¹⁸F]NaF (solubilizado en [¹⁸O]H₂O) se produjo en el ciclotrón a través de la reacción nuclear ¹⁸O(p,n)¹⁸F utilizando un blanco de niobio de 2,5 mL. Para eliminar el agua enriquecida, el fluoruro [¹⁸F] acuoso se atrapó en un cartucho de intercambio aniónico (SEP-PAK QMA, preactivado con 5 mL de K₂CO₃ 0,5 M, seguido de 10 ml de agua para inyección). Luego, el anión fluoruro se eluyó en el Reactor 1 utilizando una solución acuosa de carbonato de potasio (3.5 mg en 100 µL de agua) mezclada con una solución de Kryptofix® 2.2.2 (15 mg en 900 µL de MeCN). La solución se concentró a sequedad para eliminar tanto el acetonitrilo como el agua. El secado se realizó a 65°C durante 5 minutos, seguido de 95°C durante 3 minutos bajo presión reducida y corriente de helio. Tras la eliminación de los disolventes, se aplicó vacío durante 30 segundos a 60°C y se inyectó helio a presión atmosférica.

Métodos de radiosíntesis (radiomarcado)

Se añadió una solución del precursor **13** (2.5 mg) en DMSO anhidro (0.4 mL) al Reactor 1 desde el vial A3, sobre el fluoruro [¹⁸F] activado. La mezcla se calentó a

120°C durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de marcado, la mezcla de reacción se enfrió a 60°C, antes de continuar con el proceso de purificación.

Purificación y formulación

La solución cruda se diluyó con una mezcla de H₂O:MeCN (2 mL, 1:1 (v/v), desde el vial A6) y se transfirió al dispensador automático (inyector, ver Figura 27). Luego, la mezcla se transfirió al circuito de inyección y se purificó mediante HPLC semipreparativo, utilizando NaH₂PO₄ (en H₂O, 25 mM) : MeCN (70:30 v/v) como fase móvil, con un flujo isocrático de 4.0 mL/min. Los cromatogramas se registraron usando un detector UV (λ : 330 nm) y un detector gamma en serie. La fracción correspondiente a 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol ([¹⁸F]**14**, que eluyó entre 8 y 10 minutos) se recogió y diluyó en 50 mL de agua para invección en el Vial SPE 2 (Balón colector). La solución diluida se pasó a través de un cartucho Sep-Pak C18 plus *light*-SPE (preactivado con 5 mL de etanol absoluto, seguido de 10 mL de agua para inyección). El cartucho se lavó con 10 mL de agua para inyección (desde el vial C3). Seguidamente el producto retenido en el cartucho se eluyó con 1 mL de etanol absoluto (desde el vial C2) y se recogió en el vial de dos bocas que contenía 5 mL de solución de NaCl al 0,9 %. Finalmente, se completó la formulación pasando 5 mL de solución de NaCl al 0,9% a través del cartucho Sep-Pak (desde el vial C1) y se recolectó en el vial de dos bocas. Luego, la formulación final pasa del vial de dos bocas a través de un filtro esterilizante de 0,22 µm a un vial estéril. El volumen total de la solución de radiotrazador fue de 11 mL.

Métodos de control de calidad

Al no contar el radiotrazador 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol con una monografía en la farmacopea, se tuvieron en cuenta las especificaciones determinadas para los radiofármacos de flúor-18 producidos en CUDIM. Las impurezas químicas y radioquímicas se determinaron mediante radio-HPLC utilizando una columna EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel), flujo en 1 mL/min, FM:

NaH₂PO₄ 25 mM : MeCN; Gradiente: 0 a 6 min 30% MeCN, de 6 a 8 min 80 % MeCN, y de 8 a 15 min 80 % MeCN. El análisis de HPLC completo fue de 15 minutos. El tiempo de retención del precursor (**13**) y del producto ([¹⁸F]**14**) fueron 6.5 y 10.1 minutos respectivamente. La identidad química de [¹⁸F]**14** fue determinada por comparación del tiempo de retención del estándar de referencia **14** sin marcar. Los cromatogramas se registraron con un detector de arreglo de diodos (λ : 330 nm) y gama en serie. Además, se realiza una prueba límite de Kryptofix 222 mediante TLC en cámara con vapores de I₂, el mismo debe ser < 50 µg/mL.

3.2.2.2 Resultados y discusión

Síntesis orgánica de estándares y precursores de 2-[18F]fluoroetil-harmol

La primera etapa del trabajo de tesis, consistió en obtener los radiotrazadores: [¹¹C]harmina, [¹¹C]clorgilina y [¹¹C]azul de metileno. Para ello se obtuvieron inicialmente los precursores orgánicos adecuados para ser marcados con carbono-11. En este apartado, se describe la síntesis orgánica para la obtención de un precursor de marcación y un estándar de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol (esquema 18).



Esquema 18. Rutas de síntesis del precursor de marcación y estándar de 2-[¹⁸F]fluoroetilharmol . Reactivos y condiciones: (a) HBr, AcOH, reflujo, 24 h, 90%; (b) Cs₂CO₃, DMF, **15**, T amb, 26 h, 46%; (c) **16**, EtOH seco, reflujo, 6 h, 89%; (d) *p*-TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, T amb, 7 d, 70%; (e) KF, K2.2.2, MeCN, reflujo, 4 h, 16%.

Como se describió anteriormente, el precursor de marcación de [¹¹C]harmina (harmol 7), se obtuvo a partir de la desmetilación de harmina comercial en reflujo de ácido acético y ácido bromhídrico concentrado (Esquema 18). El harmol obtenido fue además utilizado tanto en la obtención de un estándar analítico de 2-fluoroetilharmol (derivado 14) como para el precursor tosilado 13, necesario para la radiosíntesis de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol. En este contexto, inicialmente a partir de etilenglicol comercial como material de partida se obtuvo tosilato de 2-fluoroetilo 16, un reactivo clave para la obtención del estándar de 2-[¹⁸F]fluoroetilharmol. Para ello, primero se llevó a cabo una activación del etilenglicol con cloruro de ptoluensulfonilo, mediante una adaptación de técnicas previamente descritas para obtener el derivado ditosilado 15.125,177 Seguidamente se obtuvo el derivado fluorado 16, mediante una reacción del tipo SN₂ con fluoruro de potasio activado con Kryptofix 222 sobre el ditosilado 15 en acetonitrilo a reflujo. Seguidamente, el estándar 14 se obtuvo vía O-alquilación de harmol con tosilato de 2-fluoroetilo, siguiendo el protocolo de Blom y col. con pequeñas modificaciones.¹⁷⁴ Por otro lado, mediante una reacción controlada de monosustitución de harmol 7 sobre ditosilato de etilenglicol 15, se obtuvo el precursor de marcación 13 necesario para la radiosíntesis de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol. Por último, cabe destacar que al igual que todos los productos de síntesis orgánica descriptos en los apartados correspondientes de los radiotrazadores marcados con carbono-11, los compuestos mencionados en el presente apartado fueron caracterizados por experimentos de RMN (¹H, COSY, HSQC, HMBC y ¹³C), coincidiendo sus respectivas señales con las descriptas en la literatura para los mismos compuestos. A modo de ejemplo en la Figura 28, se muestra el espectro de ¹H-RMN de **14** con la asignación de señales correspondientes.



Figura 28. Espectro ampliado de ¹H-RMN de **14** en DMSO_{d6} con la asignación de las señales correspondiente.

Radiosíntesis de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol

La siguiente etapa del trabajo, consistió en establecer un protocolo de producción y de control de calidad para obtener 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol (Esquema 19). La producción se llevó a cabo en la plataforma semi-automatizada Synthra RN Plus Research (Figura 29). Las condiciones de radiomarcado fueron adaptadas de Cumming y colaboradores.¹⁷⁸







Figura 29. Plataforma de radiosíntesis Synthra RN Plus Research, utilizada para las marcaciones con flúor-18.

En este contexto, debido a que las condiciones de purificación por HPLC semipreparativo descriptas en la técnica mencionada no se pudieron reproducir en nuestra plataforma, se pusieron a punto las condiciones de purificación mediante una adaptación de las condiciones del HPLC analítico. En la Figura 30 se muestra un cromatograma gama de HPLC semipreparativo, en el cual se pueden observar 3 picos mayoritarios correspondientes a: fluoruro-18 sin reaccionar (A); el producto de interés (2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol, B); un producto secundario (C).



Figura 30. Cromatograma gamma de HPLC semipreparativo. Fase Móvil: NaH₂PO₄ 25 mM: acetonitrilo 70:30 (v/v), flujo: 4 mL/min, C18 (250,10mm). A: fluoruro-18 libre ([K/K2.2.2]⁺[¹⁸F]F⁻); B: 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol; C: posible *p*-Toluensulfonato de 2-[¹⁸F]fluoroetilo.

Por último, el sistema de purificación mediante cartucho SEP-PAK y formulación final, se llevó a cabo en las mismas condiciones que para [¹¹C]harmina. De esta manera, se obtuvo 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol con un rendimiento radioquímico de 19.5 ± 4 % (al final de la síntesis, corregido por decaimiento, a partir de [¹⁸F]fluoruro), en un tiempo de síntesis de 60 ± 2 minutos, con actividades molares de 900 ± 300 GBq/µmol y una pureza radioquímica superior al 99.6 ± 0.1 %.

Control de calidad de 2-[18F]fluoroetil-harmol

De la misma manera que los radiotrazadores marcados con carbono-11 mencionados anteriormente, 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol tampoco cuenta con una monografía en farmacopea, por lo que el control de calidad se llevó a cabo teniendo en cuenta las especificaciones utilizadas en Cudim para los radiofármacos de flúor-18 (ver Tabla 6). En este contexto, a diferencia de los radiofármacos de carbono-11, se agrega una prueba para determinar el límite de Kryptofix 222, el cual debe

ser menor a 50 µg/mL. Esta prueba se lleva a cabo sembrando 0.3 mL de la muestra en una placa de TLC, que luego se lleva a una cámara saturada con vapores de iodo (l₂), la misma no debe resultar coloreada para cumplir con dicho parámetro. Por otra parte, el método analítico de HPLC, se estableció utilizando los estándares obtenidos en la etapa de trabajo anterior. En la Figura 31 se muestra el cromatograma obtenido para una mezcla compuesta por 2-fluoroetil-harmol y el precursor tosilado **13** en igual concentración. En dicho cromatograma se puede observar la óptima resolución del estándar del producto de interés respecto de su precursor (ver Figura 28).



Figura 31. Se muestra un cromatograma a 330 nm correspondiente a la resolución de una mezcla compuesta por 2-fluoroetil-harmol (tr = 6.5 min) y el precursor tosilado **13** (tr = 10.1 min). Fase móvil: NaH₂PO₄ 25 mM : MeCN, Gradiente: 0 a 6 min 30% MeCN, de 6 a 8 min 80 % MeCN, y de 8 a 15 min 80 % MeCN. Flujo 1.0 mL/min.

Además, en la Figura 32 se puede observar un cromatograma gamma obtenido del control de calidad del producto final purificado y formulado de uno de los lotes piloto. La pureza radioquímica en ese caso fue de 99.6%.



Figura 32. Cromatograma obtenido por HPLC analítico con detector gamma del producto final purificado y formulado.

En este contexto, se realizaron todos los ensayos de control de calidad pertinentes para los tres lotes piloto de validación. El control de calidad involucró la determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, que cumplieron con las especificaciones prestablecidas tanto en los lotes piloto de validación, como en la mayoría de los lotes realizados. En la Tabla 6, se muestra un ejemplo de las especificaciones a determinar y los resultados obtenidos, contenidos en un certificado de análisis de control de calidad para un lote de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol. Como puede observarse, el lote de este ejemplo cumplió con todos los parámetros establecidos previamente.

Tabla 6. Especificaciones fisicoquímicas y endotoxinas. Resultados contenidos en un certificado de análisis de un lote de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol. **C**: cumple con los parámetros especificados. *: no hay especificación establecida. ND: no detectado.

Técnica análisis	Análisis	Especificación	Resultado	Observación
Visual	Apariencia	Solución levemente amarilla, transparente libre de partículas visibles	Cumple	С
pH-metro	pН	4,5 - 8,5	5,3	С
TLC	Límite de Kryptofix	< 50 µg/mL	Cumple	С
HPLC	Pureza radioquímica	> 90 %	99.6	С
HPLC	Identificación radioquímica	tr muestra = tr del estándar (min)	6.9	С
HPLC	Pureza Química	Fluoroetilharmol (FHAR) < 100 μg/ <i>V</i>	1,67	
		7-(2-Tosiloxietoxi)-1-metil-9H- pirido[3,4-b]indol (Precursor)	ND	
		Otras impurezas individuales < 100 μg/ <i>V</i>	ND	
		Total de impurezas < 500 μg/V	ND	
GC	Determinación de solventes residuales	Acetona < 0.5 %	0.001	С
		Acetonitrilo < 0.05 %	0,03	С
		DMSO < 0.5 %	0.01	С
		Etanol < 10 %	8.3	С
Centelleo sólido	Pureza radionucleídica (espectro)	> 99,5 % de emisión gamma a 511 KeV y/o 1022 KeV	Cumple	С
T _{1/2}	ldentidad radionucleídica (T _{1/2})	105 – 115 min.	110	С
HPLC	Actividad molar	GBq/µmol (EOS) >30	1115	С
Endosafe®	Pirógenos	< 175 EU/Vol. Iny.	<10	С
-	Volumen máximo a inyectar	Pirógenos (mL)	>11	

3.2.2.3 Conclusiones

En primer lugar, se logró obtener el precursor **13** adecuadamente sustituido para la radiosíntesis de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol. Una vez obtenido el mismo, se establecieron las condiciones de radiomarcado con flúor-18 *vía* fluoración nucleofílica, mediante el seguimiento de una técnica descripta en la literatura. A continuación, se pusieron a punto las condiciones de formulación final, y seguidamente se estableció un protocolo de producción y otro de control de calidad para obtener de manera eficiente el radiotrazador 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol. El mismo se obtuvo con un rendimiento radioquímico de 19.5 ± 4% (al fin de la síntesis, corregido por decaimiento), en un tiempo de síntesis de 60 ± 2 minutos, con actividades molares de 900 ± 300 GBq/µmol y una pureza radioquímica superior al 99.6 ± 0.1% (incluida la purificación por HPLC). La mayoría de los lotes producidos cumplieron todas las especificaciones prestablecidas para el control de calidad, lo que habilita el uso del radiotrazador para la realización de estudios *in vivo*.

4. Evaluación biológica

4.1 Introducción

El desarrollo de un nuevo radiofármaco es un proceso multidisciplinario que involucra la contribución de diferentes campos de investigación incluyendo la radioquímica, síntesis química, bioquímica y farmacología entre otras. En términos generales el desarrollo de radiofármacos involucra las siguientes fases: i) identificación y validación de un blanco molecular con relevancia para el diagnóstico y/o terapia; *ii*) identificación de una molécula con características adecuadas tales como afinidad, selectividad, lipofilicidad, etc. para el desarrollo del radiofármaco (identificación de candidato); iii) optimización de la estructura química con respecto a propiedades tales como la afinidad de unión, metabolismo y capacidad para ser marcada con un radionucleido que tenga un período de semidesintegración acorde a la vida media biológica del radiotrazador (optimización del candidato); iv) desarrollo y optimización del radiomarcado de manera de obtener adecuado rendimiento radioquímico, pureza radioquímica y actividad molar; v) escalado y producción de acuerdo con las buenas prácticas de manufactura; vi) evaluación preclínica; y por último vii) la traslación a estudios de fase clínica donde se valida su aplicación para la que fue diseñado.¹⁷⁹ De esta manera, en las secciones anteriores del presente trabajo de tesis de doctorado, se discutió acerca de los puntos i a v. En la siguiente sección se hará especial hincapié en el punto vi. En este aspecto, el desarrollo de un nuevo radiofármaco es un proceso complejo que consiste en investigaciones y ensayos que requieren de infraestructura especializada (como se vio anteriormente en la introducción general), expertía individual y trabajo coordinado en equipo. En este contexto, la selección del blanco molecular es uno de los pasos más críticos. Además de la relevancia del blanco molecular para determinada patología, el mismo debería permitir una diferenciación clara entre órganos/tejidos afectados y sanos, ya sea como marcador único o en grado de expresión. Para ello, los estudios preliminares *in vitro* son determinantes al momento de seleccionar nuevos radiotrazadores a ser utilizados en posteriores estudios in vivo. Muchas propiedades farmacocinéticas, como las relaciones de captación blanco/no blanco, o la retención en el blanco molecular, sólo pueden ser evaluadas *in vivo*. Estas propiedades son esenciales para estimar si el radiotrazador cumple con los requisitos para una posterior traslación a la clínica.^{179,159} En este sentido, primeramente, debe ser demostrado que el radiotrazador se acumula en la región donde se expresa el blanco molecular de interés y que los niveles de actividad en la región blanco reflejan la expresión o la actividad del blanco molecular. Esto se puede demostrar mediante diferentes ensayos tales como: i) bloqueo del blanco molecular con la molécula de interés "fría" (sin marcar); ii) uso de modelos animales transgénicos, incluyendo modelos que por modificación genética presenten ausencia del blanco molecular (*"knockouts"*); iii) correlacionando la señal a la expresión o actividad del blanco molecular mediante métodos *in vitro* o *ex vivo*.¹⁸⁰ En este aspecto, los estudios de biodistribución son de gran relevancia para calcular la distribución del radiofármaco en cuestión a cada órgano, incluyendo tumores inducidos con líneas celulares, y también llevar a cabo estudios dosimétricos. Estos estudios pueden ser llevados a cabo tanto *in vivo* por imagenología, como por experimentos *ex vivo* (Figura 33). ¹⁸¹



Figura 33. Estudio imagenológico o de biodistribución de un radiofármaco. La distribución de un determinado radiofármaco a los diferentes órganos se puede llevar a cabo *in vivo* inyectando el mismo y adquiriendo imágenes (izquierda). O se puede llevar a cabo una biodistribución *ex vivo* sacrificando al animal luego de un tiempo preestablecido y midiendo la actividad en cada órgano o tejido extraídos, incluyendo (en algunos casos) un tumor inducido (T) con líneas celulares (derecha). A la izquierda se observa una cámara TRIUMPH PET-SPECT/CT para pequeños animales, que se utiliza para estudios de biodistribución *in vivo*. A la derecha se muestra un equipo detector de centelleo sólido (ORTEC) conectado a una computadora, utilizado para medir la actividad en los tejidos extraídos de un animal en una biodistribución *ex vivo*.

