



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS CLÁSSICAS E MODIFICADAS
PARA ESTUDOS DE POTENCIAL GENOTÓXICO DE PEPTÍDEOS
UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE RADIOFÁRMACOS**

IVETTE ZEGARRA OCAMPO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de Grau de Mestre em ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:

Dr. Daniel Perez Vieira

SÃO PAULO

2016

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS CLÁSSICAS E MODIFICADAS
PARA ESTUDOS DE POTENCIAL GENOTÓXICO DE PEPTÍDEOS
UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE RADIOFÁRMACOS**

IVETTE ZEGARRA OCAMPO

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção de Grau
de Mestre em ciências na Área de
Tecnologia Nuclear- Aplicações.**

Orientador:

Dr. Daniel Perez Vieira

SÃO PAULO

2016

A minha família

A minha filha Keyla V. Arbañil Zegarra, minha inspiração e força. Ao meu esposo José D. Arbañil Vela, meu amigo, companheiro e apoio incondicional.

Aos meus pais Graciela Mendoza e Juan G. Zegarra, porque sempre acreditaram em mim e sempre incentivaram meu sucesso, embora estejam distantes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Daniel Perez Vieira pela oportunidade, paciência, orientação e o incentivo durante esses anos de trabalho.

À Dra. Kayo Okazaki pelos conselhos e a grande colaboração.

Ao Dr. Luis Alberto Pereira Dias do centro de Radiofarmácia.

Ao Laboratório Biosintesis Ltda., em especial à Dra. Fabiana Medeiros da Silva e à MSc. Tatiana F. da Cunha pela parceria inestimável no desenvolvimento do projeto.

A todo o Centro de Biotecnologia, pela ajuda prestada dentro e fora da rotina do laboratório.

Aos meus amigos: Neide Mascarenhas, Marta Mascarenhas, Kleicy Cavalcante, Mira de Souza, Letícia Bonfim, Amanda Pinheiro, Tábata Alarcon, Mercedes Torrente, Eliana Lima, Eliza Higuti, Dra. Renata Damiani, Dra. Flávia Valgode, Rosangela Roberta, Natalia Mencacci, Priscila Passos, Camila Ayala pela amizade, alegrias, carinho e ajuda nos momentos difíceis, que sempre lembrarei.

Ao Instituto de Pesquisa de Energias e Nucleares (IPEN) pelo espaço outorgado para a realização do trabalho e a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

Ivette Zegarra Ocampo

***No es grato morir, señor,
si en la vida nada se deja
y en la muerte nada es posible,
si no lo que se pudo dejar en vida.***

(Cesar Vallejo)

COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS CLÁSSICAS E MODIFICADAS PARA ESTUDOS DE POTENCIAL GENOTÓXICO DE PEPTÍDEOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE RADIOFÁRMACOS

Ivette Zegarra Ocampo

RESUMO

O teste de frequência de micronúcleos (FMN) *in vitro* é uma das metodologias de escolha no desenvolvimento de testes de segurança toxicológica. Para o seu desenvolvimento no trabalho foram realizadas modificações da técnica convencional, relativas ao substrato de cultivo das células e à sua coloração. As culturas celulares foram desenvolvidas diretamente nas lâminas e a coloração foi realizada com laranja de acridina (AO) ao invés da coloração segundo Giemsa. Foram utilizados controles positivos com potenciais clastogênico (mitomicina C, benzo[a]pireno) e aneugênico (colchicina), recomendados pela OCDE (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico). Como moléculas-teste, foram utilizados compostos cuja associação a isótopos radioativos compõem radiofármacos produzidos pelo IPEN. DOTATATO e Ubiquidina foram testados em diferentes concentrações proporcionais às concentrações máximas utilizadas em pacientes adultos. Para tanto, foram realizadas diluições correspondentes às concentrações 0,1X, 1X e 10X e culturas de células CHO-K1 foram expostas a estas concentrações para ensaios de citotoxicidade e FMN. Nenhuma das concentrações induziu citotoxicidade significativa. Para análise de FMN, foram contabilizadas todas as células mononucleadas e multinucleadas até atingir a contagem de 1000 células binucleadas, com ou sem micronúcleos. Desta maneira foi possível analisar a frequência de micronúcleos e o índice de proliferação (CBPI). As concentrações dos fármacos em teste (0,1X, 1X e 10X) não induziram agressão às células. Nenhuma das concentrações revelou citotoxicidade ou genotoxicidade, ou ainda qualquer alteração no ciclo celular em comparação aos controles, comprovando sua segurança conforme os parâmetros exigidos pelas normas internacionais. Os resultados mostraram também uma boa concordância entre a comparação das leituras realizadas por analistas independentes, com pequenas discrepâncias discutíveis, e boa correlação com resultados obtidos com a coloração convencional. Desta maneira as modificações realizadas na técnica de FMN mostraram potencial para cumprir todos os quesitos como teste pré-clínico.