En este contexto, el uso de modelos animales en investigación básica y preclínica es fundamental para la realización de los ensayos previos a la traslación de un nuevo radiotrazador a la clínica. Tanto para la realización de estudios de toxicidad y dosimétricos, como para la evaluación del potencial radiofármaco en un modelo patológico, para llevar a cabo una prueba de concepto de su potencial uso clínico. A su vez, en las últimas décadas las versiones miniaturizadas de los equipamientos para imagenología tales como PET, SPECT, CT y RMI, han ganado una gran relevancia y se han optimizado sus diseños comerciales, para su uso extensivo en pequeños animales tales como ratas y ratones.^{182,183} En este sentido, el uso de líneas celulares humanas y la generación de tumores xenográficos en modelos animales inmunocomprometidos, juegan un rol fundamental en la investigación y desarrollo, como de concepto de uso de nuevos radiofármacos.^{184,185}

En contexto con lo anteriormente mencionado, en las próximas secciones se describirá la evaluación biológica de [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]harmina y 2-[¹⁸F]fluoroetilharmol, principalmente mediante estudios imagenológicos *in vivo* o de biodistribución *ex vivo*. Para ello se utilizará un modelo tumoral xenográfico inducido con líneas celulares humanas de cáncer de próstata en ratones *nude* (inmunocomprometidos). En este aspecto, cabe destacar que los radiotrazadores seleccionados (como de describió en el capítulo 1), ya han sido utilizados tanto en modelos animales como en humanos. Los mismos han sido utilizados para la evaluación de la expresión de la MAO-A en el sistema nervioso central en diferentes contextos, por lo que no es necesario establecer estudios de seguridad o toxicidad.^{126,159,186} Lo que se pretende en el presente trabajo de tesis de doctorado en química, es llevar a cabo una prueba de concepto de su potencial uso en imagenología PET en el diagnóstico de cáncer de próstata de alta agresividad.

4.2 Parte experimental

4.2.1 Materiales y equipos utilizados

Los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica (ABX, Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Dorwil, Capricorn Scientific, Gibco) y se usaron sin purificación adicional. Para las determinaciones de actividad se emplearon una cámara de ionización (Capintec® CRC 25R, CRC 25 PET) y un espectrómetro de centelleo sólido con cristal de Na(TI)I de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a un sistema analizador multicanal ORTEC[®]. Para la determinación de número de células por pozo se utilizó un lector de placas accuSkan FC (Fisher Scientific).

4.2.2 Cultivos celulares

Las líneas celulares LNCaP (ATCC® CRL-1740[™]) y PC3 (ATCC® CRL-1435[™]) fueron descongeladas del banco de células de Cudim. Las células LNCaP se cultivaron y mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 con glutamina estable (Capricorn Scientific), suplementado con 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/I de penicilina G (Sigma, St Louis, MO) y suero fetal bovino al 10 % (SFB, Gibco), en frascos de cultivo T25cc (Greiner). Los cultivos se alimentaron dos veces por semana con 90 % de medio de cultivo completo (con 10% SFB) y 10 % de su propio medio condicionado (del pasaje anterior). Las células PC3 fueron cultivadas en medio de cultivo T75cc (Greiner). Cuando alcanzaron un estado casi confluente 1 semana más tarde, se llevó a cabo el subcultivo usando tripsina al 0.05 %, EDTA al 0.02 % (Gibco) en PBS estéril. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C que contenía una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂.

4.2.3 Protocolos experimentación animal

Todos los estudios fueron realizados con el seguimiento de guías nacionales e internacionales para el uso y manejo de animales de experimentación, bajo protocolos de ética aprobados por el comité de ética de experimentación animal (CEUA) de Cudim (Protocolos: 16091901 y 19012401), en el marco de la actual ley nacional de experimentación animal No. 18.611 (CNEA). En este contexto, antes del comienzo del trabajo con animales de experimentación, se obtuvo la acreditación de la CNEA en las categorías A (cuidador) y B (técnico experimentador).

4.2.4 Generación de los modelos tumorales

Ratones nude (J:Nu-Foxn1^{nu}Heterocigota) de entre 7 y 11 semanas fueron inoculados por vía subcutánea sobre el deltoides izquierdo con la línea celular correspondiente (LNCaP o PC3). El procedimiento se realizó luego de inducir el plano anestésico con isofluorano 4%. Un grupo de animales fue inoculado con 5 x 10⁶ células LNCaP (1:1, v:v GELTREX : RPMI 1640, volumen total inyectado = 150 µL) y se les aplicó diariamente sobre la piel una pequeña porción de testosterona en gel (Androgel 50mg/5g) hasta la aparición de los tumores (entre 3-8 semanas post inoculación). Otro grupo fue inoculado con 3 x 10⁶ células PC3 (1:1, v:v GELTREX : DMEM, volumen total invectado = 150 μ L), donde los tumores comenzaron a crecer entre las 2 y 4 semanas post inoculación. Los tumores fueron medidos semanalmente con un microcalibre en dos dimensiones, y los volúmenes fueron calculados como [(diámetro menor)² x (diámetro mayor) x π]/6. Los animales se mantuvieron en los laboratorios de experimentación animal de Cudim en racks con aire filtrado bajo condiciones de temperatura (22 ± 1)°C y humedad relativa (40-60%) controlada, en ciclos de 14/10 horas de luz/oscuridad, con comida y agua ad libitum.

4.2.5 Estudios imagenológicos iniciales

Las imágenes PET-CT fueron llevadas a cabo utilizando un equipo trimodal PET-SPECT-CT para pequeños animales (Triumph[™], TriFoil, Inc., US) con módulos detectores Quad-APD acoplados con centelleadores LUSO/LGSO (resolución espacial: 1.0 mm; campo de visión axial FOV: 3.75 cm (FOV, por sus siglas en inglés: file of view). Los datos fueron adquiridos en modo lista en una matriz de 184 x 184 x 31 pixeles de 0.25 x 0.25 x 1.175 mm y una ventana de coincidencia de 22.22 nseg de ancho. Se utilizó el radiotrazador [¹¹C]clorgilina desarrollado en el marco del presente trabajo de tesis y los radiofármacos de uso clínico en cáncer de próstata [¹¹C]colina y [⁶⁸Ga]PSMA-11. Los últimos se obtuvieron siguiendo procedimientos operativos internos, según GMP, en el marco del sistema de aseguramiento de calidad de Cudim. Los animales se mantuvieron bajo anestesia con isofluorano al 2% en flujo de oxígeno (2 L/min) durante todo el estudio, dispuestos en posición prono sobre la camilla del escáner. Se inyectaron los animales con los diferentes radiotrazadores bajo cámara vía intravenosa, en la vena dorsal de la cola. Se invectaron actividades de 7-21 MBq de [11C]clorgilina y [¹¹C]colina, mientras que la actividad invectada de [⁶⁸Ga]PSMA-11 fue de 15-40 MBq, en un volumen de 100-250 µL. Las imágenes del modelo xenofráfico fueron adquiridas cuando el tumor alcanzó un tamaño óptimo (100-350 mm³). Se adquirieron las imágenes de manera dinámica, invectando al animal bajo cámara (t=0 post-administración del radiotrazador). El análisis por CT se realizó durante 1.98 minutos (FOV = 4.75 cm). Para los radiofármacos de carbono se reconstruyeron 3 frames de 0-5 minutos, 5-20 minutos y 20-40 minutos post inyección de la actividad. Para el [68Ga]PSMA se reconstruyeron 4 frames, adicionándose a los anteriormente mencionados, un frame de 20-40 minutos post invección de la actividad. Los sinogramas fueron reconstruidos utilizando el algoritmo Maximum Likelihood-Expectation Maximization 3D (3D-MLEM) con 30 iteraciones. El procesamiento y análisis semi-cuantitativo de las imágenes se llevó a cabo con el software PMOD, v.3.4 (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Switzerland). Los estudios PET fueron co-registrados con el correspondiente CT

125

para asegurar la localización anatómica. Las imágenes se muestran como cortes coronales, sagitales y axiales. Se construyeron Volúmenes de Interés (VOIs, por sus siglas en inglés: *volume of interest*) de forma manual sobre el tumor y el músculo contralateral, a con el fin de calcular la relación tumor/músculo (T/M). La concentración de actividad dentro de cada VOI fue expresada como *Hot Average* (promedio de los puntos más calientes en kBq/cc). Se realizaron estudios *ex vivo* de biodistribución a 20 y 60 minutos, inyectando una actividad de 10-34 MBq (V:100-200 μ L) de manera intravenosa por la vena dorsal de la cola. Los grupos de animales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia por isofluorano. Los órganos fueron rápidamente extraídos, pesados y su actividad fue medida en un contador gamma (un detector de centelleo sólido Nal [TI] tipo pozo de 3" × 3" acoplado a un analizador multicanal, ORTEC). Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% Al/g). Además, se calculó la relación de captación entre tumor y músculo (relación T/M).

4.2.6 Evaluación in vivo mediante imagenología PET-CT

Adquisición de imágenes

Las imágenes PET-CT de pequeños animales se realizaron en un nanoScan® PET-CT Mediso Preclinical Imaging, basado en centelleadores LYSO. La resolución espacial del escáner es de 0,9 mm y el campo de visión transaxial (FOV, por sus siglas en inglés *file of view*) es de 8,0 cm. Los datos se adquirieron en modo lista en una matriz de 212 × 212 × 235 con un tamaño de píxel de 0,4 × 0,4 × 0,4 mm y un ancho de ventana de coincidencia de 1,0 ns. Los animales fueron anestesiados con isofluorano al 2% en un flujo de oxígeno de 2 L/min, colocados en posición prona sobre la cama del escáner e inyectados i.v. a través de la vena dorsal de la cola con 100-200 µL de [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]harmina o 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol (18-29 MBq para todos los trazadores). La masa "fría" de los radioligandos administrados fue 19,7 nmol (clorgilina), 17,5 nmol (harmina) y 11,9 nmol (2-fluoroetil-harmol). Para las imágenes PET con [¹¹C]clorgilina (estudios estáticos), la adquisición comenzó 5 minutos después de la administración del radiotrazador y se realizó hasta los 40 minutos post-inyección (PI). Para las imágenes PET con [¹¹C]harmina (estudios estáticos), la adquisición comenzó 15 minutos después de la administración del radiotrazador y se realizó hasta los 45 minutos PI, en un primer grupo de animales. Luego, en un segundo grupo de animales, se llevaron a cabo las adquisiciones desde los 45 min PI hasta los 90 minutos PI. Para 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol, se realizaron imágenes PET (estudios estáticos) en cuatro grupos de animales, en el primer grupo la adquisición comenzó desde los 15 minutos PI hasta 60 minutos PI, 60-90 minutos en el segundo grupo, 120-165 minutos en el tercer grupo y 180-225 minutos en el último grupo. Los sinogramas se reconstruyeron utilizando la maximización de expectativas de máxima verosimilitud 3D (3D-MLEM) con 4 iteraciones y 6 subconjuntos.

Análisis de imágenes

Se realizó un análisis semicuantitativo utilizando el software PMOD, v. 3.8 (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Suiza). Los estudios PET se registraron conjuntamente con los correspondientes estudios de CT para localización anatómica. Las imágenes se mostraron como cortes coronal, sagital y axial. Los volúmenes de interés (VOIs, por sus siglas en inglés: *volume of interest*) se trazaron manualmente sobre el tumor y el músculo contralateral para generar curvas de tiempo-actividad y calcular las relaciones de captación tumor/músculo. La concentración de actividad dentro de cada VOI se expresó como el promedio del punto caliente sobre todo el VOI expresado en kBq/cc (*hot average*).

4.2.7 Ensayos de biodistribución ex vivo

Ratones portadores de tumores xenográficos de 24-28 g fueron inyectados *vía* i.v. a través de la vena dorsal de la cola con: [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]harmina o 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol (13-18 MBq, V: 100-200 µL). En el intervalo de tiempo deseado después de la administración de la actividad, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se extirparon y pesaron los órganos, tejidos y muestras de interés (sangre, hígado, corazón, pulmones, bazo, riñones, músculo, hueso, estómago, tracto gastrointestinal, vejiga y orina, cerebro y tumor). La cantidad de radiactividad en cada órgano se determinó en un contador gamma (un detector de centelleo sólido Na[TI]I tipo pozo de 3" × 3" acoplado a un analizador multicanal, ORTEC). Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% Al/g). Además, se calculó la relación de captación entre tumor y músculo (relación T/M). Para los estudios de bloqueo, se disolvió harmina (2 mg) en una solución de NaCl al 0,9 % (0,940 mL), HCl 1 M (0,01 mL) y DMSO (0,05 mL). Se inyectó de manera intraperitoneal una dosis de 10 mg/kg de harmina, 90 minutos antes de la administración de [¹¹C]harmina. La biodistribución se realizó como se describió anteriormente, 60 minutos después de la administración intravenosa de 15 \pm 3 MBq de [¹¹C]harmina.

4.2.8 Ensayos in vitro en líneas celulares de cáncer de prostata

Cuantificación de MAO-A en líneas celulares mediante Western-Blotting

Monocapas confluentes de LNCaP o PC3 se lavaron con PBS y luego se prepararon lisados celulares en tampón de lisis (Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, Triton X-100 al 1 % con una mezcla completa de inhibidor de proteasa de Roche cOmplete™). La cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando un kit de ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés: *bicinchoninic acid*), las muestras se diluyeron en tampón de muestra Laemmli 5x, se resolvieron en geles SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a membranas PDVF (BioRad), usando un sistema de transferencia húmeda. Las membranas se bloquearon con leche en polvo al 5 % en TBS-T (Tris base 0,5 mM, pH 8, NaCl 75 mM y Tween-20 al 0,2 % (vol/vol)) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente y luego se incubaron con anticuerpo anti-MAO-A (1/500, sc-271123 Santa Cruz) o control de carga (1/6000, anti-β-Actina A5441 Sigma) ambos diluidos en BSA al 2 % en TBS-T. Luego se usó el conjugado apropiado de peroxidasa de rábano picante (HRP) como anticuerpo secundario
diluido en BSA al 2 % en TBS-T durante 2 horas. Las membranas se revelaron utilizando sustratos quimioluminiscentes (Thermo). Las inmunotransferencias se analizaron posteriormente mediante el *software* ImageJ.

Evaluación de la internalización de [11C]harmina in vitro

Inicialmente se preparó una dilución de [¹¹C]harmina en PBS de manera de obtener 100 µL (60 µCi) /pozo para una placa de 24 pozos. Se cambió el medio de las células por DMEM(PC3) / RPMI(LNCaP) sin SFB (1 mL/pozo). Luego se agregó el radiomarcado en los pozos correspondientes a cada tiempo y se incubó en la estufa de cultivo (comenzando por el tiempo más largo, 40 minutos). Se registró la hora de agregado de todos los tiempos. Se reservaron pozos para luego cuantificar el número de células (mínimo n=3). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cada pozo y se agregó en un tubo tipo falcon correspondiente de 15 mL y se lo rotuló como "tubo 1" (reservando el *tip* de micropipeta). Seguidamente se realizó un lavado con 500 µL/pozo de PBS y se colocó en "tubo 1" utilizando el mismo *tip* reservado. Se agregaron 500 µL/pozo de tripsina y se incubó 5-10 minutos en estufa. Se decolaron las células y se colocaron en un tubo tipo falcon correspondiente de 15 mL y se lo rotuló como "tubo 2" (reservando el tip). Se realizó un lavado de cada pozo con 1 mL de PBS y se colocó en el "tubo 2" correspondiente, utilizando el mismo tip guardado. Se midieron las cuentas por minuto (cpm) en contador de centelleo sólido y se anotó la hora de medida de cada tubo. Se midió el background (radiación de fondo) antes de realizar las medidas y al finalizar las mismas.

Para la cuantificación del número de células por pozo: inicialmente se descartó el medio de cultivo contenido en los pozos y se agregaron 500 μ L/pozo de TCA 10% frío, se dejó a 4°C durante 2 horas, se descartó el TCA y se lavó dos veces con agua. Se dejó secar la placa durante toda la noche y una vez transcurrido este tiempo se agregaron 500 μ L/pozo de sulforodamina B (SRB 3% en solución con ácido acético al 1%). Se dejó media protegido de la luz, se lavó tres veces con ácido acético al 1% (500 μ L/pozo) y se dejó secando toda la noche. Una vez transcurrido

este tiempo, se disolvió con Tris base 1 mM y se traspasaron 100 µL a una placa de 96 pozos para medir en el lector de placas a 595 nm. Se utilizó el valor de absorbancia como "número de células" para normalizar los valores de % de captación de las diferentes líneas.

4.2.9 Anatomía patológica

Los tejidos de xenoinjertos de LNCaP obtenidos de los animales inoculados se fijaron durante 24 horas en formaldehído al 10%, se transfirieron a 2-propanol, cloroformo y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones (5 mm) y se montaron en portaobjetos Micro-Probe (Fisher). Los tejidos tumorales del xenoinjerto se tiñeron con hematoxilina-eosina. En colaboración con el patólogo Dardo Centurión (Gr.5, Facultad de Medicina, UdelaR), se clasificaron las muestras como cáncer de próstata de la siguiente manera: puntuación de Gleason 5, carcinoma poco diferenciado, grado histológico alto.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Evaluación biológica inicial de [¹¹C]clorgilina

Con el fin de realizar una evaluación biológica inicial de [¹¹C]clorgilina, se generó un modelo tumoral xenográfico de cáncer de próstata en ratones. Para ello, se utilizó la línea celular humana de cáncer de próstata LNCaP, ya que presenta sobreexpresión del blanco molecular (MAO-A). En este contexto, si bien está reportado que la línea celular LNCaP posee baja capacidad para generar tumores en ratones respecto a la línea PC3 (también a disposición en Cudim), esta última no sobreexpresa MAO-A.^{103,106} Por tanto, la sobreexpresión del blanco molecular en la línea celular fue fundamental para la elección de la misma. De este modo, para generar los tumores xenográficos, las células fueron mantenidas en cultivo e inoculadas entre las semanas 7 y 9 de vida de los ratones (Figura 34).



Figura 34. Generación de tumores xenográficos en ratones *nude*. Las células de la línea LNCaP se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar una confluencia adecuada (85-95%), luego se preparó una mezcla 1:1 con las mismas y Geltrex[®], y se inoculó en el animal por *vía* subcutánea sobre el deltoides izquierdo. Los tumores comenzaron a desarrollarse entre la semana 3 y 8 post inoculación.

En el primer grupo de 6 ratones se generaron 4 portadores de tumor, evidenciándose su aparación entre la tercera y cuarta semana post-inoculación como una pequeña mancha azulada en el sitio de inoculación. Se utilizó el gupo exclusivamente para estudios imagenológicos PET-CT. Por otra parte, un segundo grupo de 7 ratones fue inoculado para estudios de imágenes y de biodistribución, de los cuales todos generaron tumores entre las semanas 3 y 8 post-inoculación. En la etapa inicial del proyecto de tesis, los estudios imagenológicos se realizaron con [¹¹C]clorgilina (inhibidor de MAO-A) y dos radiofármacos de uso clínico en cáncer de próstata [¹¹C]colina y [⁶⁸Ga]PSMA-11. Lamentablemente, debido a un desperfecto técnico de la cámara TRIUMPH, todas las imágenes adquiridas del último grupo de 7 animales se perdieron. Este grupo permitió solamente obtener datos de biodistribución. En este contexto, los estudios de imagenología PET con [¹¹C]colina fueron llevados a cabo solo con el grupo mencionado, por lo que no se dispone de datos experimentales con dicho radiofármaco.

Se monitoreó el crecimiento de los tumores durante 3 semanas al primer grupo de animales, obteniéndose imágenes con [¹¹C]clorgilina y [⁶⁸Ga]PSMA-11. Éste último, si bien se trata de un radiofármaco de estructura química (péptido marcado con un radiometal) y blanco molecular diferentes (receptor de membrana extracelular), se utilizó como control para validar el modelo xenográfico tumoral de cáncer de

131

próstata establecido. En este sentido, al momento de realizar los experimentos mencionados, [68Ga]PSMA-11 era el radiofármaco de uso estándar para estudios de diagnóstico de cáncer de próstata de uso clínico en Cudim. Así, mediante la adquisición de imágenes PET-CT con la cámara TRIUMPH (Figura 35), se pudo determinar inicialmente la captación del radiotrazador [¹¹C]clorgilina en el modelo tumoral xenográfico inducido con la línea celular LNCaP. En la figura 35 (centro) la imagen PET muestra una captación apreciablemente mayor a nivel tumoral en comparación con el músculo contralateral. Los resultados de captación tumor/músculo (T/M) se resumen en la Tabla 7, dónde se observa inicialmente una relación de 2.2 ± 0.6 en el frame (paquetes de imágenes adquiridas en un intervalo dado de tiempo) de 0-5 minutos que decrece en el tiempo (en los siguientes frames). En este aspecto, al tratarse de un estudio dinámico con inyección bajo cámara, el frame inicial (0-5 minutos) muestra una idea del ingreso y rápida distribución del radiotrazador al organismo ("bolo"), y en consecuencia presenta una gran variabilidad. Por tanto, se puede afirmar que la mejor relación T/M y con menor variabilidad fue de 2.0 ± 0.1 (en el frame 2, 5-20 minutos post-inyección, Tabla 7).

Tabla 7. Relación de captación tumor/músculo de [¹¹C]clorgilina en modelo LNCaP. *Hot Av*: es el promedio de los puntos con mayor actividad delimitados dentro del volumen de interés (VOI). Frames, F1: Tiempo comprendido entre 0-5 minutos post inyección; F2: 5-20 minutos post inyección; F3: 20-40 minutos post inyección. Volumen de tumores: 557 ± 198 mm³.

Ratón	T/NT Hot Av					
	F1	F2	F3			
R1	2.9	2.1	2.0			
R2	1.9	1.9	1.2			
R3	1.7	2.0	1.4			
Prom ± Desvest	2.2 ± 0.6	2.0 ± 0.1	1.5 ± 0.4			

Estos resultados nos alentaron a continuar con el estudio de [¹¹C]clorgilina como potencial radiofármaco de diagnóstico en cáncer de próstata de alta agresividad. Esto se basó en que la relación T/M obtenida fue superior a la reportada en el mismo modelo tumoral (LNCaP) para el radiofármaco de carbono-11: [¹¹C]colina (T/M: 1.2).¹⁸⁷ Este radiofármaco fue un estándar de uso clínico hasta la aparición del

[⁶⁸Ga]PSMA-11. Por otra parte, cabe destacar que el radiofármaco [⁶⁸Ga]PSMA-11 presentó una relación de captación T/M similar (2.2 ± 1.6, Tabla 8), aunque con una gran variabilidad para el mismo *frame* (5-20 minutos). Sin embargo, la relación T/M con [⁶⁸Ga]PSMA-11 aumenta en el tiempo alcanzando un valor máximo de 4.5 ± 3.9. Si bien este valor es similar o mayor que el obtenido para [¹¹C]Clorgilina en cualquiera de los *frames*, como se mencionó anteriormente, [⁶⁸Ga]PSMA no solo tiene propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes, sino que además su blanco molecular es diferente. En este sentido, el uso de inhibidores de MAO-A radiomarcados para su uso en imagenología PET no pretende sustituir a los radiofármacos ya utilizados en la clínica, sino complementar el diagnóstico. La finalidad es diferenciar los tumores que sean MAO-A positivos, lo que aportaría información de la agresividad de dichos tumores y con ello poder potencialmente orientar un tratamiento, lo cual requerirá futuras investigaciones.

Tabla 8. Relación de captación tumor/músculo de [⁶⁸Ga]PSMA en modelo LNCaP. *Hot Av*: es el promedio de los puntos con mayor actividad delimitados dentro del volumen de interés (VOI). Frames, F1: Tiempo comprendido entre 0-5 minutos post inyección; F2: 5-20 minutos post inyección; F3: 20-40 minutos post inyección; F4: 40-60 minutos post inyección. Volumen de tumores: $557 \pm 198 \text{ mm}^3$.

Ratón		T/NT Hot Av		
	F1	F2	F3	F4
R1	1.9	4.0	6.5	9.0
R2	1.4	1.3	2.0	2.3
R3	0.5	1.2	1.7	2.2
Prom ± Desvest	1.3 ± 0.7	2.2 ± 1.6	3.4 ± 2.7	4.5 ± 3.9



Figura 35. Izquierda: Ratón *nude* con tumor xenográfico inducido con células LNCaP. La flecha indica el tumor inoculado en el deltoides izquierdo con 3 semanas de crecimiento. Centro: Imagen PET representativa de los resultados obtenidos de la captación de [¹¹C]clorgilina en el *frame* 2 (5-20 min p.i.) en uno de los tumores inducidos (corte coronal). Dentro del círculo azul se observa un punto de alta captación del radiofármaco el cual se corresponde con el tumor. Dentro del círculo cian se encuentra delimitada una región del lado contralateral, que representa tejido muscular sano, dentro de la cual no se observa captación apreciable. Derecha: cámara TRIUMPH para pequeños animales en el área biomédica de Cudim.

Seguido a los estudios PET se realizaron ensayos *ex vivo* de biodistribución a 20 y 60 minutos post administración de [¹¹C]clorgilina. De este modo, se evidenció que a 60 minutos (n= 2), los tumores xenográficos presentaron una relación T/M de 1.3 (± 0.4), en tumores de un tamaño promedio de 753 (± 252) mm³. El tiempo de 60 minutos se determinó inicialmente a raíz de realizar la biodistribución el mismo día de adquisición de las imágenes. Posteriormente a dicho estudio, de manera de poder sacar más provecho del lote de producción y reducir el número de animales de experimentación utilizados. Además, la sensibilidad del equipo de centelleo sólido en el que se realizan las medidas de cada órgano, permite medir actividades más bajas que la cámara PET para pequeños animales, evaluando la relación T/M a tiempos mayores. A su vez, dada la mejor relación T/M obtenida en los estudios PET, se decidió realizar la biodistribución de los animales restantes (n= 4) a 20 minutos (Tabla 9). Para ello se utilizó un nuevo lote del radiotrazador, en un día posterior a la adquisición de imágenes con el fin de realizar una comparación. Así, se obtuvo una relación de captación tumor/músculo de 1.6 (± 0.2), en tumores de un tamaño promedio de 244 (± 60) mm³. Estos resultados de biodistribución, se

asemejan a los obtenidos inicialmente mediante adquisición de imágenes PET (T/M: 2.0 ± 0.1). Por otra parte, la relación T/M obtenida en las biodistribuciones a 60 minutos (1.3 ± 0.4), son menores que a 20 minutos, y a su vez menores que el valor T/M obtenido para el frame de 20-40 minutos (1.5 ± 0.4) en la adquisición de imágenes. La diferencia entre los valores de relación T/M obtenidos mediante biodistribución y los obtenidos mediante imágenes PET pueden diferir por diferentes factores: i) variación entre los tipos de detectores utilizados en los equipos; ii) fenómenos de apantallamiento de la radiación al utilizar cuerpo entero u órganos separados; iii) la variabilidad entre animales, lo que incluye variabilidad de la propia naturaleza y desarrollo de los tumores; iv) incertidumbre inherente a la propia herramienta como la estimación de la masa muscular de los animales en la biodistribución y la manera en la que se utiliza el software utilizado para el análisis de las imágenes adquiridas.

Tabla 9.	Biodistribución	de	[¹¹ C]clorgilina	en	ratones	nude	con	tumores	xenográficos
LNCaP.ª									

Tejido	%AI/g 20 minutos	%AI/g 60 minutos
	(n=4 LNCaP)	(n=2 LNCaP)
Sangre	1.8 ± 0.4	2.1 ± 0.3
Hígado	5.5 ± 0.6	6.2 ± 0.7
Corazón	2.2 ± 0.5	2.3 ± 0.1
Pulmón	8.2 ± 2.8	5.0 ± 0.6
Bazo	3.4 ± 0.4	1.9 ± 0.5
Riñón	7.2 ± 1.5	15.6 ± 0.8
Músculo	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.2
Hueso	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2
Tumor	2.7 ± 0.5	3.1 ± 0.7
Cerebro	3.4 ± 1.3	3.4 ± 1.9
T/M	1.3 ± 0.4	1.6 ± 0.2
VT	244 ± 60	753 ± 252

^a Promedio de % actividad inyectada ± desviación estándar por gramo de tejido de n animales. T/M: representa la relación de captación tumor/músculo. VT: promedio del volumen del tumor en mm³.

4.3.2 Evaluación biológica de [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]harmina y 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol

4.3.2.1 Evaluación in vivo mediante imagenología PET-CT

Todos los estudios descriptos a continuación fueron llevados a cabo con una cámara para pequeños animales nanoScan® PET-CT de Mediso Preclinical Imaging (figura 36). La misma fue una adquisición de equipamiento de Cudim, la cual sustituyó a la cámara TRIUMPH TM (TriFoil, Inc., US) mencionada anteriormente. Este nuevo dispositivo presenta una gran ventaja respecto al anterior, permitiendo realizar adquisiciones de imágenes en simultáneo de hasta 3 ratones. Todos los ensayos que se describen en este apartado, se tratan de estudios estáticos donde se inyecta al animal fuera de cámara y se comienza a adquirir el estudio luego de 15 minutos post-inyección. Esta práctica permitió la adquisición de hasta 3 animales por estudio. Por ello, se realizaron estudios de imagen en un mayor número de animales, aprovechando en mayor medida cada lote de producción.



Figura 36. Cámaras nanoScan® PET-MRI y SPECT-CT de Mediso Preclinical Imaging para pequeños animales. Izquierda: cámara PET-RMN. Derecha: cámara SPECT-CT. Al finalizar el estudio PET, se puede utilizar el componente anatómico MRI o mover la camilla con los animales hacia la otra cámara, para obtener el CT como componente anatómico sin alterar la posición de los animales.

Evaluación de [11C]harmina

Al momento de la adquisición de la nueva cámara PET-CT para pequeños animales de Mediso, se disponía de los protocolos de producción y control de calidad de [¹¹C]harmina, permitiendo su uso es estudios *in vivo*. Por ello, se decidió comenzar a evaluar éste último mediante estudios imagenológicos. En este contexto, inicialmente se adquirieron imágenes con [¹¹C]harmina desde los 15 minutos postinyección (p.i.) hasta los 60 minutos p.i. Para ello se utilizó un grupo de 5 ratones inoculados con la línea celular LNCaP con tumores de un tamaño promedio de 177 ± 8 mm³. Las imágenes fueron pre-procesadas de modo de obtener 3 frames (paquetes de imágenes adquiridas en un intervalo dado de tiempo) de 15 minutos cada uno. Posteriormente, mediante el uso de la herramienta informática PMOD V3.8, se procesaron y analizaron las imágenes estableciendo un volumen de interés (VOI, por sus siglas en inglés) en la región donde se encontraba el tumor y otro VOI en el músculo contralateral (Figura 37). En la Figura 37 (derecha) puede observarse dentro de un circulo azul (indicado en amarillo) el VOI trazado para el tumor. Dentro de éste se observa una importante captación del radiotrazador en comparación con el músculo sano contralateral (Figura 37, Derecha, Círculo Cian). A su vez puede observarse en LE y RT (derecha) una gran captación del radiotrazador correspondiente a los intestinos del animal, que tienen una alta expresión basal del blanco molecular (MAO-A).^{188,189} En la Tabla 10, se muestran los valores de relación captación tumor/músculo para cada animal en los 3 frames correspondientes.

137



Figura 37. Diferentes secciones de una imagen PET-CT de los resultados obtenidos de la captación de [¹¹C]harmina (*frame* 3, 45-60 min p.i.) en uno de los tumores inducidos con células LNCaP (izquierda: plano transversal; centro: plano sagital; derecha: plano coronal). A la derecha señalado con amarillo, dentro del círculo azul se observa un punto de alta captación del radiotrazador el cual se corresponde con el tumor. Dentro del círculo cian se encuentra delimitada una región del lado contralateral, que representa tejido muscular sano, dentro de la cual no se observa captación apreciable.

Tabla 10. Relación de captación tumor/músculo del radiotrazador [¹¹C]harmina. *Hot Av*: es el promedio de los puntos con mayor actividad delimitados dentro del volumen de interés (VOI). Frames, F1: tiempo comprendido entre 15 -30 minutos post-inyección; F2: 30-45 minutos PI; F3: 45-60 minutos PI. V tumor: 177 ± 8 mm³.

Ratón	T/NT Hot Av					
	F1	F2	F3			
C2R1	0.8	1.4	2.2			
C3R3	2.1	2.8	2.7			
C4R4	1.0	1.8	2.9			
C6R6	1.6	2.2	3.5			
C8R8	1.4	2.2	2.4			
Prom ± Desvest	1.4 ± 0.5	2.1 ± 0.5	2.7 ± 0.5			

En la Tabla 10 se observa en promedio una acumulación tumoral de [¹¹C]harmina mayor que la alcanzada en el músculo a partir de los 30-45 min p.i. Se evidencia una tendencia al aumento de la relación T/M, alcanzandose el valor más alto promedio (2.7 \pm 0.5) en el *frame* F3 (45-60 min PI). Este resultado nos llevó a plantearnos estudios a tiempos mayores a 60 minutos para la relación de captación

T/M . Dado que los valores de actividad al final de la producción de [¹¹C]harmina permitían llevar a cabo estudios a mayores tiempos, se adquirieron imágenes desde los 60 a los 90 minutos p.i., en otro grupo de animales inoculados con la línea celular LNCaP. Las imagenes fueron procesadas y analizadas como se describió previamente, estableciéndose dos nuevos *frames* de 15 minutos cada uno (*frames* 4 y 5). En la Tabla 11, se muestran los valores de relación T/M para cada animal en los dos *frames* correspondientes.

Tabla 11. Relación de captación tumor/músculo (T/M) del radiotrazador [¹¹C]harmina en modelo xenográfico inducido con la línea celular LNCaP. *Hot Av*: es el promedio de los puntos con mayor actividad delimitados dentro del volumen de interés (VOI). F4: 60-75 minutos PI; F5: 75-90 minutos PI. V tumor: $197 \pm 102 \text{ mm}^3$.

Ratón	T/M <i>H</i> c	ot Av
	F4	F5
C1R1	4.0	4.5
C2R1	4.0	5.3
C2R2	3.6	4.7
C3R2	3.3	3.9
C3R1	4.6	4.9
C4R1	3.2	4.0
C6R1	2.8	4.0
Prom ± Desvest	3.6 ± 0.6	4.5 ± 0.5

En la Tabla 11 se puede observar que la relación de captación T/M aumenta considerablemente en los nuevos *frames*. Esto indica que la captación del radiotrazador por parte del tumor se ve aumentada a tiempos mayores de 60 minutos. Teniendo en cuenta los datos que se muestran en las Tablas 10 y 11, y la tendencia del gráfico de la Figura 38 (relación T/M vs tiempo), se puede afirmar que mediante adquisición de imágenes PET-CT, la mayor relación T/M (4.5 ± 0.5) se encuentra en el *frame* de 75-90 minutos p.i. Este valor de relación T/M, es considerablemente mayor al mejor valor obtenido en la evaluación de [¹¹C]clorgilina con la cámara TRIUMPH (T/M: 2.0 ± 0.1), alentandonos a continuar los estudios con [¹¹C]harmina. En este contexto, en anteriores estudios se observó una captación tumoral similar a la mostrada por [¹¹C]harmina por parte de los radiotrazadores [¹⁸F]AIF-PSMA y [68Ga]-PSMA cuando se realizaron estudios PET en animales

inoculados con la línea celular LNCaP.^{172,190} Estos resultados resaltan el potencial de [¹¹C]harmina como radiotrazador MAO-A como agente imagenológico prometedor para el CaP altamente agresivo.