Palavras-chave: micronúcleos; laranja de acridina; DOTATATO; Ubiquidina; OCDE

**COMPARISON AND VALIDATION OF CLASSICAL AND MODIFIED TECHNIQUES
FOR STUDIES OF GENOTOXIC POTENTIAL OF PEPTIDES USED IN
RADIOPHARMACEUTICALS PRODUCTION**

Ivette Zegarra Ocampo

ABSTRACT

The *in vitro* micronucleus frequency test (FMN) is one method of choice in the development of toxicological safety tests. For its development, this work carried out modifications of the conventional technique regarding the cultivation substrate of the cells and staining for microscopy evaluation. The cell cultures were grown directly on slides, and staining was performed with acridine orange (AO) instead of the classical Giemsa staining. Positive controls were used for potential clastogenic (mitomycin C, benzo [a] pyrene) and aneugenic (colchicine) effects, recommended by the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). As test molecules, compounds were used whose association with radioactive isotopes make up radiopharmaceuticals produced by IPEN. DOTATATE and Ubiquidine were tested at different concentrations proportional to the maximum concentrations used in adult patients. Therefore, corresponding to the concentrations dilutions were performed 0.1X, 1X and 10X cultures and CHO-K1 cells were exposed to these concentrations for cytotoxicity assays and FMN. None of the concentrations induced significant cytotoxicity. For FMN analysis, it was recorded every mononuclear cells and multinucleated up to 1000 counts binucleated cells with or without micronuclei. In this way it was possible to analyze the frequency of micronuclei and the proliferation index (CBPI). The concentrations of the test drug (0.1X, 1X and 10X) did not induce aggression to cells. None of the concentrations showed cytotoxicity and genotoxicity, or any changes in cell cycle compared to controls, demonstrating their safety according to the parameters required by international standards. The results also showed good agreement between the comparison of readings by independent analysts, with minor discrepancies debatable, and good correlation comparing to classical staining technique. Thus the changes made in FMN technique showed potential to fulfill all requirements as preclinical test.

Keywords: micronuclei; acridine orange; DOTATATE; Ubiquidine; OECD

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Radiofármacos	13
2.2 DOTA-Tyr ³ -octeotrato (DOTATATO)	13
2.3 Ubiquidina ₂₉₋₄₁ (UBI ₂₉₋₄₁).....	15
2.4 Teste de citotoxicidade	16
2.5 Ensaio do micronúcleo	17
3 OBJETIVO	21
4 METODOLOGIA E MATERIAL.....	22
4.1 Cultivos celulares	22
4.2 Teste de citotoxicidade	22
4.3 Concentrações de Ubiquidina ₂₉₋₄₁ e DOTATATO para genotoxicidade	24
4.4 Controles positivos de genotoxicidade (colchicina, mitomicina C e benzo[a]pireno)	24
4.5 Controle negativo (NaCl, 0,9%)	24
4.6 Testes de micronúcleo seguindo metodologia padrão (Giemsa).....	24
4.7 Testes do micronúcleo seguindo técnica modificada (laranja de acridina) ...	26
4.8 Coloração e leitura das lamínulas no microscópio	26
4.9 Cálculos e estatística.....	27
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Viabilidade celular após exposição à Ubiquidina ₂₉₋₄₁ ou DOTATATO.....	29
5.2 Teste de micronúcleo tradicional - Coloração com Giemsa de culturas tratadas com DOTATATO	30
5.3 Testes de micronúcleo tradicional - Coloração com Giemsa de culturas tratadas com Ubiquidina ₂₉₋₄₁	31
5.4 Teste de micronúcleo modificado: Coloração com laranja de acridina.....	32
5.5 Índice de proliferação (CBPI) de culturas tratadas com DOTATATO: Coloração com laranja de acridina	42

5.6	Porcentagem de frequência de células binucleadas com micronúcleos de culturas tratadas com DOTATATO : Coloração com laranja de acridina.....	43
5.7	Índice de proliferação (CBPI) de culturas tratadas com Ubiquidina ₂₉₋₄₁ : Coloração com laranja de acridina	44
5.8	Porcentagem de frequência de células binucleadas com micronúcleos de culturas tratadas com Ubiquidina ₂₉₋₄₁ : Coloração com laranja de acridina.	45
5.9	Comparações dos valores de CBPI de culturas tratadas com Ubiquidina ₂₉₋₄₁ e analisadas por dois analistas independentes.	46
5.10	Comparações das FMN de culturas tratadas com Ubiquidina ₂₉₋₄₁ e analisadas por dois analistas independentes.....	47
5.11	Comparação entre índices de proliferação celular das culturas celulares coradas com Giemsa ou laranja de acridina	48
5.12	Comparação das porcentagens de células binucleadas com micronúcleo das culturas celulares coradas com Giemsa ou laranja de acridina	49
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	58
	APÊNDICE A:	59
	Artigo completo em anal de evento – INAC 2015.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AIEA** - *International Atomic Energy Agency*- Agencia International de Energia Atômica
- AO** - *Acridine Orange*- laranja de acridina
- ANVISA** - Agência Nacional De Vigilância Sanitária
- % BNCMN** - Porcentagem de células binucleadas
- BZP** - Benzo[α]pireno
- BPL** - Princípios das Boas Práticas de Laboratório
- CC** - Controle de Células
- CBPI** - *Cytokinesis-block proliferation index*- índice de proliferação por bloqueio da citocinese
- CB** - Células Binucleadas
- COLCH** - Colchicina
- CNEN** - Comissão Nacional De Energia Nuclear
- CV** - Controle de Veículo
- DOTATATO** - DOTA-Tyr³-octeotrato
- EMEA** - *European Medicines Agency*
- % FMN** - porcentagem da Frequência de micronúcleos
- FDA** - *Food and Drug Administration*,
- INCA** - Instituto Nacional De Câncer
- KeV** - kilo elétron-volt
- MTMC** - Mitomicina C
- MN** - Micronúcleo
- NaCl** – Cloreto de sódio
- OECD** - *Organisation for Economic Co-Operation and Development*
- PET** - *Positron Emitting Tomography*- Tomografia por Emissão de pósitrons
- PBS** - *Phosphate buffered* - solução salina-fosfato tamponada
- SST** - Somatostatina
- SSR 2** - Receptores de somatostatina 2
- SSR 5** - Receptores de somatostatina 5
- UBI₂₉₋₄₁** - Ubiquidina₂₉₋₄₁