De la misma manera que para el modelo LNCaP, se adquirieron imágenes PET-CT desde los 45 a 90 minutos p.i. (donde se encontraron los mayores valores de relación T/M), con un grupo de 5 animales inoculados con la línea celular PC3. Esta línea celular, como se mencionó anteriormente, fue seleccionada con el fin de generar un modelo tumoral xenográfico con una expresión limitada del blanco molecular (MAO-A), como control negativo. De esta manera, las imágenes PET-CT adquiridas fueron procesadas y analizadas como se describió previamente. En la Tabla 12 se muestran los valores de relación captación T/M para cada animal en los 3 *frames* correspondientes.

Tabla 12. Relación de captación T/M del radiotrazador [¹¹C]harmina en modelo de tumor xenográfico inducido con la línea celular PC3. *Hot Av*: es el promedio de los puntos con mayor actividad delimitados dentro del volumen de interés (VOI). *Frames*, F1: Tiempo comprendido entre 45-60 minutos PI; F2: 60-75 minutos PI; F3: 75-90 minutos PI. V tumor: $179 \pm 76 \text{ mm}^3$.

Ratón	T/M Hot Av					
	F1	F2	F3			
C7R1	1.1	1.1	1.1			
C7R2	1.0	1.1	1.3			
C8R1	0.9	0.8	0.9			
C9R1	1.0	0.9	1.1			
C9R2	1.3	1.2	1.4			
Prom ± Desvest	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2			

En la Tabla 12 se observa una acumulación tumoral de [¹¹C]harmina similiar a la alcanzada en el músculo a todos los tiempos de estudio. Los valores de relación de captación T/M son muy similares y con un valor alrededor de 1 en los tres *frames*. Esto indica que no hay una captación diferencial entre el tejido blanco (tumor) y el tejido no blanco (músculo). Estos resultados se encontrarian en concordancia con el diseño metodológico, teniendo en cuenta que la línea celular PC3 presenta una expresión limitada del blanco molecular (MAO-A).¹⁰⁸ A su vez, estos resultados confirmarían la especificidad de [¹¹C]harmina por el blanco molecular.

En la Figura 38 se muestran imágenes representativas de la captación de [¹¹C]harmina en animales con tumor inducido tanto con la línea celular LNCaP (sobreexpresión MAO-A, control positivo), como con la línea celular PC3 (expresión limitada de MAO-A, control negativo). En la misma figura, puede observarse la captación por parte del tumor inducido con la línea LNCaP, así como la ausencia de captación en tumor inducidos con la línea PC3 (Figura 38). Además, en ambos modelos, en la vista del corte sagital (Figura 38, Derecha), puede observarse una importante captación a nivel cerebral, debido a la alta expresión basal de MAO-A en dicho órgano.¹⁹¹



Figura 38. Parte superior: imágenes PET-CT adquiridas con [¹¹C]harmina en modelo xenográfico inducido con las líneas celulares LNCaP (izquierda) y PC3 (derecha) en ratones *nude*. Imágenes representativas (planos coronal y sagital) de la distribución de [¹¹C]harmina en el f*rame* 5 (75–90 minutos p.i.). El círculo magenta corresponde al VOI del tumor. El círculo verde corresponde a la región contralateral, que representa tejido muscular sano. Parte inferior: gráfico T/M vs tiempo de los resultados de adquisición de imágenes PET-CT con [¹¹C]harmina tanto en modelo LNCaP como en PC3.

Evaluación de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol

Dado que los resultados obtenidos con [¹¹C]harmina fueron muy alentadores, se decidió continuar los estudios con el derivado 2-[18F]fluoroetil-harmol, marcado con flúor-18. El mismo se seleccionó inicialmente en base a que recientes estudios reportan, tanto in vitro como in vivo, su excelente afinidad por la enzima MAO-A. Por lo tanto, este radiotrazador se convierte en un candidato prometedor para la visualización de MAO-A mediante PET.^{126,125} Además, el mayor período de semidesintegración del flúor-18 (t_{1/2} 109.5 min) comparado con carbono-11 (t_{1/2} 20.4 min), nos permitiría realizar estudios a tiempos mayores tanto en la adquisición de imágenes como en biodistribuciones. En este contexto, se realizaron estudios PET-CT con 2-[18F]fluoroetil-harmol en cuatro grupos de animales inoculados con la línea celular LNCaP. Un grupo de 5 animales desde los 15 hasta los 60 minutos p.i.; un grupo de 5 animales desde los 45 hasta los 90 minutos p.i.; un grupo de 3 animales desde los 120 hasta los 165 minutos p.i.; y finalmente un grupo de 3 animales desde los 180 hasta los 225 minutos p.i. Las imágenes fueron pre-procesadas para obtener 3 frames de 15 minutos cada uno para cada grupo de animales (Ver Tabla 13). Tanto los frames como el tiempo de cada estudio fueron seleccionados para ser comparables con los obtenidos con [¹¹C]harmina. Además, se obtuvieron frames con un tiempo de estudio más largo con el fin de obtener datos de la relación de captación T/M a tiempos mayores que los ensayados con [¹¹C]harmina.

Tabla 13. Relación de captación T/M de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol en modelo LNCaP. *Hot Av*: es el promedio de los puntos con mayor actividad delimitados dentro del volumen de interés (VOI). *Frames*, F1: Tiempo comprendido entre 15-30 minutos p.i.; F2: 30-45 minutos p.i.; F3: 45-60 minutos p.i.; F4: 60-75 min p.i.; F5: 75-90 min p.i.; F6:120-135 min p.i.; F7: 135-150 min p.i.; F8: 150-165 min p.i.; F9: 180-195 min p.i.; F10: 195-210 min p.i.; F11: 210-225 min p.i.. Los volúmenes de tumor promedio fueron: Grupo 1: 248 ± 65 mm³; Grupo 2: 200 ± 35 mm³; Grupo 3: 506 ± 458 mm³; Grupo 4: 292 ± 120 mm³. P ± D: Promedio ± Desviación estándar.

C	Grupo 1 (n=5))		Grupo 2	2 (n=5)	
Animal	F1	F2	Animal	F3	F4	F5
C2R1	1.0	1.2	C1R1	1.4	1.7	1.7
C2R2	1.2	1.5	C3R2	1.7	1.8	2.2
C3R1	0.8	0.9	C7R1	1.4	1.7	2.1
C4R2	1.6	1.3	C8R3	2.8	3.1	3.5
C7R7	1.3	1.5	C8R4	1.4	1.8	1.9
P ± D	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.3	Ρ±D	1.8 ± 0.6	2.0 ± 0.6	2.3 ± 0.7

	Grupo	o 3 (n=3)		Grupo 4 (n=3)			
Animal	F6	F7	F8	Animal	F9	F10	F11
C4R1	1.3	1.6	1.4	C3R3	2.1	2.1	2.3
C5R3	2.8	2.8	3.1	C4R4	1.4	1.5	1.7
C10R1	1.9	2.2	2.5	C2R3	2.1	2.3	2.4
Ρ±D	2.0 ± 0.7	2.2 ± 0.6	2.3 ± 0.8	P ± D	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.1 ± 0.4

Los datos de las imágenes se procesaron y analizaron de la misma manera que como se realizó con [¹¹C]harmina. La Figura 39 (derecha) ilustra la tendencia a lo largo del tiempo de la relación de captación T/M promedio de cada grupo de animales en los *frames* correspondientes. Se obtendría una acumulación tumoral mayor que la alcanzada en el músculo a partir de los 45min p.i. Puede observarse una tendencia al aumento del valor de relación T/M desde los 30 hasta los 90 minutos p.i. (*frames* 2 a 5). Luego, la relación T/M se mantiene relativamente estable

hasta los 165 minutos p.i. (*frames* 5 a 8), donde comienza a disminuir hacia los 195 minutos (*frame* 9). Los resultados de estos estudios indican que el mayor valor de relación de captación T/M (2.3 ± 0.7) se obtuvo en el *frame* 5 (75-90 minutos), en un grupo de ratones con tumores xenográficos de un volumen promedio de 200 \pm 35 mm³. Por tanto, estos resultados demuestran que comparativamente [¹¹C]harmina presenta una mejor relación de captación T/M que 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol ($4.5 \pm 0.5 \vee s 2.3 \pm 0.7$). A su vez, no hubo un aumento importante de la relación de captación T/M de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol después de 90 minutos p.i. hasta los 225 minutos de ensayo. Además, debido a la menor relación de captación T/M obtenida en los ensayos con 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol respecto a los resultados con [¹¹C]harmina, no fueron realizados estudios *in vivo* con la línea celular PC3 como control negativo.



Figura 39. Izquierda: imágenes PET-CT de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol en un ratón con tumor xenográfico inducido con la línea celular LNCaP. Imagen representativa (planos coronal y sagital) de la distribución de 2-[¹⁸F]fluoroetilo-harmol en el *frame* 5 (75–90 minutos p.i.). El círculo magenta corresponde al VOI del tumor. Dentro del círculo verde se delimitó una región en el lado contralateral, que representa tejido muscular sano. Derecha: relación de captación T/M vs tiempo, después de la inyección intravenosa de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol de 15 a 225 min p.i.

Evaluación de [¹¹C]clorgilina mediante imagenología PET-CT con cámara nanoScan de Mediso

Los estudios imagenológicos PET de [¹¹C]harmina y 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol se obtuvieron utilizando la cámara para pequeños animales nanoScan de Mediso recientemente adquirida por Cudim. Debido a esto, decidimos realizar estudios en dicha cámara con [¹¹C]clorgilina (previamente se estudió utilizando una camara Triumph[™]), en un pequeño grupo de 3 animales inoculados con la línea celular LNCaP. Debido a que la actividad final de [¹¹C]clorgilina es mucho más baja que la obtenida con [¹¹C]harmina, no fue posible realizar ensayos de imágenes PET-CT *in vivo* más de 40 minutos post-inyección. A su vez, en los estudios realizados inicialmente en la cámara TRIUMPH se había observado que la relación T/M disminuía luego de los 20 minutos post inyección. Por ello, las Imágenes fueron preprocesadas para obtener dos *frames*, el primero entre 5-20 minutos p.i. y el segundo entre 20-40 minutos p.i. Los datos imagenológicos fueron procesados y analizados como se describió anteriormente (Tabla 14).

Tabla 14. Relación de captación T/M del radiotrazador [¹¹C]clorgilina en modelo de tumor xenográfico inducido con la línea celular LNCaP. *Hot Av*: es el promedio de los puntos con mayor actividad delimitados dentro del volumen de interés (VOI). *Frames*, F1: Tiempo comprendido entre 5-20 minutos p.i.; F2: 20-40 minutos p.i.; V tumor: 145 ± 18 mm³.

Ratón	T/M Hot Av			
	F1	F2		
C3R2	1.6	1.5		
C4R1	1.0	1.4		
C6R3	1.7	1.7		
Prom ± Desvest	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.1		

Los resultados de este estudio indican que el mayor valor de relación de captación T/M de [¹¹C]clorgilina (1.5 ± 0.1) fue menor que los mejores valores obtenidos tanto con [¹¹C]harmina (4.5 ± 0.5), como para 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol (2.3 ± 0.7). Cabe destacar que el mayor valor de relación T/M mencionado (1.5 ± 0.1), es menor que el obtenido en la cámara TRIUMPH para el mismo *frame* 2.0 ± 0.1 (5-20 min PI). A

su vez, los resultados obtenidos mediante imagen concuerdan con los resultados de la biodistribución (se discutirán en el siguiente punto) a 20 minutos (1.6 ± 0.2). En conjunto, los resultados obtenidos para [¹¹C]clorgilina no nos alentaron a realizar posteriores estudios *in vivo* con la línea celular PC3 como control negativo. Los hallazgos imagenológicos destacados hasta aquí, aunque preliminares, sugieren que [¹¹C]harmina sería la mejor opción para realizar imágenes PET-CT, con el fin de visualizar la expresión de la enzima MAO-A en cáncer de próstata de alta agresividad.

4.3.2.2 Evaluación *ex vivo* de [¹¹C]harmina, [¹¹C]clorgilina y 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol mediante biodistribuciones

Evaluación de [¹¹C]harmina

Con el objetivo de comparar y confirmar la distribución y captación tumoral específica in vivo determinada mediante el análisis de imágenes PET, se llevaron a cabo estudios de biodistribución ex vivo. Se realizaron estudios de biodistribución a 40, 60 y 90 minutos p.i., en los modelos animales con tumores xenográficos inducidos con las líneas celulares LNCaP (MAO-A +) y PC3 (MAO-A -). Para ello se inyectaron a los animales con el radiotrazador y se esperó el tiempo predeterminado antes de sacrificarlos, se extrajeron sus órganos, tejidos de interés, el tumor y se midió la actividad de cada uno en un detector de centelleo sólido ORTEC. Los resultados de captación T/M a diferentes tiempos se muestra en la Tabla 15. Los resultados de biodistribución con [¹¹C]harmina en animales con tumores xenográficos inducidos tanto con la línea celular LNCaP como PC3, mostraron valores de captación T/M similares a los obtenidos mediante adquisición de imágenes PET-CT. En este sentido, los valores de la relación T/M a 90 minutos p.i.(donde se obtuvo el mayor valor T/M) fueron: $3,6 \pm 0,7$ frente a $4,5 \pm 0,5$ en el modelo LNCaP y 1,6 \pm 0,3 frente a 1,2 \pm 0,2 en el modelo PC3 (Tablas 11 y 12). Además, se demostró la especificidad de [¹¹C]harmina por MAO-A, mediante un experimento de bloqueo con harmina "fría" (sin marcar). El ensayo consistió en administrar una dosis de 10 mg/Kg de harmina "fría" *vía* intraperitoneal y esperar 90 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó una biodistribución a 60 minutos con [¹¹C]harmina de la misma manera que se describió anteriormente. Los resultados evidenciaron una importante disminución de la captación de [¹¹C]harmina (aproximadamente un 70 %) respecto a la biodistribución a 60 minutos sin bloqueo (2,6 % Al/g frente a 7,8 % Al/g, respectivamente, ver Tabla 15 y Figura 40), en los tumores inducidos con la línea celular LNCaP. El %Al/g de [¹¹C]harmina en el cerebro, dónde como se mencionó con anterioridad la expresión basal de MAO-A es elevada, se redujo aproximadamente un 82% en el experimento de bloqueo. Estos resultados en sintonía con los obtenidos mediante imagenología PET-CT, confirman la especificidad de [¹¹C]harmina por el blanco molecular.



Figura 40. Ensayo de biodistribución con [¹¹C]harmina a 60 minutos, con bloqueo con harmina (10 mg/Kg, 90 minutos, intraperitoneal) en ratones *nude* con tumores xenográficos LNCaP. Por efecto del bloqueo se observa una disminución del %Al/g en un 70%. Se aplicó un test de student de dos colas no emparejado. ****p < 0.001.

Tejido	%Al/g 40	%Al/g 40 minutos %Al/g 60		%AI/g 40 minutos		%Al/g 60 m		%Al/g 90 ı	ninutos
-	LNCaP	PC3	LNC	CaP	PC3	LNCaP	PC3		
	(n=3)	(n=5)	(n=4) (n=	3, bloqueo)	(n=3)	(n=4)	(n=3)		
Sangre	1.8 ± 0.8	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.1	2.1 ± 0.8	1.2 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.5		
Hígado	4.6 ± 0.5	4.2 ± 0.8	4.8 ± 1.0	6.0 ± 0.5	4.9 ± 2.1	4.8 ± 1.0	4.4 ± 1.0		
Corazón	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.4	1.8 ± 0.4	1.2 ± 0.1		
Pulmón	7.5 ± 0.6	6.8 ± 0.8	4.6 ± 0.9	2.0 ± 0.1	4.1 ± 1.2	3.7 ± 0.5	2.8 ± 0.3		
Bazo	3.5 ± 1.2	5.1 ± 0.3	6.4 ± 0.2	5.7 ± 1.5	4.2 ± 0.9	5.1 ± 1.3	4.5 ± 0.7		
Riñón	12.0 ± 2.8	9.3 ± 1.1	9.4 ± 3.5	6.0 ± 0.4	5.6 ± 1.6	6.1 ± 1.0	3.9 ± 0.5		
Músculo	2.5 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.5	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.8	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2		
Hueso	3.8 ± 2.8	5.7 ± 3.3	13.1 ± 1.3	9.8 ± 1.8	11.3 ± 4.9	10.3 ± 3.0	8.9 ± 0.9		
Tumor	3.5 ± 1.1	1.8 ± 0.2	7.8 ± 1.6	2.6 ± 0.3	1.4 ± 0.5	3.7 ± 0.5	1.3 ± 0.2		
Cerebro	9.5 ± 2.6	7.7 ± 0.7	7.4 ± 0.5	1.4 ± 0.2	5.0 ± 1.1	4.7 ± 0.8	3.1 ± 0.6		
T/M	1.4 ± 0.6	1.2 ± 0.1	4.6 ± 0.8	3.2 ± 0.2	1.2 ± 0.4	3.6 ± 0.7	1.6 ± 0.3		
VT	182 ± 6	176 ± 61	212 ± 108	290 ± 100	206 ± 57	149 ± 102	165 ± 82		

Tabla 15. Biodistribución de [¹¹C]harmina en ratones *nude* con tumores xenográficos LNCaP.^a

^a Promedio de % actividad inyectada ± desviación estándar por gramo de tejido de n animales. T/M: representa la relación de captación tumor/músculo. VT: promedio del volumen del tumor en mm³.

Evaluación de 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol

Por otra parte, se realizaron estudios de biodistribución con 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol en ratones *nude* con tumores xenográficos inducidos con la línea celular LNCaP. La biodistribución se determinó 90, 120, 180 y 240 minutos después de la administración intravenosa de acuerdo con los estudios de imágenes PET-CT. La Tabla 16 muestra los resultados expresados como porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (%Al/g), en los órganos y tejidos más significativos.

Tejido	%Al/g	%Al/g	%Al/g	%Al/g
	90 min	120 min	180 min	240 min
	n=3	n=3	n=3	n=2
Sangre	2.2 ± 0.1	1.7 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.3
Hígado	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.6	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.01
Corazón	3.8 ± 0.4	3.1 ± 0.4	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.04
Pulmón	11.6 ± 1.4	12.7 ± 2.5	7.2 ± 1.0	7.2 ± 0.3
Bazo	4.6 ± 0.6	3.9 ± 1.3	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.4
Riñón	6.5 ± 0.4	6.2 ± 2.0	4.4 ± 0.7	4.0 ± 0.7
Músculo	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.6 ± 0.1
Hueso	2.3 ± 0.2	2.6 ± 0.5	2.5 ± 0.4	2.5 ± 0.2
Tumor	2.6 ± 0.4	3.4 ± 0.7	2.4 ± 0.4	3.2 ± 0.8
Cerebro	9.2 ± 0.5	9.4 ± 3.2	6.6 ± 0.8	5.9 ± 0.2
T/M	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.2	2.0 ± 0.4
VT	231 ± 61	202 ± 122	271 ± 89	242 ± 117

Tabla 16. Biodistribución de 2-[¹⁸F]fluoeroetil-harmol en ratones *nude* con tumores xenográficos inducidos con la línea celular LNCaP.^a

^a Promedio de % actividad inyectada ± desviación estándar por gramo de tejido de n animales. T/M: representa la relación de captación tumor/músculo. VT: promedio del volumen del tumor en mm³.

Los resultados de los ensayos de biodistribución con 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol en tumores LNCaP mostraron una tendencia similar a los resultados de las imágenes PET-CT. En este sentido, los resultados muestran que el mayor valor de relación de captación de T/M (2,0 \pm 0,4) se obtuvo a los 240 minutos después de la administración intravenosa (Tabla 16), en un grupo de ratones con tumores xenográficos de volumen promedio de 242 \pm 117 mm³. En conjunto, los resultados confirman los hallazgos previos obtenidos mediante imágenes PET-CT, por tanto, al igual que en los estudios *in vivo*, no se realizaron estudios de biodistribución en el modelo PC3 como control negativo.

4.3.2.3 Ensayos celulares

Cuantificación de MAO-A en líneas celulares mediante Western-Blotting

Con el objetivo de estudiar y confirmar la expresión del blanco molecular, se llevó a cabo una cuantificación de MAO-A de las líneas celulares LNCaP y PC3 del banco de células de Cudim mediante *western-blotting*. De esta manera se evidenció una alta expresión de MAO-A en la línea celular LNCaP y una muy baja expresión de MAO-A en la línea celular LNCaP y una muy baja expresión de MAO-A en la línea celular PC3 (Figura 41). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado para ambas líneas celulares.^{106,108} A su vez, estos datos refuerzan los resultados obtenidos con [¹¹C]harmina tanto en adquisición de imágenes PET-CT, como por biodistribuciones.



Figura 41. Inmunoblots de LNCaP y PC3 para la cuantificación de MAO-A. Se aplicó un test de student de dos colas no emparejado. ****p < 0.0001.

Evaluación in vitro de la internalización celular de [11C]harmina

Dado los prometedores resultados obtenidos con [¹¹C]harmina tanto en adquisición de imágenes PET-CT, como por biodistribuciones, y con el objetivo de aportar más información sobre la especificad por el blanco molecular, se llevaron a cabo estudios de internalización celular *in vitro* en las líneas celulares LNCaP (control positivo de MAO-A) y PC3 (control negativo de MAO-A). Para ello, se incubaron las células con [¹¹C]harmina durante 5, 10, 20 y 40 minutos. Conforme a los resultados obtenidos mediante imágenes PET-CT y en los ensayos de biodistribución, se observó que la internalización de [¹¹C]harmina, resultó ampliamente mayor en la línea celular LNCaP que en PC3 (Figura 42). Esto aporta evidencia adicional de que la línea celular LNCaP presenta sobreexpresión del blanco molecular (MAO-A), mientras que la expresión de MAO-A en PC3 es limitada, como ya se mencionó y determinó anteriormente.



Figura 42. Internalización celular de [¹¹C]harmina. Los gráficos de barras muestran el porcentaje de captación o internalización celular, normalizado por el número de células a diferentes tiempos de incubación. Se aplicó un test de student de dos colas no emparejado. ****p < 0.0001.

Anatomía patológica

Tumores extirpados de animales con xenoijertos inducidos con la línea celular LNCaP fueron preparados para realizar estudios de anatomía patológica (Figura 43). Las láminas fueron analizadas en colaboración con el patólogo Dardo Centurión (Grado 5, Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, UdelaR), informando que las muestras se correspondían con un carcinoma pobremente diferenciado, de alto grado histológico, de un valor 5 en la escala Gleason (valor más alto). Estos resultados confirmarían el alto grado de agresividad del modelo utilizado, en sintonía con los resultados obtenidos de los ensayos *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo* con [¹¹C]harmina. En este contexto, los resultados obtenidos con con concepto, demostrarían su potencial de traslación a ensayos clínicos, en pacientes con cáncer de próstata previamente diagnosticados con un alto grado de agresividad.



4X

20X

40X

Figura 43. Imágenes representativas de tumores grado 5 extraídos de un tumor xenográfico inducido con la línea celular LNCaP en ratones *nude*. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

4.4 Conclusiones

Se evaluaron los radiotrazadores marcados con carbono-11 o flúor-18: [¹¹C]harmina, [¹¹C]clorgilina y 2-[¹⁸F]fluoeroetil-harmol, en un modelo de tumor xenográfico inducido en ratones *nude* con la línea celular humana LNCaP, la cual presenta sobreexpresión de MAO-A. En este sentido, se llevaron a cabo estudios *in vivo* mediante adquisición de imágenes de PET-CT, así como ensayos de biodistribución *ex vivo*. Además, se evaluó el radiotrazador que presentó resultados más prometedores ([¹¹C]harmina) en un modelo de ratones *nude* portadores de tumores xenográficos con expresión limitada de MAO-A (utilizando la línea celular PC3) como control negativo. De esta manera, los resultados obtenidos permitieron determinar una elevada captación tumoral de [¹¹C]harmina, así como especificidad por el blanco molecular (MAO-A) mediante adquisición de imágenes PET-CT y ensayos de biodistribución *ex vivo*.

5. Conclusiones generales, perspectivas y alcance de la tesis

5.1 Conclusiones generales

Se evaluó la viabilidad de utilizar cuatro inhibidores selectivos de la enzima MAO-A marcados con carbono-11 o flúor-18 para visualizar la expresión de la misma in vivo, mediante imágenes PET, utilizando un modelo de ratones con tumores xenográficos inducidos con líneas celulares humanas de cáncer de próstata. Todos los estándares analíticos y precursores de radiomarcado para [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]harmina, y 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol se sintetizaron de manera eficiente y las condiciones de marcado se examinaron y optimizaron. Se llevo a cabo la optimización de la radiosíntesis semi-automatizada para obtener [¹¹C]clorgilina con [¹¹C]MeOTf como agente metilante en un módulo TRACERLAB FX C Pro, así como 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol utilizando un módulo Synthra RN Research Plus. También se intentó reproducir las dos únicas técnicas reportadas para obtener [¹¹C]azul de metileno, demostrando que el producto obtenido al seguir las mismas fue [¹¹C]MeCl. Se diseñó una estrategia alternativa para obtener [¹¹C]azul de metileno, la cual se basó en su síntesis orgánica convencional y una técnica reportada para introducir carbono-11 en un precursor adecuado mediante reacción de sustitución nucleofílica aromática con [¹¹C]dimetilamina. Así, se logró obtener [¹¹C]azul de metileno con rendimiento radioquímico de 11% (sin purificar). Es necesario realizar ensayos a futuro para lograr obtener [¹¹C]azul de metileno de manera eficiente, establecer las condiciones de purificación y de control de calidad, con el fin de realizar una evaluación in vivo. Los radiotrazadores PET: [¹¹C]clorgilina, [¹¹C]harmina, y 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol, se evaluaron en un modelo de tumor con alta expresión de MAO-A (utilizando la línea celular humana LNCaP) mediante estudios de imágenes de PET en animales pequeños y ensayos de biodistribución ex vivo. También evaluamos el radiotrazador más prometedor [¹¹C]harmina, en un modelo de ratones con tumores inducidos con una línea celular humana con expresión limitada de MAO-A (PC3) como control negativo. Confirmamos la especificidad de [¹¹C]harmina por el blanco molecular mediante ensayos in vitro, imágenes PET y ensayos de biodistribución ex vivo.

5.2 Perspectivas

Los resultados obtenidos utilizando un modelo de cáncer de próstata con sobreexpresión de MAO-A como prueba de concepto, sugieren que inhibidores de MAO-A marcados con carbono-11 y fluor-18 (radiotrazadores PET), podrían servir como prometedores biomarcadores en el campo de la imagenología molecular. Por ejemplo, en investigaciones sobre la implicación de la expresión de MAO-A en modelos preclínicos de cáncer de próstata de alta agresividad. Estos radiotrazadores PET para imágenes moleculares de la expresión de MAO-A podrían ayudar a visualizar el cáncer de próstata altamente agresivo, y también podrían generar nuevas oportunidades para el tratamiento de tumores con sobreexpresión de MAO-A con fármacos selectivos y específicos. En conjunto, nuestros resultados y los datos previos en modelos animales y humanos respaldan la viabilidad del uso de [¹¹C]harmina como una potencial herramienta de imagenología para la traslación a estudios clínicos, en el diagnóstico y con fines terapéuticos en el tratamiento del cáncer de próstata de alta agresividad. En este contexto, actualmente se está llevando a cabo en Cudim un protocolo de ensayo clínico con [¹¹C]harmina. Se han realizado estudios comparativos de [¹¹C]harmina en pacientes ya diagnosticados con CP de alta agresividad (Escala Gleason 5), a los que previamente se les realizaron estudios imagenológicos con [¹⁸F]AIF-PSMA-11. En este contexto, se han definido los métodos de adquisición, procesamiento y análisis de datos generales para las imágenes PET con [¹¹C]harmina. Los índices cuantitativos calculados mostraron sensibilidad al proceso de captación del radiofármaco y permitieron identificar las regiones tumorales. Sin embargo, se continúa trabajando en la definición de posibles tejidos de referencia para cada radiofármaco, con el objetivo de asegurar una estandarización en la medida cuantitativa de cada estructura, lo que permitiría a su vez avanzar en la comparación estadística entre datos de [¹¹C]harmina y [¹⁸F]AIF-PSMA-11. Por otro lado, resulta de interés estudiar la comparación de los datos cuantitativos con los cualitativos resultantes de análisis de los informes clínicos diagnósticos de las imágenes de los pacientes. A su vez, se ha identificado la necesidad de introducir un agregado al ensayo que permita caracterizar en un grupo de referencia, o pacientes no portadores de la patología en estudio. Concomitantemente, se está ampliando el número de pacientes captados al ensayo clínico para poder ampliar la estadística que permita concluir.

Por otra parte, es deseable continuar con la optimización de la radiosíntesis de [¹¹C]azul de metileno, para poder llevar a cabo una posterior caracterización biológica. Para ello se necesitarían realizar más ensayos radioquímicos de manera de optimizar el rendimiento radioquímico y establecer las condiciones de purificación y formulación, con el fin de obtener el radiotrazador con una actividad final adecuada para su uso en adquisición de imágenes PET.

5.3 Alcance de la tesis

Cabe destacar que los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de tesis de doctorado, han sido de relevancia para ser publicados de diferentes maneras. En primer lugar, se destaca que parte de los resultados fueron incluidos en una publicación científica en una revista internacional nivel Q1: ACS (american chemical society) Pharmacology & Translational Science (V: 611, p.:1734) - 1744, 2023). En este trabajo se destaca la producción y control de calidad de los radiotrazadores PET: [¹¹C]harmina, 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol y [¹¹C]clorgilina. Así como la evaluación biológica inicial en modelos de ratón con tumores inducidos con líneas celulares humanas de cáncer de próstata. En este sentido, el candidato más prometedor [11C]harmina inició un protocolo de ensayo clínico en Cudim, en el contexto de un proyecto financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Fondo María Viñas (FMV-ANII: FMV_1_2021_1_169507). Además, los estudios llevados a cabo con [¹¹C]harmina y 2-[¹⁸F]fluoroetil-harmol, se realizaron en el contexto de un proyecto financiado por CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica, Udelar) de iniciación a la investigación modalidad 2. Por otra parte, es importante mencionar que parte de los resultados obtenidos fueron presentados en diferentes instancias de divulgación. A nivel nacional se presentaron trabajos en dos ediciones del Encuentro Nacional de Química: ENAQUI 5 (2017) con el trabajo titulado "Síntesis y evaluación biológica de un radiotrazador PET que

reconoce MAO-A como potencial agente de diagnóstico en cáncer de próstata" (formato póster); ENAQUI 6 (2019) con el trabajo titulado "Avances en la síntesis del radiotrazador [¹¹C]azul de metileno" (presentación oral); en el Congreso Químico Farmacéutico (2018) con el trabajo titulado "Síntesis y evaluación biológica de un radiotrazador PET que reconoce MAO-A como potencial agente de diagnóstico en cáncer de próstata" (presentación oral); y una presentación a nivel internacional en las jornadas rioplatenses de química medicinal (La Plata, Argentina, 2024) con el trabajo titulado "Inhibidores de MAO-A marcados con carbono-11 y flúor-18: potenciales agentes de diagnóstico por imágenes PET en cáncer de próstata de alta agresividad" (formato póster). Por último, es relevante resaltar que en 2018 se publicó en la revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay (V79, 76, 80) un apartado titulado "Inhibidores de MAO-A como potenciales agentes de diagnóstico y terapia en cáncer de próstata", donde se destacó la relevancia del presente trabajo de tesis de doctorado llevado a cabo en Cudim.

Bibliografía

- Hussain, S.; Mubeen, I.; Ullah, N.; Shah, S. S. U. D.; Khan, B. A.; Zahoor, M.; Ullah, R.; Khan, F. A.; Sultan, M. A. Modern Diagnostic Imaging Technique Applications and Risk Factors in the Medical Field: A Review. *BioMed Res. Int.* 2022, 2022, 5164970. https://doi.org/10.1155/2022/5164970.
- (2) Fass, L. Imaging and Cancer: A Review. *Mol. Oncol.* **2008**, *2* (2), 115–152. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2008.04.001.
- (3) Weissleder, R.; Mahmood, U. Molecular Imaging. *Radiology* **2001**, *219* (2), 316–333. https://doi.org/10.1148/radiology.219.2.r01ma19316.
- (4) Weber, W. A.; Czernin, J.; Anderson, C. J.; Badawi, R. D.; Barthel, H.; Bengel, F.; Bodei, L.; Buvat, I.; DiCarli, M.; Graham, M. M.; Grimm, J.; Herrmann, K.; Kostakoglu, L.; Lewis, J. S.; Mankoff, D. A.; Peterson, T. E.; Schelbert, H.; Schöder, H.; Siegel, B. A.; Strauss, H. W. The Future of Nuclear Medicine, Molecular Imaging, and Theranostics. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2020**, *61* (Suppl 2), 263S-272S. https://doi.org/10.2967/jnumed.120.254532.
- (5) Kalimuthu, S.; Jeong, J. H.; Oh, J. M.; Ahn, B.-C. Drug Discovery by Molecular Imaging and Monitoring Therapy Response in Lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18 (8), 1639. https://doi.org/10.3390/ijms18081639.
- (6) James, M. L.; Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.* 2012, 92 (2), 897–965. https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2010.
- (7) Price, P. PET as a Potential Tool for Imaging Molecular Mechanisms of Oncology in Man. *Trends Mol. Med.* 2001, 7 (10), 442–446. https://doi.org/10.1016/s1471-4914(01)02127-x.
- (8) Smeraldo, A.; Ponsiglione, A. M.; Soricelli, A.; Netti, P. A.; Torino, E. Update on the Use of PET/MRI Contrast Agents and Tracers in Brain Oncology: A Systematic Review. *Int. J. Nanomedicine* **2022**, *17*, 3343–3359. https://doi.org/10.2147/IJN.S362192.
- (9) Refaat, A.; Yap, M. L.; Pietersz, G.; Walsh, A. P. G.; Zeller, J.; del Rosal, B.; Wang, X.; Peter, K. In Vivo Fluorescence Imaging: Success in Preclinical Imaging Paves the Way for Clinical Applications. *J. Nanobiotechnology* **2022**, 20 (1), 450. https://doi.org/10.1186/s12951-022-01648-7.
- (10) Guhlke, S.; Verbruggen, A. M.; Vallabhajosula, S. Radiochemistry and Radiopharmacy. In *Clinical Nuclear Medicine*; Biersack, H.-J., Freeman, L. M., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2007; pp 34–76. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28026-2_2.
- (11) Saha, G. B. *Basics of PET Imaging: Physics, Chemistry, and Regulations*; Springer: New York, NY, 2005.
- (12) Cherry, S. R.; Dahlbom, M. PET: Physics, Instrumentation, and Scanners. In *PET: Physics, Instrumentation, and Scanners*; Cherry, S. R., Dahlbom, M., Phelps, M. E., Eds.; Springer: New York, NY, 2006; pp 1–117. https://doi.org/10.1007/0-387-34946-4_1.
- (13) Jadvar, H.; Parker, J. A. *Clinical PET and PET/CT*; Springer: London; New York, 2005.