1. INTRODUÇÃO

As maiores taxas de incidência de câncer segundo o Instituto Nacional de Câncer são encontradas nos países desenvolvidos (INCA, 2016), sendo os mais comuns no mundo, câncer de pulmão, câncer de mama feminina, câncer de cólon/reto e estômago. No Brasil, as estimativas para o ano de 2016 apontam a ocorrência de quase 600 mil casos novos de câncer. Os principais tipos de cânceres que ocorrerão no País por maior incidência, com exceção de pele não melanoma, serão os de próstata, pulmão e cólon/reto (homens) e mama, cólon/reto e colo de útero (mulheres) (INCA, 2016).

Existem 276 hospitais habilitados no Brasil para o tratamento de cânceres. Todos os estados brasileiros têm ao menos um hospital habilitado em oncologia, onde os pacientes de câncer podem encontrar tratamentos e diagnósticos através da aplicação de radiofármacos. Para o diagnóstico dos cânceres são utilizados radiofármacos que após administração nos pacientes, possibilitam sua avaliação por diversas técnicas, como Cintilografia ou Tomografia por Emissão de pósitrons (*Positron Emitting Tomography* – PET) (INCA, 2016). A PET tem uma capacidade única para avaliar os processos funcionais e bioquímicos dos tecidos do corpo, que são alterados nos primeiros estágios de praticamente todas as doenças (ZHU et al., 2011). A técnica explora a desintegração física de pósitrons, após a injeção em um paciente com um traçador emissor de pósitrons, associado a uma molécula de interesse. Cada pósitron emitido é aniquilado por aproximação a um elétron, até alguns milímetros de distância do ponto de emissão, formando um positrônio, sendo imediatamente aniquilado, produzindo dois fótons de igual energia. Este par de fótons produzidos pela aniquilação viajam em sentidos opostos até atingir anéis detectores ao redor do corpo do paciente (BREEMAN et al. 2011, MOJTAHEDI et al. 2014). Os fótons gama produzidos pelo decaimento radioativo são detectados e estes dados recolhidos são construídos em imagem pelo equipamento, gerando uma imagem que será analisada pelos médicos (PRICE e GREEN, 2011).

A principal unidade da CNEN produtora de radiofármacos é o IPEN, localizado em São Paulo, que produz atualmente 38 diferentes radiofármacos, além de ser o único produtor de Geradores de Tecnécio-99m no país (CNEN, 2015). A estimativa de câncer mostra crescimento da quantidade de pacientes, o que provocará uma demanda de tratamentos e procedimentos de diagnósticos para estas doenças, utilizando assim grandes quantidades de radiofármacos. Por este motivo é de interesse que estes estejam validados no que se refere à sua eficácia e segurança de uso, e adequados às normas de boas práticas de experimentação vigente. Os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) compõem um sistema de qualidade que abrange processos de organização e condições nas quais estudos não clínicos de segurança à saúde humana e ao meio ambiente são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados (INMETRO, 2015). Constituem-se em testes geralmente exigidos por órgãos reguladores como são as normativas do FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) e EMEA (*European Medicines Agency*, UE), órgãos que sugerem conjunto de regras e práticas para fins de avaliação e do registro de produtos. Diversos radiofármacos vem sendo desenvolvidos sob a tutela desta regulamentação, com destaque aos peptídeos DOTATATO e Ubiquidina, com grandes aplicações no diagnóstico e tratamento de tumores e focos sépticos, respectivamente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radiofármacos

De acordo com a RDC nº 63, da ANVISA, Radiofármacos são todas as preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos. Compreendem também os componentes não radioativos para marcação e os radionuclídeos, incluindo os componentes extraídos dos seus geradores (ANVISA, 2009). Portanto, radiofármacos podem ser utilizados para diagnóstico e tratamento de diferentes tipos de cânceres (CNEN, 2014). O diagnóstico é essencial para a identificação da origem, detecção, discriminação de áreas específicas do corpo atingidas ou não por um tumor e diagnóstico de um câncer isolado ou uma metástase (ZHU et al., 2011; MCKINLEY et al., 2013). As técnicas não invasivas de diagnóstico por imagem, como a Cintilografia e a Tomografia por Emissão de Póstron (PET) são técnicas que podem ser utilizadas para tais diagnósticos, funcionando como traçadores de proliferação celular não invasivos para composição de imagens, que são a grande promessa para a quantificação de resposta à medicina personalizada em oncologia, sendo uma abordagem emergente para avaliar a proliferação do tumor (MCKINLEY et al., 2013). Estes métodos têm a vantagem de identificar modificações funcionais associadas a mecanismos celulares pelos quais o câncer se desenvolve. Os radiofármacos tem grande importância no diagnóstico do câncer, pois são relativamente específicos e podem ser empregados tanto no diagnóstico quanto no tratamento de neoplasias (BREMAN et al., 2011). Entre os radiofármacos utilizados para diagnóstico e usados no estudo temos DOTATATO e Ubiquidina₂₉₋₄₁.

2.2 DOTA-Tyr³-octeotrato (DOTATATO)

DOTA-Tyr³-octeotrato (DOTATATO) é um peptídeo associado a um quelante (DOTA) análogo aos receptores de somatostatina (sst) (CESCATO et al., 2005). A somatostatina é um peptídeo que pode ser constituído de 14 ou 28 aminoácidos. Há cinco subtipos de receptores de somatostatina humana: SSTR-

1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4 e SSTR-5. (VELIKYAN et al., 2014). Esses subtipos pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G que, juntos, têm vários efeitos sistêmicos intracelulares. A somatostatina pode ser considerada um neurotransmissor, um neuro-hormônio ou um hormônio que atua através de mecanismos locais autócrinos ou parácrinos (KAYANI. et al., 2008; VELIKYAN et al., 2014). Os receptores tumorais se ligam com alta afinidade a análogos de peptídeos e não a um receptor mediador de ações fisiológicas ou patofisiológicas do peptídeo (BREEMAN et al., 2011; MOJTAHEDI et al., 2014). Os subtipos de receptores de somatostatina 2 (SSR 2) e 5 (SSR 5) são expressos em quantidades elevadas em células que possuem um perfil tumoral neuroendócrino (MEARADJI et al., 2002). Os receptores de somatostatina possuem a capacidade de formar um complexo ligante-receptor pelo qual é permitida a internalização e acumulação do peptídeo radiofármaco, sendo assim um procedimento de diagnóstico e tratamento radio metabólico. (BALDELLI et al, 2014).

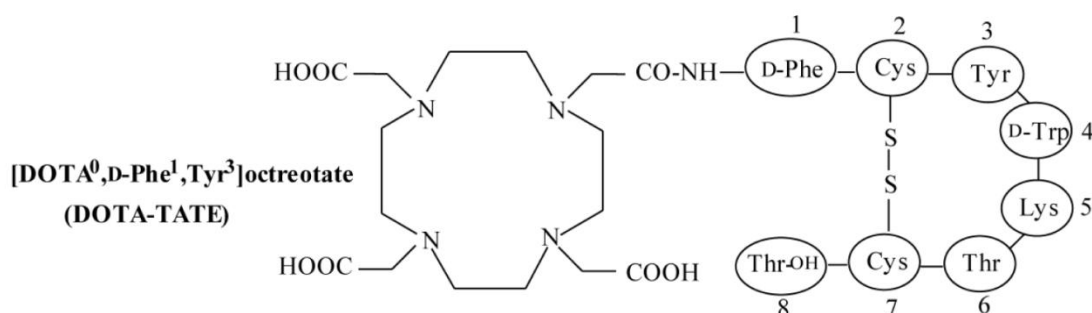


Figura 1: Estruturas de análogo de somatostatina DOTA-acoplado. Fonte: FANI et al., 2012. Adaptado por Ocampo, 2016.

O DOTATATO pode ser radio marcado com radionuclídeos emissores de pósitrons como o isótopo 68 do Gálio (⁶⁸Ga), com potencial aplicação para diagnóstico por PET de tumores neuroendócrinos gastro-entero-pancreático metastáticos. O ⁶⁸Ga tem sido de grande utilidade devido às suas características radio físicas: possui um tempo de meia-vida radioativa de 67 minutos e se combina com a farmacocinética de muitos peptídeos análogos à somatostatina (OCAK et al., 2010; NAGAMATI, 2006).

2.3 Ubiquidina₂₉₋₄₁ (UBI₂₉₋₄₁)

Os peptídeos antimicrobianos têm uma ampla distribuição em todo o reino animal e vegetal. A sua expressão é induzida após o contato com microrganismos ou produtos microbianos, como lipopolissacarídeos ou citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-1 (IL-1), e contribuem para a resistência inata a infecções. (SIGNORE et al., 2008).

A Ubiquidina₂₉₋₄₁ (UBI₂₉₋₄₁) é um peptídeo catiônico sintético com atividade antimicrobiana (massa molecular: 1,69 kDa). É composta pela seguinte sequência de aminoácidos: Thr-Gly-Arg-Ala-Lys-Arg-Arg-Met-Gln-Tyr-Asn-Arg-Arg, possuindo 6 resíduos carregados positivamente (5 Arg e 1 Lys) (FERRO-FLORES et al. 2003; SIGNORE et al., 2008). A UBI₂₉₋₄₁ possui afinidade por paredes celulares de microrganismos e seu mecanismo de ação é baseado na interação dos domínios catiônicos carregados de peptídeos com a superfície carregada negativamente da parede externa da bactéria. (FERRO-FLORES et al. 2003 AKHTAR et al., 2005; BROUWER, et al., 2008). Interações dos peptídeos catiônicos com envolturas bacterianas envolvem a inserção do peptídeo em membranas microbianas (RAHNAMAEIAN, 2011).