- (14) Radiotracer Applications in Industry: A Guidebook; Technical reports series / International Atomic Energy Agency; International Atomic Energy Agency: Vienna, 2004.
- (15) Ruth, T. J. The Uses of Radiotracers in the Life Sciences. *Rep. Prog. Phys.* **2008**, 72 (1), 016701. https://doi.org/10.1088/0034-4885/72/1/016701.
- (16) Wang, J.; Maurer, L. Positron Emission Tomography: Applications in Drug Discovery and Drug Development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5* (11), 1053– 1075. https://doi.org/10.2174/156802605774297056.
- (17) Hacker, M.; Beyer, T.; Baum, R. P.; Kalemis, A.; Lammertsma, A. A.; Lewington, V.; Talbot, J.-N.; Verzijlbergen, F. Nuclear Medicine Innovations Help (Drive) Healthcare (Benefits). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2015, *42*, 173–175. https://doi.org/10.1007/s00259-014-2957-6.
- (18) Gallamini, A.; Zwarthoed, C.; Borra, A. Positron Emission Tomography (PET) in Oncology. *Cancers* 2014, 6 (4), 1821–1889. https://doi.org/10.3390/cancers6041821.
- (19) Zhang-Yin, J. T.; Girard, A.; Bertaux, M. What Does PET Imaging Bring to Neuro-Oncology in 2022? A Review. *Cancers* **2022**, *14* (4), 879. https://doi.org/10.3390/cancers14040879.
- (20) Carli, M. F. D. Why Will PET Be the Future of Nuclear Cardiology? *J. Nucl. Med.* **2021**, *62* (9), 1189–1191. https://doi.org/10.2967/jnumed.120.254979.
- (21) Zimmer, L.; Luxen, A. PET Radiotracers for Molecular Imaging in the Brain: Past, Present and Future. *NeuroImage* **2012**, *61* (2), 363–370. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.12.037.
- (22) Cervenka, S.; Frick, A.; Bodén, R.; Lubberink, M. Application of Positron Emission Tomography in Psychiatry—Methodological Developments and Future Directions. *Transl. Psychiatry* **2022**, *12* (1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41398-022-01990-2.
- (23) Blasberg, R. PET Imaging of Gene Expression. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38* (16), 2137–2146. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00390-8.
- (24) Crişan, G.; Moldovean-Cioroianu, N. S.; Timaru, D.-G.; Andrieş, G.; Căinap, C.; Chiş, V. Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23 (9), 5023. https://doi.org/10.3390/ijms23095023.
- (25) Kim, E. E.; Inoue, T.; Lee, M.-C.; Wong, W. Clinical PET and PET/CT: Principles and Applications; 2013; p 398. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0802-5.
- (26) Townsend, D. W. Dual-Modality Imaging: Combining Anatomy and Function.
 J. Nucl. Med. 2008, 49 (6), 938–955.
 https://doi.org/10.2967/jnumed.108.051276.
- (27) PET/MRI: Methodology and Clinical Applications, Softcover reprint of the original 1st ed. 2014 edition.; Carrio, I., Ros, P., Eds.; Springer, 2016.
- (28) *Planning a Clinical PET Centre*; Human Health Series; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY: Vienna, 2010.
- (29) Serdons, K.; Verbruggen, A.; Bormans, G. M. Developing New Molecular Imaging Probes for PET. *Methods* 2009, 48 (2), 104–111. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.010.

- (30) Internationale Atomenergie-Organisation. Strategies for Clinical Implementation and Quality Management of PET Tracers; Publication / Division of Scientific and Technical Information, International Atomic Energy Agency; International Atomic Energy Agency: Vienna, 2009.
- (31) Talip, Z.; Favaretto, C.; Geistlich, S.; Meulen, N. P. van der. A Step-by-Step Guide for the Novel Radiometal Production for Medical Applications: Case Studies with 68Ga, 44Sc, 177Lu and 161Tb. *Molecules* **2020**, *25* (4), 966. https://doi.org/10.3390/molecules25040966.
- (32) Boellaard, R. Standards for PET Image Acquisition and Quantitative Data Analysis. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (Suppl 1), 11S-20S. https://doi.org/10.2967/jnumed.108.057182.
- Marengo, M.; Cicoria, G.; Infantino, A.; Vichi, S.; Zagni, F.; Mostacci, D.
 State of the Art in Cyclotrons for Radionuclide Production in Biomedicine. *Nucl. Sci. Eng.* 2023, 0 (0), 1–11. https://doi.org/10.1080/00295639.2022.2146433.
- (34) Goto, A.; Tachikawa, T.; Jongen, Y.; Schillo, M. Cyclotrons. In Comprehensive Biomedical Physics; Elsevier, 2014; pp 179–195. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53632-7.00612-2.
- (35) Gallerani, R.; Cicoria, G.; Fantuzzi, E.; Marengo, M.; Mostacci, D. Neutron Production in the Operation of a 16.5MeV PETrace Cyclotron. *Prog. Nucl. Energy* **2008**, *50* (8), 939–943. https://doi.org/10.1016/j.pnucene.2008.02.006.
- (36) PET-CT and PET-MRI in Oncology: A Practical Guide; Peller, P., Subramaniam, R., Guermazi, A., Eds.; Medical Radiology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01139-9.
- (37) Dash, A.; Chakravarty, R. Radionuclide Generators: The Prospect of Availing PET Radiotracers to Meet Current Clinical Needs and Future Research Demands. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *9* (1), 30–66.
- (38) Hassanpour, S. H.; Dehghani, M. Review of Cancer from Perspective of Molecular. J. Cancer Res. Pract. 2017, 4 (4), 127–129. https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001.
- (39) Vander Heiden, M. G.; DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **2017**, *168* (4), 657–669. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039.
- (40) Upadhyay, A. Cancer: An Unknown Territory; Rethinking before Going Ahead. *Genes Dis.* **2021**, *8* (5), 655–661. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.002.
- (41) Verze, P.; Cai, T.; Lorenzetti, S. The Role of the Prostate in Male Fertility, Health and Disease. *Nat. Rev. Urol.* **2016**, *13* (7), 379–386. https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89.
- Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 2024, 74 (3), 229–263. https://doi.org/10.3322/caac.21834.
- (43) CHLCC. Resumen Estadístico PROSTATA. Incidencia y Mortalidad periodo 2016-2020. Tendencia de la Mortalidad hasta 2021. https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/RESUMENES-ESTADISTICOSpara-los- canceres-mas-frecuentes--uc264.

- (44) Garau, M.; Alonso, R.; Musetti, C.; Barrios, E. Cancer Incidence and Mortality in Uruguay: 2013-2017. *Colomb. Médica* 2022, *53* (1), e2014966– e2014966. https://doi.org/10.25100/cm.v53i1.4966.
- (45) Rawla, P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J. Oncol.* **2019**, *10* (2), 63–89. https://doi.org/10.14740/wjon1191.
- (46) Bostwick, D. G.; Burke, H. B.; Djakiew, D.; Euling, S.; Ho, S.; Landolph, J.; Morrison, H.; Sonawane, B.; Shifflett, T.; Waters, D. J.; Timms, B. Human Prostate Cancer Risk Factors. *Cancer* **2004**, *101* (S10), 2371–2490. https://doi.org/10.1002/cncr.20408.
- (47) Barber, L.; Gerke, T.; Markt, S. C.; Peisch, S. F.; Wilson, K. M.; Ahearn, T.; Giovannucci, E.; Parmigiani, G.; Mucci, L. A. Family History of Breast or Prostate Cancer and Prostate Cancer Risk. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2018**, *24* (23), 5910–5917. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0370.
- (48) Kheirandish, P.; Chinegwundoh, F. Ethnic Differences in Prostate Cancer. *Br. J. Cancer* **2011**, *105* (4), 481–485. https://doi.org/10.1038/bjc.2011.273.
- (49) Chu, L. W.; Ritchey, J.; Devesa, S. S.; Quraishi, S. M.; Zhang, H.; Hsing, A. W. Prostate Cancer Incidence Rates in Africa. *Prostate Cancer* 2011, 2011, 947870. https://doi.org/10.1155/2011/947870.
- (50) Montagnana, M.; Lippi, G. Cancer Diagnostics: Current Concepts and Future Perspectives. *Ann. Transl. Med.* **2017**, *5* (13), 268. https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.20.
- (51) Mattiuzzi, C.; Lippi, G. Current Cancer Epidemiology. *J. Epidemiol. Glob. Health* **2019**, *9* (4), 217–222. https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001.
- (52) Montironi, R.; Cimadamore, A.; Lopez-Beltran, A.; Scarpelli, M.; Aurilio, G.; Santoni, M.; Massari, F.; Cheng, L. Morphologic, Molecular and Clinical Features of Aggressive Variant Prostate Cancer. *Cells* **2020**, *9* (5), 1073. https://doi.org/10.3390/cells9051073.
- (53) Merkens, L.; Sailer, V.; Lessel, D.; Janzen, E.; Greimeier, S.; Kirfel, J.; Perner, S.; Pantel, K.; Werner, S.; von Amsberg, G. Aggressive Variants of Prostate Cancer: Underlying Mechanisms of Neuroendocrine Transdifferentiation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41* (1), 46. https://doi.org/10.1186/s13046-022-02255-y.
- (54) Sekhoacha, M.; Riet, K.; Motloung, P.; Gumenku, L.; Adegoke, A.; Mashele, S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules* 2022, 27 (17), 5730. https://doi.org/10.3390/molecules27175730.
- (55) Lee, D. J.; Mallin, K.; Graves, A. J.; Chang, S. S.; Penson, D. F.; Resnick, M. J.; Barocas, D. A. Recent Changes in Prostate Cancer Screening Practices and Epidemiology. *J. Urol.* 2017, *198* (6), 1230–1240. https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.05.074.
- (56) Rebello, R. J.; Oing, C.; Knudsen, K. E.; Loeb, S.; Johnson, D. C.; Reiter, R. E.; Gillessen, S.; Van der Kwast, T.; Bristow, R. G. Prostate Cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2021, 7 (1), 1–27. https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0.
- (57) Borley, N.; Feneley, M. R. Prostate Cancer: Diagnosis and Staging. *Asian J. Androl.* **2009**, *11* (1), 74–80. https://doi.org/10.1038/aja.2008.19.

- (58) Bolaños Morera, P.; Chacón Araya., C.; Bolaños Morera, P.; Chacón Araya., C. Escala patológica de Gleason para el cáncer de prostata y sus modificaciones. *Med. Leg. Costa Rica* **2017**, *34* (1), 237–243.
- (59) Gabriele, D.; Jereczek-Fossa, B. A.; Krengli, M.; Garibaldi, E.; Tessa, M.; Moro, G.; Girelli, G.; Gabriele, P.; the EUREKA-2 consortium. Beyond D'Amico Risk Classes for Predicting Recurrence after External Beam Radiotherapy for Prostate Cancer: The Candiolo Classifier. *Radiat. Oncol.* **2016**, *11* (1), 23. https://doi.org/10.1186/s13014-016-0599-5.
- (60) D'Amico, A. V. Risk-Based Management of Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365* (2), 169–171. https://doi.org/10.1056/NEJMe1103829.
- (61) Tabayoyong, W.; Abouassaly, R. Prostate Cancer Screening and the Associated Controversy. *Surg. Clin. North Am.* **2015**, *95* (5), 1023–1039. https://doi.org/10.1016/j.suc.2015.05.001.
- (62) Dunn, M. W.; Kazer, M. W. Prostate Cancer Overview. *Semin. Oncol. Nurs.* **2011**, *27* (4), 241–250. https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.07.002.
- (63) Litwin, M. S.; Tan, H.-J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. JAMA 2017, 317 (24), 2532–2542. https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248.
- (64) Mottet, N.; Cornford, P.; Briers, E.; Santis, M. D.; Gillessen, S.; Grummet, J.; Henry, A. M. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-ISUP-SIOG GUIDELINES ON PROSTATE CANCER.
- (65) Wallitt, K. L.; Khan, S. R.; Dubash, S.; Tam, H. H.; Khan, S.; Barwick, T. D. Clinical PET Imaging in Prostate Cancer. *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* **2017**, *37* (5), 1512–1536. https://doi.org/10.1148/rg.2017170035.
- (66) Cook, G. J. R.; Azad, G.; Padhani, A. R. Bone Imaging in Prostate Cancer: The Evolving Roles of Nuclear Medicine and Radiology. *Clin. Transl. Imaging* 2016, 4 (6), 439–447. https://doi.org/10.1007/s40336-016-0196-5.
- (67) Fraum, T. J.; Ludwig, D. R.; Kim, E. H.; Schroeder, P.; Hope, T. A.; Ippolito, J. E. Prostate Cancer PET Tracers: Essentials for the Urologist. *Can. J. Urol.* 2018, *25* (4), 9371–9383.
- (68) Cuccurullo, V.; Di Stasio, G. D.; Mansi, L. Nuclear Medicine in Prostate Cancer: A New Era for Radiotracers. *World J. Nucl. Med.* **2018**, *17* (2), 70–78. https://doi.org/10.4103/wjnm.WJNM_54_17.
- (69) Simon, N. I.; Parker, C.; Hope, T. A.; Paller, C. J. Best Approaches and Updates for Prostate Cancer Biochemical Recurrence. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* **2022**, *42*, 1–8. https://doi.org/10.1200/EDBK_351033.
- (70) Almuhaideb, A.; Papathanasiou, N.; Bomanji, J. 18F-FDG PET/CT Imaging In Oncology. *Ann. Saudi Med.* 2011, *31* (1), 3–13. https://doi.org/10.4103/0256-4947.75771.
- Jadvar, H. Is There Use for FDG-PET in Prostate Cancer? Semin. Nucl. Med. 2016, 46 (6), 502–506. https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.07.004.
- (72) Zacho, H. D.; Jochumsen, M. R.; Langkilde, N. C.; Mortensen, J. C.; Haarmark, C.; Hendel, H. W.; Jensen, J. B.; Petersen, L. J. No Added Value of 18F-Sodium Fluoride PET/CT for the Detection of Bone Metastases in Patients with Newly Diagnosed Prostate Cancer with Normal Bone Scintigraphy. J. Nucl.

Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. **2019**, *60* (12), 1713–1716. https://doi.org/10.2967/jnumed.119.229062.

- (73) Niaz, M. J.; Sun, M.; Skafida, M.; Niaz, M. O.; Ivanidze, J.; Osborne, J. R.; O'Dwyer, E. Review of Commonly Used Prostate Specific PET Tracers Used in Prostate Cancer Imaging in Current Clinical Practice. *Clin. Imaging* **2021**, *79*, 278–288. https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2021.06.006.
- (74) Cuccurullo, V.; Di Stasio, G. D.; Evangelista, L.; Castoria, G.; Mansi, L.
 Biochemical and Pathophysiological Premises to Positron Emission
 Tomography With Choline Radiotracers. *J. Cell. Physiol.* 2017, 232 (2), 270–275. https://doi.org/10.1002/jcp.25478.
- (75) Detection rates of recurrent prostate cancer: 68Gallium (Ga)-labelled prostate-specific membrane antigen versus choline PET/CT scans. A systematic review - Masood Moghul, Bhaskar Somani, Tim Lane, Nikhil Vasdev, Brian Chaplin, Clive Peedell, Gokul Vignesh KandaSwamy, Bhavan Prasad Rai, 2019.

https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756287218815793 (accessed 2024-05-14).