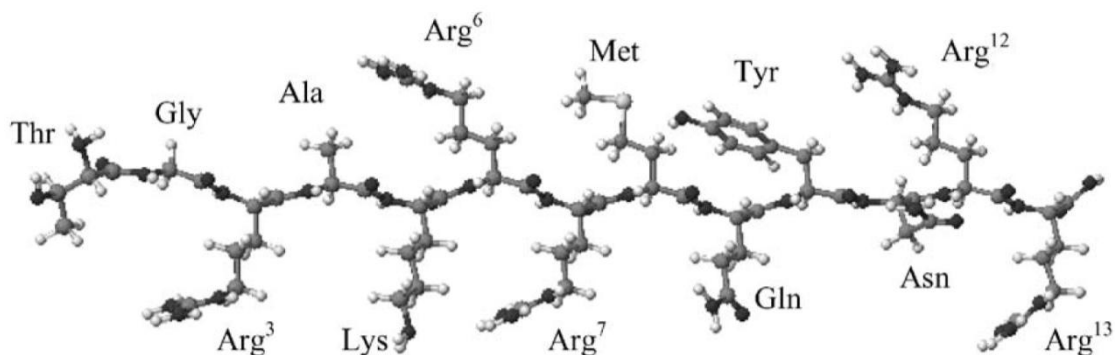


Figura 2: Estrutura molecular de UBI₂₉₋₄₁, calculada pela mecânica molecular. Fonte: FERRO-FLORES et al., 2005. Adaptado por Ocampo, 2016.

Peptídeos antimicrobianos produzidos por células humanas foram investigados como carreadores de isótopos de interesse radio farmacológico para imagem e considerados agentes cintilográficos promissores, uma vez que discriminam entre infecções e processos inflamatórios estéreis (LUPPETI et al. 2003, SIGNORE et al., 2008). A UBI₂₉₋₄₁ pode ser marcada pelo método direto

(sem o intermédio de moléculas quelantes) com o radioisótopo ^{99m}Tc , que é um emissor gama com uma energia de aproximadamente 140 KeV (kilo elétron-volt) e possui uma meia-vida radioativa relativamente curta (6,02 horas). Esta formulação tem mostrado resultados relativamente animadores em diferentes estudos com adequada pureza e estabilidade (BROUWER et al. 2008; AKHTAR et al.,2005; FERRO-FLORES et al., 2005). Este radiofármaco mostrou uma rápida visualização de infecções com bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, com alta precisão em fungos *in vitro* e acúmulo no local da infecção em animais experimentais (LUPPETI et al. 2003; BEIKI et al., 2013), atestando uma de suas principais características positivas, a de poder diferenciar focos inflamatórios sépticos de regiões de inflamação asséptica, ajudando na escolha do tratamento de pacientes acometidos por diversas infecções. (LUPETTI et al., 2011). A $^{99m}\text{Tc-UBI}_{29-41}$ também tem sido utilizada em estudos de biodistribuição e *clearance* de radiofármacos (SIGNORE et al., 2008). Uma das principais aplicações de radiofármaco capaz de diferenciar infecção de inflamação asséptica é a utilização no diagnóstico de infecções em próteses ósseas e articulares (AKHTAR et al.,2005). Para imagiologia rápida com alta precisão, $^{99m}\text{Tc-UBI}_{29-41}$ tem sido indicada como uma escolha adequada para a detecção da osteomielite (ASSADI et al.,2011). Outra aplicação não oncológica promissora é na diferenciação de infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos em casos particulares de pós-quimioterapia e transplante. É indicada também para detecção de processos infecciosos em pacientes acometidos por diabetes, sendo a biópsia um processo de alto risco, nesses casos (KUMAR, 2005). Este marcador foi também utilizado para a detecção de infecções por *Staphylococcus aureus* em camundongos e *Klebsiella pneumoniae* em coelhos (AKHTAR et al. ,2012).

2.4 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade *in vitro* é realizado para avaliar o potencial tóxico da exposição de células a uma determinada substância. O efeito tóxico resultante pode ou não interferir de maneira vital nas células, atingindo seu desenvolvimento (OECD/GD 129, 2010). Estes efeitos podem envolver a integridade da membrana citoplasmática, do citoesqueleto e alterações no metabolismo. Isto pode ter como consequência a morte celular, necrose;

apoptose; autofagia; citostase e cornificação que corresponde às células diferenciadas terminalmente (MURAKAMI et al., 2006, KROEMER et al. 2009). Os ensaios de toxicidade *in vivo* e citotoxicidade *in vitro* são realizados utilizando matérias-primas, substâncias-teste em desenvolvimento e produtos finalizados para uso. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade são considerados de grande importância por serem sensíveis, reprodutíveis, fáceis de gerenciar e envolverem menor custo (PINTO et al. 2003; ESTEVES-PEDRO,2013).