- (76) M, E. F.; Nm, G.; N, A.; M, E.; Ac, E. PSMA-Targeting Radiopharmaceuticals for Prostate Cancer Therapy: Recent Developments and Future Perspectives. *Cancers* **2021**, *13* (16). https://doi.org/10.3390/cancers13163967.
- (77) Jadvar, H.; Calais, J.; Fanti, S.; Feng, F.; Greene, K. L.; Gulley, J. L.; Hofman, M.; Koontz, B. F.; Lin, D. W.; Morris, M. J.; Rowe, S. P.; Royce, T. J.; Salami, S.; Savir-Baruch, B.; Srinivas, S.; Hope, T. A. Appropriate Use Criteria for Prostate-Specific Membrane Antigen PET Imaging. *J. Nucl. Med.* **2022**, 63 (1), 59–68. https://doi.org/10.2967/jnumed.121.263262.
- (78) Kuten, J.; Fahoum, I.; Savin, Z.; Shamni, O.; Gitstein, G.; Hershkovitz, D.; Mabjeesh, N. J.; Yossepowitch, O.; Mishani, E.; Even-Sapir, E. Head-to-Head Comparison of 68Ga-PSMA-11 with 18F-PSMA-1007 PET/CT in Staging Prostate Cancer Using Histopathology and Immunohistochemical Analysis as a Reference Standard. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61* (4), 527–532. https://doi.org/10.2967/jnumed.119.234187.
- (79) Dietlein, F.; Kobe, C.; Neubauer, S.; Schmidt, M.; Stockter, S.; Fischer, T.; Schomäcker, K.; Heidenreich, A.; Zlatopolskiy, B. D.; Neumaier, B.; Drzezga, A.; Dietlein, M. PSA-Stratified Performance of 18F- and 68Ga-PSMA PET in Patients with Biochemical Recurrence of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2017**, *58* (6), 947–952. https://doi.org/10.2967/jnumed.116.185538.
- (80) Carroll, P. R.; Parsons, J. K.; Andriole, G.; Bahnson, R. R.; Barocas, D. A.; Castle, E. P.; Catalona, W. J.; Dahl, D. M.; Davis, J. W.; Epstein, J. I.; Etzioni, R. B.; Farrington, T.; Hemstreet, G. P.; Kawachi, M. H.; Lange, P. H.; Loughlin, K. R.; Lowrance, W.; Maroni, P.; Mohler, J.; Morgan, T. M.; Nadler, R. B.; Poch, M.; Scales, C.; Shaneyfelt, T. M.; Smaldone, M. C.; Sonn, G.; Sprenke, P.; Vickers, A. J.; Wake, R.; Shead, D. A.; Freedman-Cass, D. NCCN Clinical Practice Guidelines Prostate Cancer Early Detection, Version 2.2015. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* 2015, *13* (12), 1534–1561. https://doi.org/10.6004/jnccn.2015.0181.
- (81) Schaeffer, E. M.; Srinivas, S.; Adra, N.; An, Y.; Barocas, D.; Bitting, R.; Bryce, A.; Chapin, B.; Cheng, H. H.; D'Amico, A. V.; Desai, N.; Dorff, T.; Eastham, J. A.; Farrington, T. A.; Gao, X.; Gupta, S.; Guzzo, T.; Ippolito, J. E.; Kuettel, M. R.; Lang, J. M.; Lotan, T.; McKay, R. R.; Morgan, T.; Netto, G.; Pow-Sang, J. M.; Reiter, R.; Roach, M.; Robin, T.; Rosenfeld, S.; Shabsigh, A.; Spratt, D.; Teply, B. A.; Tward, J.; Valicenti, R.; Wong, J. K.; Shead, D. A.; Snedeker, J.; Freedman-Cass, D. A. Prostate Cancer, Version 4.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2023, 21 (10), 1067–1096. https://doi.org/10.6004/inccn.2023.0050.
- (82) Fandella, A.; Scattoni, V.; Galosi, A.; Pepe, P.; Fiorentino, M.; Gaudiano, C.; Giampaoli, M.; Gunelli, R.; Martino, P.; Montanaro, V.; Montironi, R.; Pierangeli, T.; Stabile, A.; Bertaccini, A. Italian Prostate Biopsies Group: 2016 Updated Guidelines Insights. *Anticancer Res.* 2017, 37 (2), 413–424.
- (83) EAU 2023: How to Manage Active Surveillance in 2023 Minimal Requirements for Histopathology of Biopsies. https://www.urotoday.com/conference-highlights/eau-annual-congress-2023/eau-2023-prostate-cancer/143060-eau-2023-how-to-manage-activesurveillance-in-2023-minimal-requirements-for-histopathology-of-biopsies.html (accessed 2023-11-29).
- (84) Loeb, S.; Bjurlin, M. A.; Nicholson, J.; Tammela, T. L.; Penson, D. F.; Carter, H. B.; Carroll, P.; Etzioni, R. Overdiagnosis and Overtreatment of Prostate Cancer. *Eur. Urol.* 2014, 65 (6), 1046–1055. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.12.062.
- (85) Vickers, A. J.; Sjoberg, D. D.; Ulmert, D.; Vertosick, E.; Roobol, M. J.; Thompson, I.; Heijnsdijk, E. A. M.; De Koning, H.; Atoria-Swartz, C.; Scardino, P. T.; Lilja, H. Empirical Estimates of Prostate Cancer Overdiagnosis by Age and Prostate-Specific Antigen. *BMC Med.* **2014**, *12*, 26. https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-26.
- (86) Cudim. *Biopsias por fusión con Resonancia-Ecografía*. https://cudim.org/biopsia/ (accessed 2024-05-20).
- (87) Jadvar, H. Molecular Imaging of Prostate Cancer: A Concise Synopsis. *Mol. Imaging* **2009**, *8* (2), 56–64.
- (88) Pinto, F.; Totaro, A.; Palermo, G.; Calarco, A.; Sacco, E.; D'Addessi, A.; Racioppi, M.; Valentini, A.; Gui, B.; Bassi, P. Imaging in Prostate Cancer Staging: Present Role and Future Perspectives. *Urol. Int.* **2012**, *88* (2), 125– 136. https://doi.org/10.1159/000335205.
- Lütje, S.; Boerman, O. C.; van Rij, C. M.; Sedelaar, M.; Helfrich, W.; Oyen, W. J. G.; Mulders, P. F. A. Prospects in Radionuclide Imaging of Prostate Cancer. *The Prostate* 2012, *7*2 (11), 1262–1272. https://doi.org/10.1002/pros.22462.
- (90) Chiotellis, A.; Muller, A.; Mu, L.; Keller, C.; Schibli, R.; Krämer, S. D.; Ametamey, S. M. Synthesis and Biological Evaluation of 18F-Labeled Fluoroethoxy Tryptophan Analogues as Potential PET Tumor Imaging Agents. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (11), 3839–3851. https://doi.org/10.1021/mp500312t.
- (91) Piert, M.; Shao, X.; Raffel, D.; Davenport, M. S.; Montgomery, J.; Kunju, L.
 P.; Hockley, B. G.; Siddiqui, J.; Scott, P. J. H.; Chinnaiyan, A. M.; Rajendiran, T. Preclinical Evaluation of 11C-Sarcosine as a Substrate of Proton-Coupled

Amino Acid Transporters and First Human Application in Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (8), 1216–1223. https://doi.org/10.2967/jnumed.116.173179.

- (92) Sonni, I.; Baratto, L.; Iagaru, A. Imaging of Prostate Cancer Using Gallium-68-Labeled Bombesin. *PET Clin.* **2017**, *12* (2), 159–171. https://doi.org/10.1016/j.cpet.2016.11.003.
- (93) Vargas, H. A.; Kramer, G. M.; Scott, A. M.; Weickhardt, A.; Meier, A. A.; Parada, N.; Beattie, B. J.; Humm, J. L.; Staton, K. D.; Zanzonico, P. B.; Lyashchenko, S. K.; Lewis, J. S.; Yaqub, M.; Sosa, R. E.; Eertwegh, A. J. V. D.; Davis, I. D.; Ackermann, U.; Pathmaraj, K.; Schuit, R. C.; Windhorst, A. D.; Chua, S.; Weber, W. A.; Larson, S. M.; Scher, H. I.; Lammertsma, A. A.; Hoekstra, O. S.; Morris, M. J. Reproducibility and Repeatability of Semiquantitative 18F-Fluorodihydrotestosterone Uptake Metrics in Castration-Resistant Prostate Cancer Metastases: A Prospective Multicenter Study. *J. Nucl. Med.* 2018, *59* (10), 1516–1523. https://doi.org/10.2967/jnumed.117.206490.
- (94) Yang, C.; Wang, Q.; Ding, W. Recent Progress in the Imaging Detection of Enzyme Activities in Vivo. RSC Adv. 2019, 9 (44), 25285–25302. https://doi.org/10.1039/C9RA04508B.
- (95) Rempel, B. P.; Price, E. W.; Phenix, C. P. Molecular Imaging of Hydrolytic Enzymes Using PET and SPECT. *Mol. Imaging* **2017**, *16*, 1536012117717852. https://doi.org/10.1177/1536012117717852.
- (96) Holland, J. P.; Cumming, P.; Vasdev, N. PET Radiopharmaceuticals for Probing Enzymes in the Brain. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2013**, *3* (3), 194–216.
- (97) Long, Q.; Johnson, B. A.; Osunkoya, A. O.; Lai, Y.-H.; Zhou, W.; Abramovitz, M.; Xia, M.; Bouzyk, M. B.; Nam, R. K.; Sugar, L.; Stanimirovic, A.; Williams, D. J.; Leyland-Jones, B. R.; Seth, A. K.; Petros, J. A.; Moreno, C. S. Protein-Coding and MicroRNA Biomarkers of Recurrence of Prostate Cancer Following Radical Prostatectomy. *Am. J. Pathol.* **2011**, *179* (1), 46–54. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.008.
- (98) Peehl, D. M.; Coram, M.; Khine, H.; Reese, S.; Nolley, R.; Zhao, H. The Significance of Monoamine Oxidase-A Expression in High Grade Prostate Cancer. J. Urol. 2008, 180 (5), 2206–2211. https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.07.019.
- (99) Aljanabi, R.; Alsous, L.; Sabbah, D. A.; Gul, H. I.; Gul, M.; Bardaweel, S. K. Monoamine Oxidase (MAO) as a Potential Target for Anticancer Drug Design and Development. *Molecules* **2021**, *26* (19), 6019. https://doi.org/10.3390/molecules26196019.
- (100) Wang, C. C.; Billett, E.; Borchert, A.; Kuhn, H.; Ufer, C. Monoamine
 Oxidases in Development. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2013**, *70* (4), 599–630.
 https://doi.org/10.1007/s00018-012-1065-7.
- (101) Zhao, H.; Flamand, V.; Peehl, D. M. Anti-Oncogenic and pro-Differentiation Effects of Clorgyline, a Monoamine Oxidase A Inhibitor, on High Grade Prostate Cancer Cells. *BMC Med. Genomics* **2009**, *2*, 55. https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-55.

- (102) Flamand, V.; Zhao, H.; Peehl, D. M. Targeting Monoamine Oxidase A in Advanced Prostate Cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2010, 136 (11), 1761– 1771. https://doi.org/10.1007/s00432-010-0835-6.
- (103) Wu, J. B.; Shao, C.; Li, X.; Li, Q.; Hu, P.; Shi, C.; Li, Y.; Chen, Y.-T.; Yin, F.; Liao, C.-P.; Stiles, B. L.; Zhau, H. E.; Shih, J. C.; Chung, L. W. K. Monoamine Oxidase A Mediates Prostate Tumorigenesis and Cancer Metastasis. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124* (7), 2891–2908. https://doi.org/10.1172/JCI70982.
- (104) Chen, L.; Xiong, W.; Qi, L.; He, W. High Monoamine Oxidase a Expression Predicts Poor Prognosis for Prostate Cancer Patients. *BMC Urol.* 2023, 23 (1), 112. https://doi.org/10.1186/s12894-023-01285-8.
- (105) Han, H.; Li, H.; Ma, Y.; Zhao, Z.; An, Q.; Zhao, J.; Shi, C. Monoamine Oxidase A (MAOA): A Promising Target for Prostate Cancer Therapy. *Cancer Lett.* **2023**, *5*63, 216188. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216188.
- (106) Wu, J. B.; Yin, L.; Shi, C.; Li, Q.; Duan, P.; Huang, J.-M.; Liu, C.; Wang, F.; Lewis, M.; Wang, Y.; Lin, T.-P.; Pan, C.-C.; Posadas, E. M.; Zhau, H. E.; Chung, L. W. K. MAOA-Dependent Activation of Shh-IL6-RANKL Signaling Network Promotes Prostate Cancer Metastasis by Engaging Tumor-Stromal Cell Interactions. *Cancer Cell* **2017**, *31* (3), 368–382. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.003.
- (107) Lin, Y.-C.; Chang, Y.-T.; Campbell, M.; Lin, T.-P.; Pan, C.-C.; Lee, H.-C.; Shih, J. C.; Chang, P.-C. MAOA-a Novel Decision Maker of Apoptosis and Autophagy in Hormone Refractory Neuroendocrine Prostate Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46338. https://doi.org/10.1038/srep46338.
- (108) Gordon, R. R.; Wu, M.; Huang, C.-Y.; Harris, W. P.; Sim, H. G.; Lucas, J. M.; Coleman, I.; Higano, C. S.; Gulati, R.; True, L. D.; Vessella, R.; Lange, P. H.; Garzotto, M.; Beer, T. M.; Nelson, P. S. Chemotherapy-Induced Monoamine Oxidase Expression in Prostate Carcinoma Functions as a Cytoprotective Resistance Enzyme and Associates with Clinical Outcomes. *PLOS ONE* 2014, 9 (9), e104271. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104271.
- (109) Meenu, M.; Verma, V. K.; Seth, A.; Sahoo, R. K.; Gupta, P.; Arya, D. S. Association of Monoamine Oxidase A with Tumor Burden and Castration Resistance in Prostate Cancer. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* **2020**, *93*, 100610. https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2020.100610.
- (110) Gaur, S.; Gross, M. E.; Liao, C.-P.; Qian, B.; Shih, J. C. Effect of Monoamine Oxidase A (MAOA) Inhibitors on Androgen-Sensitive and Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. *The Prostate* **2019**, *79* (6), 667– 677. https://doi.org/10.1002/pros.23774.
- (111) Shui, X.; Ren, X.; Xu, R.; Xie, Q.; Hu, Y.; Qin, J.; Meng, H.; Zhang, C.; Zhao, J.; Shi, C. Monoamine Oxidase A Drives Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *606*, 135–141. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.096.
- (112) Wang, K.; Luo, J.; Yeh, S.; You, B.; Meng, J.; Chang, P.; Niu, Y.; Li, G.; Lu, C.; Zhu, Y.; Antonarakis, E. S.; Luo, J.; Huang, C.-P.; Xu, W.; Chang, C. The MAO Inhibitors Phenelzine and Clorgyline Revert Enzalutamide Resistance in Castration Resistant Prostate Cancer. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 2689. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15396-5.

- (113) VIcek, P.; Bob, P.; Vales, K. Revisiting Monoamine Oxidase Inhibitors: A Potential Dual-Action Therapy for Patients with Prostate Cancer and Comorbid Depression? *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* **2023**, 37 (11), 1157–1160. https://doi.org/10.1177/02698811231179808.
- (114) Gross, M. E.; Agus, D. B.; Dorff, T. B.; Pinski, J. K.; Quinn, D. I.; Castellanos, O.; Gilmore, P.; Shih, J. C. Phase 2 Trial of Monoamine Oxidase Inhibitor Phenelzine in Biochemical Recurrent Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2021**, *24* (1), 61–68. https://doi.org/10.1038/s41391-020-0211-9.
- (115) Fowler, J. S.; Logan, J.; Shumay, E.; Alia-Klein, N.; Wang, G.-J.; Volkow, N. D. Monoamine Oxidase: Radiotracer Chemistry and Human Studies. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2015, *58* (3), 51–64. https://doi.org/10.1002/jlcr.3247.
- (116) Galbán, C.; Galbán, S.; Van Dort, M.; Luker, G. D.; Bhojani, M. S.; Rehemtualla, A.; Ross, B. D. Applications of Molecular Imaging. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2010, *95*, 237–298. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385071-3.00009-5.
- (117) Schwaiger, M.; Wester, H.-J. How Many PET Tracers Do We Need? J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. 2011, 52 Suppl 2, 36S-41S. https://doi.org/10.2967/jnumed.110.085738.
- (118) Liu, C. H.; Sastre, A.; Conroy, R.; Seto, B.; Pettigrew, R. I. NIH Workshop on Clinical Translation of Molecular Imaging Probes and Technology--Meeting Report. *Mol. Imaging Biol.* **2014**, *16* (5), 595–604. https://doi.org/10.1007/s11307-014-0746-z.
- (119) van Leeuwen, F. W. B.; Schottelius, M.; Mottaghy, F. M.; Hyafil, F.; Lubberink, M.; Kramer-Marek, G.; Oyen, W. J. G. Perspectives on Translational Molecular Imaging and Therapy: An Overview of Key Questions to Be Addressed. *EJNMMI Res.* 2022, *12* (1), 31. https://doi.org/10.1186/s13550-022-00903-0.
- (120) Youdim, M. B. H.; Edmondson, D.; Tipton, K. F. The Therapeutic Potential of Monoamine Oxidase Inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7* (4), 295–309. https://doi.org/10.1038/nrn1883.
- (121) Logan, J.; Fowler, J. S.; Ding, Y.-S.; Franceschi, D.; Wang, G.-J.; Volkow, N. D.; Felder, C.; Alexoff, D. Strategy for the Formation of Parametric Images under Conditions of Low Injected Radioactivity Applied to PET Studies with the Irreversible Monoamine Oxidase A Tracers [11C]Clorgyline and Deuterium-Substituted [11C]Clorgyline. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 2002, 22 (11), 1367–1376. https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000040947.67415.e1.
- (122) Fowler, J. S.; Logan, J.; Wang, G.-J.; Volkow, N. D.; Telang, F.; Ding, Y.-S.; Shea, C.; Garza, V.; Xu, Y.; Li, Z.; Alexoff, D.; Vaska, P.; Ferrieri, R.; Schlyer, D.; Zhu, W.; John Gatley, S. Comparison of the Binding of the Irreversible Monoamine Oxidase Tracers, [(11)C]Clorgyline and [(11)C]I-Deprenyl in Brain and Peripheral Organs in Humans. *Nucl. Med. Biol.* 2004, *31* (3), 313–319. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2003.10.003.
- (123) Orlefors, H.; Sundin, A.; Fasth, K. J.; Oberg, K.; Långström, B.; Eriksson, B.; Bergström, M. Demonstration of High Monoaminoxidase-A Levels in Neuroendocrine Gastroenteropancreatic Tumors in Vitro and in Vivo-Tumor

Visualization Using Positron Emission Tomography with 11C-Harmine. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30* (6), 669–679. https://doi.org/10.1016/s0969-8051(03)00034-9.

- (124) Goller, L.; Bergstrom, M.; Nilsson, S.; Westerberg, G.; Langstrom, B. Mao-a Enzyme Binding in Bladder-Cancer Characterized with [C-11] Harmine in Frozen-Section Autoradiography. *Oncol. Rep.* **1995**, *2* (5), 717–721. https://doi.org/10.3892/or.2.5.717.
- (125) Schieferstein, H.; Piel, M.; Beyerlein, F.; Lüddens, H.; Bausbacher, N.; Buchholz, H.-G.; Ross, T. L.; Rösch, F. Selective Binding to Monoamine Oxidase A: In Vitro and in Vivo Evaluation of (18)F-Labeled β-Carboline Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (3), 612–623. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.11.040.
- (126) Maschauer, S.; Haller, A.; Riss, P. J.; Kuwert, T.; Prante, O.; Cumming, P. Specific Binding of [(18)F]Fluoroethyl-Harmol to Monoamine Oxidase A in Rat Brain Cryostat Sections, and Compartmental Analysis of Binding in Living Brain. *J. Neurochem.* **2015**, *135* (5), 908–917. https://doi.org/10.1111/jnc.13370.
- (127) Shanthi, P. T.; Foes, A.; Munirathinam, G. Abstract 2958: Evaluating the Therapeutic Effects of Methylene Blue against Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2019, 79 (13_Supplement), 2958. https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-2958.
- (128) Schirmer, R. H.; Adler, H.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E. Lest We Forget You--Methylene Blue... *Neurobiol. Aging* **2011**, *32* (12), 2325.e7-16. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012.
- (129) Ramsay, R. R.; Dunford, C.; Gillman, P. K. Methylene Blue and Serotonin Toxicity: Inhibition of Monoamine Oxidase A (MAO A) Confirms a Theoretical Prediction. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152* (6), 946–951. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707430.
- (130) Schweiger, L.; Craib, S.; Welch, A.; Sharp, P. Radiosynthesis of [N-Methyl-11C]Methylene Blue. J. Label. Compd. Radiopharm. 2003, 46 (13), 1221–1228. https://doi.org/10.1002/jlcr.784.
- (131) Schweiger, L. F.; Smith, T. A. D. Fully-Automated Radiosynthesis and in Vitro Uptake Investigation of [N-Methyl-¹¹C]Methylene Blue. *Anticancer Res.* 2013, 33 (10), 4267–4270.
- (132) Wu, J. B.; Lin, T.-P.; Gallagher, J. D.; Kushal, S.; Chung, L. W. K.; Zhau, H. E.; Olenyuk, B. Z.; Shih, J. C. Monoamine Oxidase A Inhibitor-near-Infrared Dye Conjugate Reduces Prostate Tumor Growth. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137 (6), 2366–2374. https://doi.org/10.1021/ja512613j.
- (133) Rong, J.; Haider, A.; Jeppesen, T. E.; Josephson, L.; Liang, S. H. Radiochemistry for Positron Emission Tomography. *Nat. Commun.* 2023, 14, 3257. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36377-4.
- (134) Li, Z.; Conti, P. S. Radiopharmaceutical Chemistry for Positron Emission Tomography. Adv. Drug Deliv. Rev. 2010, 62 (11), 1031–1051. https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.007.
- (135) Vidal, A.; Bourdeau, C.; Frindel, M.; Garcia, T.; Haddad, F.; Faivre-Chauvet, A.; Bourgeois, M. ARRONAX Cyclotron: Setting up of In-House Hospital

Radiopharmacy. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*, e1572841. https://doi.org/10.1155/2020/1572841.

- (136) Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. Synthesis of 11C, 18F, 15O, and 13N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47 (47), 8998–9033. https://doi.org/10.1002/anie.200800222.
- (137) Nelson, B. J. B.; Andersson, J. D.; Wuest, F.; Spreckelmeyer, S. Good Practices for 68Ga Radiopharmaceutical Production. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2022**, *7*, 27. https://doi.org/10.1186/s41181-022-00180-1.
- (138) Tu, Z.; Mach, R. H. C-11 Radiochemistry in Cancer Imaging Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 10 (11), 1060–1095. https://doi.org/10.2174/156802610791384261.
- (139) Goud, N. S.; Bhattacharya, A.; Joshi, R. K.; Nagaraj, C.; Bharath, R. D.; Kumar, P. Carbon-11: Radiochemistry and Target-Based PET Molecular Imaging Applications in Oncology, Cardiology, and Neurology. *J. Med. Chem.* 2021, 64 (3), 1223–1259. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01053.
- (140) Dahl, K.; Halldin, C.; Schou, M. New Methodologies for the Preparation of Carbon-11 Labeled Radiopharmaceuticals. *Clin. Transl. Imaging* **2017**, *5* (3), 275–289. https://doi.org/10.1007/s40336-017-0223-1.
- (141) Burns, W. G.; Sims, H. E. Effect of Radiation Type in Water Radiolysis. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases 1981, 77 (11), 2803–2813. https://doi.org/10.1039/F19817702803.
- (142) Rotstein, B. H.; Liang, S. H.; Holland, J. P.; Collier, T. L.; Hooker, J. M.; Wilson, A. A.; Vasdev, N. 11CO2 Fixation: A Renaissance in PET Radiochemistry. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (50), 5621–5629. https://doi.org/10.1039/C3CC42236D.
- (143) Taddei, C.; Gee, A. D. Recent Progress in [11C]Carbon Dioxide ([11C]CO2) and [11C]Carbon Monoxide ([11C]CO) Chemistry. J. Label. Compd. Radiopharm. 2018, 61 (3), 237–251. https://doi.org/10.1002/jlcr.3596.
- (144) Xu, Y.; Qu, W. [11C]HCN Radiochemistry: Recent Progress and Future Perspectives. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *2021* (33), 4653–4682. https://doi.org/10.1002/ejoc.202100651.
- (145) Jewett, E. M.; Någren, K.; Mock, B. H.; Watkins, G. L. 30 Years of [11C]Methyl Triflate. *Appl. Radiat. Isot.* **2023**, *197*, 110812. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2023.110812.
- (146) Boscutti, G.; Huiban, M.; Passchier, J. Use of Carbon-11 Labelled Tool Compounds in Support of Drug Development. *Drug Discov. Today Technol.* 2017, 25, 3–10. https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.11.009.
- (147) Pees, A.; Chassé, M.; Lindberg, A.; Vasdev, N. Recent Developments in Carbon-11 Chemistry and Applications for First-In-Human PET Studies. *Molecules* **2023**, *28* (3), 931. https://doi.org/10.3390/molecules28030931.
- (148) Pichler, V.; Zenz, T.; Philippe, C.; Vraka, C.; Berrotéran-Infante, N.; Pfaff, S.; Nics, L.; Ozenil, M.; Langer, O.; Willeit, M.; Traub-Weidinger, T.; Lanzenberger, R.; Mitterhauser, M.; Hacker, M.; Wadsak, W. Molar Activity The Keystone in 11C-Radiochemistry: An Explorative Study Using the Gas Phase Method. *Nucl. Med. Biol.* **2018**, *67*, 21–26. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2018.09.003.
- (149) Coenen, H. H.; Gee, A. D.; Adam, M.; Antoni, G.; Cutler, C. S.; Fujibayashi, Y.; Jeong, J. M.; Mach, R. H.; Mindt, T. L.; Pike, V. W.; Windhorst, A. D.

Consensus Nomenclature Rules for Radiopharmaceutical Chemistry — Setting the Record Straight. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *55*, v–xi. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.09.004.

- (150) Jacobson, O.; Mishani, E. [11C]-Dimethylamine as a Labeling Agent for PET Biomarkers. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* **2008**, 66 (2), 188–193. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2007.08.012.
- (151) Synthesis of suicide inhibitors of monoamine oxidase: Carbon-11 labeled clorgyline, L-deprenyl and D-deprenyl - Macgregor - 1988 - Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals - Wiley Online Library. https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jlcr.258025 0102 (accessed 2024-05-20).
- (152) Ohmomo, Y.; Hirata, M.; Murakami, K.; Magata, Y.; Tanaka, C.; Yokoyama, A. Synthesis of [125I]lodoclorgyline, a Selective Monoamine Oxidase A Inhibitor, and Its Biodistribution in Mice. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1991, 39 (12), 3343–3345. https://doi.org/10.1248/cpb.39.3343.
- (153) Berardi, F.; Loiodice, F.; Fracchiolla, G.; Colabufo, N. A.; Perrone, R.; Tortorella, V. Synthesis of Chiral 1-[ω-(4-Chlorophenoxy)Alkyl]-4-Methylpiperidines and Their Biological Evaluation at Σ1, Σ2, and Sterol Δ8-Δ7 Isomerase Sites. *J. Med. Chem.* **2003**, *4*6 (11), 2117–2124. https://doi.org/10.1021/jm021014d.
- (154) Zirbesegger, K.; Buccino, P.; Kreimerman, I.; Engler, H.; Porcal, W.; Savio, E. An Efficient Preparation of Labelling Precursor of [11C]L-Deprenyl-D2 and Automated Radiosynthesis. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 2017, 2 (1), 10. https://doi.org/10.1186/s41181-017-0029-5.
- (155) Ayesa, S.; Samuelsson, B.; Classon, B. A One-Pot, Solid-Phase Synthesis of Secondary Amines from Reactive Alkyl Halides and an Alkyl Azide. Synlett 2008, 2008 (01), 97–99. https://doi.org/10.1055/s-2007-990927.
- (156) Buccino, P.; Kreimerman, I.; Zirbesegger, K.; Porcal, W.; Savio, E.; Engler, H. Automated Radiosynthesis of [11C]L-Deprenyl-D2 and [11C]D-Deprenyl Using a Commercial Platform. *Appl. Radiat. Isot.* 2016, *110*, 47–52. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2015.12.051.
- (157) Bergström, M.; Westerberg, G.; Kihlberg, T.; Långström, B. Synthesis of Some 11C-Labelled MAO-A Inhibitors and Their in Vivo Uptake Kinetics in Rhesus Monkey Brain. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24* (5), 381–388. https://doi.org/10.1016/S0969-8051(97)80003-0.
- (158) Philippe, C.; Zeilinger, M.; Mitterhauser, M.; Dumanic, M.; Lanzenberger, R.; Hacker, M.; Wadsak, W. Parameter Evaluation and Fully-Automated Radiosynthesis of [(11)C]Harmine for Imaging of MAO-A for Clinical Trials. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* 2015, 97, 182– 187. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2015.01.002.
- (159) Murthy, R.; Erlandsson, K.; Kumar, D.; Van Heertum, R.; Mann, J.; Parsey, R. Biodistribution and Radiation Dosimetry of 11C-Harmine in Baboons. *Nucl. Med. Commun.* 2007, 28 (9), 748–754. https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e32827420b5.
- (160) A synthetic route to 3-(dialkylamino)phenothiazin-5-ium salts and 3,7disubstituted derivatives containing two different amino groups - Strekowski -1993 - Journal of Heterocyclic Chemistry - Wiley Online Library.

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jhet.5570300641 (accessed 2024-05-21).

- (161) Wilson, B.; Fernández, M.-J.; Lorente, A.; Grant, K. B. Synthesis and DNA Interactions of a Bis-Phenothiazinium Photosensitizer. *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6 (21), 4026–4035. https://doi.org/10.1039/B810015B.
- (162) Felgenträger, A.; Maisch, T.; Dobler, D.; Späth, A. Hydrogen Bond Acceptors and Additional Cationic Charges in Methylene Blue Derivatives: Photophysics and Antimicrobial Efficiency. *BioMed Res. Int.* 2013, 2013, 482167. https://doi.org/10.1155/2013/482167.
- (163) Gollmer, A.; Felgenträger, A.; Bäumler, W.; Maisch, T.; Späth, A. A Novel Set of Symmetric Methylene Blue Derivatives Exhibits Effective Bacteria Photokilling – a Structure–Response Study. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015, 14 (2), 335–351. https://doi.org/10.1039/C4PP00309H.
- (164) Riss, P. J.; Rösch, F. A Convenient Chemo-Enzymatic Synthesis and 18F-Labelling of Both Enantiomers of Trans-1-Toluenesulfonyloxymethyl-2-Fluoromethyl-Cyclopropane. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (24), 4567–4574. https://doi.org/10.1039/B812777H.
- (165) Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjug. Chem.* 2015, 26 (1), 1– 18. https://doi.org/10.1021/bc500475e.
- (166) Banister, S.; Roeda, D.; Dollé, F.; Kassiou, M. Fluorine-18 Chemistry for PET: A Concise Introduction. *Curr. Radiopharm.* **2010**, *3*, 68–80. https://doi.org/10.2174/1874471011003020068.
- (167) Halder, R.; Ritter, T. 18F-Fluorination: Challenge and Opportunity for Organic Chemists. J. Org. Chem. 2021, 86 (20), 13873–13884. https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c01474.
- (168) Lee, E.; Kamlet, A. S.; Powers, D. C.; Neumann, C. N.; Boursalian, G. B.; Furuya, T.; Choi, D. C.; Hooker, J. M.; Ritter, T. A Fluoride-Derived Electrophilic Late-Stage Fluorination Reagent for PET Imaging. *Science* **2011**, *334* (6056), 639–642. https://doi.org/10.1126/science.1212625.
- (169) Kim, D. W.; Jeong, H.-J.; Lim, S. T.; Sohn, M.-H.; Katzenellenbogen, J. A.; Chi, D. Y. Facile Nucleophilic Fluorination Reactions Using Tert-Alcohols as a Reaction Medium: Significantly Enhanced Reactivity of Alkali Metal Fluorides and Improved Selectivity. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 957–962. https://doi.org/10.1021/jo7021229.
- (170) Yu, S. Review of 18F-FDG Synthesis and Quality Control. *Biomed. Imaging Interv. J.* **2006**, 2 (4), e57. https://doi.org/10.2349/biij.2.4.e57.
- (171) McBride, W. J.; Sharkey, R. M.; Karacay, H.; D'Souza, C. A.; Rossi, E. A.; Laverman, P.; Chang, C.-H.; Boerman, O. C.; Goldenberg, D. M. A Novel Method of 18F Radiolabeling for PET. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (6), 991–998. https://doi.org/10.2967/jnumed.108.060418.
- (172) Giglio, J.; Zeni, M.; Šavio, E.; Engler, H. Synthesis of an Al18F Radiofluorinated GLU-UREA-LYS(AHX)-HBED-CC PSMA Ligand in an Automated Synthesis Platform. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 2018, 3 (1), 4. https://doi.org/10.1186/s41181-018-0039-y.
- (173) McBride, W. J.; D'Souza, C. A.; Sharkey, R. M.; Goldenberg, D. M. The Radiolabeling of Proteins by the [18F]AIF Method. *Appl. Radiat. Isot. Data*

Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med. **2012**, *70* (1), 200–204. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.08.013.

- (174) Blom, E.; Karimi, F.; Eriksson, O.; Hall, H.; Långström, B. Synthesis and in Vitro Evaluation of 18F-β-Carboline Alkaloids as PET Ligands. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2008**, *51* (6), 277–282. https://doi.org/10.1002/jlcr.1519.
- (175) Mohler, D. L.; Shen, G. The Synthesis of Tethered Ligand Dimers for PPARγ–RXR Protein Heterodimers. Org. Biomol. Chem. 2006, 4 (11), 2082– 2087. https://doi.org/10.1039/B600848H.
- (176) Radaram, B.; Pisaneschi, F.; Rao, Y.; Yang, P.; Piwnica-Worms, D.; Alauddin, M. M. Novel Derivatives of Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors: Synthesis, Radiolabeling, and Preliminary Biological Studies of Fluoroethyl Analogues of Crizotinib, Alectinib, and Ceritinib. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111571. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111571.
- (177) Mohler, D. L.; Shen, G. The Synthesis of Tethered Ligand Dimers for PPARγ–RXR Protein Heterodimers. *Org. Biomol. Chem.* 2006, *4* (11), 2082– 2087. https://doi.org/10.1039/B600848H.
- (178) Cumming, P.; Skaper, D.; Kuwert, T.; Maschauer, S.; Prante, O. Detection of Monoamine Oxidase a in Brain of Living Rats with [18F]Fluoroethyl-Harmol PET. *Synap. N. Y. N* **2015**, *69* (1), 57–59. https://doi.org/10.1002/syn.21785.
- (179) Agency, I. A. E. Guidance for Preclinical Studies with Radiopharmaceuticals; Text; International Atomic Energy Agency, 2023; pp 1– 129. https://www.iaea.org/publications/14818/guidance-for-preclinical-studieswith-radiopharmaceuticals (accessed 2024-05-02).
- (180) Patel, S.; Gibson, R. In Vivo Site-Directed Radiotracers: A Mini-Review. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (8), 805–815. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2008.10.002.
- (181) Hume, S. P.; Gunn, R. N.; Jones, T. Pharmacological Constraints Associated with Positron Emission Tomographic Scanning of Small Laboratory Animals. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, 25 (2), 173–176. https://doi.org/10.1007/s002590050211.
- (182) Kagadis, G. C.; Loudos, G.; Katsanos, K.; Langer, S. G.; Nikiforidis, G. C. In Vivo Small Animal Imaging: Current Status and Future Prospects. *Med. Phys.* 2010, 37 (12), 6421–6442. https://doi.org/10.1118/1.3515456.
- (183) Myers, R.; Hume, S. Small Animal PET. Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol. 2002, 12 (6), 545–555. https://doi.org/10.1016/s0924-977x(02)00103-7.
- (184) Kaur, G.; Dufour, J. M. Cell Lines. *Spermatogenesis* **2012**, *2* (1), 1–5. https://doi.org/10.4161/spmg.19885.
- (185) Jung, J. Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development. *Toxicol. Res.* **2014**, *30* (1), 1–5. https://doi.org/10.5487/TR.2014.30.1.001.
- (186) Fowler, J. S.; Volkow, N. D.; Wang, G.-J.; Pappas, N.; Logan, J.; Shea, C.; Alexoff, D.; MacGregor, R. R.; Schlyer, D. J.; Zezulkova, I.; Wolf, A. P. Brain Monoamine Oxidase A Inhibition in Cigarette Smokers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (24), 14065–14069. https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14065.
- (187) Zheng, Q.-H.; Gardner, T. A.; Raikwar, S.; Kao, C.; Stone, K. L.; Martinez, T. D.; Mock, B. H.; Fei, X.; Wang, J.-Q.; Hutchins, G. D. [11C]Choline as a PET

Biomarker for Assessment of Prostate Cancer Tumor Models. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (11), 2887–2893. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.051.

- (188) Fiedorowicz, J. G.; Swartz, K. L. The Role of Monoamine Oxidase Inhibitors in Current Psychiatric Practice. *J. Psychiatr. Pract.* **2004**, *10* (4), 239–248.
- (189) Edwards, D.; Hall, T. R.; Brown, J. A. The Characteristics and Distribution of Monoamine Oxidase (MAO) Activity in Different Tissues of the Rainbow Trout, Salmo Gairdneri. *Comp. Biochem. Physiol. C* **1986**, *84* (1), 73–77. https://doi.org/10.1016/0742-8413(86)90167-2.
- (190) Piron, S.; Verhoeven, J.; Descamps, B.; Kersemans, K.; De Man, K.; Van Laeken, N.; Pieters, L.; Vral, A.; Vanhove, C.; De Vos, F. Intra-Individual Dynamic Comparison of 18F-PSMA-11 and 68Ga-PSMA-11 in LNCaP Xenograft Bearing Mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-78273-7.
- (191) Ginovart, N.; Meyer, J. H.; Boovariwala, A.; Hussey, D.; Rabiner, E. A.; Houle, S.; Wilson, A. A. Positron Emission Tomography Quantification of [¹¹ C]-Harmine Binding to Monoamine Oxidase-A in the Human Brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2006**, *26* (3), 330–344. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600197.