Para poder avaliar a viabilidade celular é realizado o ensaio citotóxico das células por metodologia colorimétrica utilizando MTS (tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium) e PMS (metossulfeto de ferazina). Estes compostos são absorvidos pelas células vivas, que convertem MTS na presença do PMS em novo produto, formazan, mediante a atividade da cadeia aceptora de elétrons presente nas cristas mitocondriais. A quantidade de formazan gerado pela atividade mitocondrial é determinada pela leitura da absorvância por espectrofotometria, e é proporcional ao número de células viáveis em cultura celular. (MURAKAMI et al., 2006).

2.5 Ensaio do micronúcleo

O teste de frequência de micronúcleos *in vitro* é uma das metodologias de escolha no desenvolvimento de testes de segurança toxicológica (ICH, 1995). Sua realização baseia-se na quantificação de quebras duplas não reparadas no DNA de células expostas em cultura a diversas concentrações de substâncias teste, ou a quantidades incrementais de agentes agressores diversos (FENECH, 2007). Em células interfásicas, o produto de quebras do DNA apresenta-se sob a forma de micronúcleos, que são aglomerados de DNA, com picnose similar à do núcleo principal e com 5 a 30% de seu tamanho. O aumento da proporção de células que apresentam micronúcleos, bem como a sua quantidade no citoplasma das células analisadas, são indicativos de dano genotóxico. Após análise, tal aumento pode relacionar a concentração utilizada da substância-teste ao potencial genotóxico da mesma (HEDDLE et al., 2011; CELIK et al., 2005)

Nesta técnica podem-se observar células binucleadas, que exibem dois núcleos principais, formadas pelo bloqueio da citocinese (CBMN) através da utilização de um composto de origem fúngica (citocalasina B), que possui a

capacidade de inibir a citocinese sem inibir a cariocinese. Caso as culturas expostas tenham passado por agressão genotóxica, evento que produz quebra irreparada no DNA, as células apresentarão um fragmento de cromatina densa, com coloração e aspecto semelhantes aos dos núcleos principais, denominado micronúcleo (FENECH, 2007; NERSESYAN et al., 2006). Estes micronúcleos podem ser originários de fragmentos acêntricos ou/de cromossomos inteiros que são incapazes de migrar com o resto dos cromossomos durante a anáfase de divisão celular. Através desta técnica pode-se também avaliar a atividade tanto clastogênica e aneugênica em células expostas ao agente tóxico (OECD, 2010).

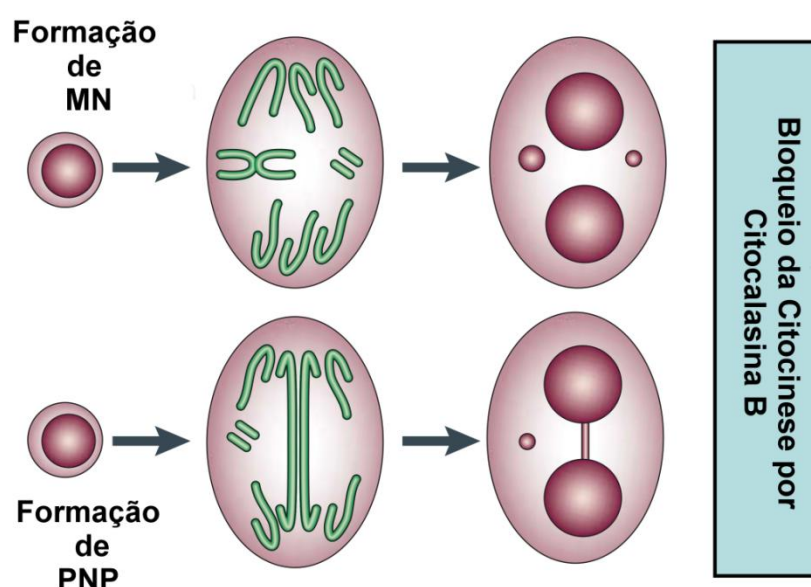


Figura 3: Formação de micronúcleos (MN) a partir de cromossomos inteiros ou acêntricos e formação de pontes nucleoplasmáticas (PNP). Fonte: FENECH, 2007. Adaptado por Ocampo, 2016.

Controles positivos com potenciais clastogênico e aneugênico são utilizados para este teste, recomendado pela *Organisation for Economic Co-Operation and Development* (OECD, 2010). Dentre os controles positivos, destacam-se os agentes clastogênicos e aneugênicos tais como, a radiação ionizante emitida por Cobalto-60 e as substâncias químicas como a colchicina, mitomicina C e o benzo[α]pireno. (OECD 487; 2010)

A colchicina (aneugênico) possui a característica de inibir a formação dos polos do fuso durante a metáfase da mitose, enquanto a mitomicina C (clastogênico) é um antibiótico e anti-metabólico que inibe a síntese do DNA. O

benzo[a]pireno é um agente alquilante que possui potencial clastogênico e provoca diminuição da proliferação celular nas fases S e G2 da interfase e o aumento na expressão do gene p53 em células tumorais ou metabolicamente competentes ativadas pelo reagente S9. (SADIKOVIC, 2006; ESTEVES-PEDRO, 2013) O S9 é um cofator pós-mitocondrial obtido a partir de fígados de roedores, que foram tratados com substâncias de indução enzimática, encarregado por reproduzir o metabolismo de primeira passagem no fígado (OECD 487; 2010).

Para o desenvolvimento da técnica do micronúcleo no trabalho foram realizadas modificações da técnica convencional do micronúcleo no que se refere ao substrato de cultivo das células e à sua coloração. As culturas celulares foram desenvolvidas diretamente nas lâminas e a coloração foi realizada com laranja de acridina (AO) ao invés da coloração convencional segundo May Grünwald-Giemsa. Tais modificações já foram devidamente padronizadas e estão em utilização com sucesso tanto pelo grupo do Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro de Biotecnologia – IPEN quanto pela equipe técnica do Laboratório Biosintesis LTDA, empresa incubada pelo CIETEC (Centro de Inovação, Empreendedorismo e Tecnologia – USP) e associada ao CB (Centro de Biotecnologia) e à DIRF (Diretoria de Radiofarmácia – IPEN/CNEN-SP).

Laranja de acridina (3,6-(dimethylamino)) é um corante amarelo com capacidades fluorescentes, e que liga-se aos ácidos nucleicos independentemente da composição ou tipo de ligante. Pode-se ligar ao DNA e RNA intracelular em diferentes formas para produzir fluorescência de cores diferentes (ÇAVAS, 2007). Quando excitado, o DNA fluoresce por emissão de fótons com comprimento de onda de aproximadamente 530 nm, emitindo a cor verde e o RNA fluoresce com emissão acima de 630 nm emitindo a cor vermelha. Estudos realizados com este corante o colocam como um diferenciador de células de carcinoma da bexiga com base na mudança da cor de fluorescência e pela morfologia das células (LI et al., 2014).

Potenciais efeitos genotóxicos e citotóxicos dos peptídeos e foram avaliados pelas metodologias de ensaios citadas acima da mesma forma e comparadas às duas técnicas de micronúcleo utilizadas, a convencional realização através da coloração por Giemsa e a modificada através do cultivo nas

lâminas e a coloração com AO. Há a necessidade de uma proposta de modificações na técnica que sejam capazes de reduzir ou ao menos mitigar os fatores de confusão que podem ser observados em experimentos que seguem a técnica tradicional. O estudo propõe o cultivo de células diretamente em lamínulas como sistema-teste, como forma de reduzir o espalhamento dos eventos pelas lâminas, e a coloração por AO como forma de reduzir falhas de identificação de artefatos e dejetos em detrimento dos micronúcleos.

3 OBJETIVO

Geral

Propor aprimoramentos na metodologia de ensaio de genotoxicidade por frequência de micronúcleos para aumentar a rapidez de análise e confiabilidade dos resultados.

Específicos

- Avaliar a reprodutibilidade da técnica com modificações, confrontando resultados obtidos por dois analistas independentes.

- Testar o potencial genotóxico de dois componentes de radiofármacos produzidos no IPEN pela metodologia modificada, e confrontar os resultados obtidos com aqueles observados após a realização dos ensaios pela metodologia convencional (AIEA).

4 METODOLOGIA E MATERIAL

4.1 Cultivos celulares

Foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO-K1; ATCC CCL-61), mantidas rotineiramente pelo Laboratório Biosintesis Ltda., usadas rotineiramente em experimentos, aceitas e recomendadas por organismos internacionais (OECD, 2010). Todos os cultivos experimentais ou de manutenção foram desenvolvidos utilizando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Essential Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de mistura de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina, 10000 UI/mL), em incubadoras com temperatura constante de 37°C e atmosfera controlada contendo 95%O₂ e 5%CO₂. Culturas de manutenção foram desenvolvidas de forma aderente em garrafas plásticas estéreis com 25cm² de área útil.

4.2 Teste de citotoxicidade

DOTATATO (PiChem, Áustria) e Ubiquidina₂₉₋₄₁ (ABX, Alemanha) foram cedidos pela Gerência de Garantia de Qualidade do Centro de Radiofarmácia – IPEN/CNEN-SP. As alíquotas foram obtidas de lotes regulares, que são adquiridos regularmente pelo Centro de Radiofarmácia para a produção de radiofármacos (⁶⁸Ga-DOTATATO e ^{99m}Tc-UBI₂₉₋₄₁, respectivamente). Os compostos foram recebidos na forma de pó liofilizado e diluídos em água deionizada (CHELLEX[®]) conforme a Tabela 1. Utilizando o conceito de “homem-padrão”, foi feita a conversão das concentrações obtidas para seus equivalentes em relação às concentrações administradas em adultos. Desta maneira, a máxima concentração de DOTATATO administrada em adultos (40µg / paciente) foi calculada como equivalente a 7ng / mL em cultura (1X); 25µg por paciente (concentração de Ubiquidina₂₉₋₄₁) foi calculada como 4ng / mL. Foi preparado o controle de veículo (CV) a partir da mesma água deionizada utilizada nas diluições, em concentração máxima de 0,5% em cada poço.

Tabela 1: Concentrações de DOTATATO e Ubiquidina₂₉₋₄₁ utilizadas nos testes de citotoxicidade.

	Concentrações (ng / mL)	Equivalente à concentração máx. em adultos
DOTATATO	7,3	1.042X
	3,6	0.521X
	1,8	0.260X
	0,9	0.130X
	0,5	0.065X
Ubiquidina ₂₉₋₄₁	4,5	1.125X
	2,3	0.562X
	1,1	0.281X
	0,6	0.153X
	0,3	0.070X

Suspensões celulares contendo 100.000 células viáveis / mL de meio de cultura foram ajustadas em um volume de 100 µL e transferidas para os poços das placas de 96 em quadruplicatas. As placas contendo as suspensões celulares passaram por incubação de 24±2 horas em estufa incubadora como descrito. Após este tempo, o meio de cultura foi aspirado e adicionou-se 100 µL de meio de cultura com ou sem substâncias-teste ou controles diluídos conforme descrito, dependendo da designação dos poços. As placas foram colocadas novamente para incubação em incubadora por mais 24 horas. Terminado este período de incubação o meio foi aspirado e no lugar foi adicionada uma solução (1:6) preparada de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS, *CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, Promega, Nº Cat. G1112) e phenazine methosulfate (PMS, Sigma-Aldrich, CAS 299-11-6) em meio de cultura. Adicionou-se em todos os poços 120 µL da solução. Seguidamente, as placas foram novamente incubadas por 120 min. em incubadora conforme descrito. Através da capacidade das desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas, o composto MTS em presença do PMS é convertido em um composto final chamado formazan, cuja quantidade é percebida pela medição de sua absorvância a 490nm.

4.3 Concentrações de Ubiquidina₂₉₋₄₁ e DOTATATO para genotoxicidade

Para avaliação da genotoxicidade da Ubiquidina₂₉₋₄₁ e DOTATATO foram utilizadas concentrações equivalentes a 1/10, 1 e 10 vezes a concentração máxima dada a cada paciente (25µg de Ubiquidina e 40 µg de DOTATATO / paciente). As quantidades de ubiquidina e DOTATATO foram determinadas utilizando-se o cálculo do “homem padrão” (70kg e 5,5L de sangue). A concentração final de ubiquidina usada foi de 4ng / mL, com os quais foram preparadas soluções com 0,4ng / mL (0,1X), 4ng / mL (1X) e 40ng / mL (10X). Para o DOTATATO foi utilizada uma concentração final 7,0ng / mL, com os quais foram feitas soluções com 0,70ng / mL (0,1X), 7,0ng / mL (1X) e 70ng / mL (10X).

4.4 Controles positivos de genotoxicidade (colchicina, mitomicina C e benzo[a]pireno)

Benzo[a]pireno (BZP, Sigma-Aldrich, CAS 50-32-8; 0,464mg / mL), controle positivo clastogênico com ativação metabólica, só foi utilizado em experimentos contendo a fração hepática S9 (Moltox, CAS 11097-69-1; 0,476mg / mL) pois o agente depende da conversão hepática para exercer sua toxicidade. Colchicina (aneugênico) (COLCH, Sigma-Aldrich, CAS 64-86-8) e mitomicina C (clastogênica) (MTMC, Sigma-Aldrich, CAS 50-07-7) controles positivos sem ativação metabólica foram adicionados em culturas sem S9. Os ensaios foram realizados em duplicata, obtendo uma concentração final de 1,1µg / mL, 2,5 µg / mL e 15 µg / mL, para colchicina, mitomicina C e Benzo[a]pireno, respectivamente.

4.5 Controle negativo (NaCl, 0,9%)

Para controle negativo foi utilizado NaCl, 0,9% (NaCl, Synth Ltda., C1060, CAS, 764714-5) com e sem ativação de S9, na concentração final de 10 µg / mL. Células cultivadas em meio de cultura sem nenhum composto adicional foram utilizadas como controle (CC).

4.6 Testes de micronúcleo seguindo metodologia padrão (Giemsa)

A metodologia padrão de fixação e coloração é descrita pela AIEA (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2001). Este método consiste na exposição das células CHO-K1 com os fármacos nas concentrações

mencionadas, após atingir uma confluência de 80%. Suspensões celulares contendo 30.000 células viáveis por mL foram semeadas em placas de Petri individuais (6cm²). Foram semeados 2 mL das suspensões para cada poço num total de 60000 células e colocados em incubadora de atmosfera úmida de CO₂ a 37°C. Após 24 horas de incubação as placas foram lavadas com 1 mL de solução salina-fosfato tamponada (PBS) e o meio de cultura das placas foi trocado por meio fresco (RPMI 1640, 10% soro fetal bovino, 1% estreptomicina/penicilina) e posteriormente colocadas para incubação por mais 24 horas. O meio de cultura foi retirado e as culturas expostas aos controles ou fármacos em teste permanecendo em incubação por 4 horas. Em seguida os poços foram lavados com PBS e foram adicionados 2mL meio de cultura contendo 4µg / mL de citocalasina B (CITOB, Sigma-Aldrich, CAS 14930-96-2) e submetidas a 24 horas de incubação.

As células CHO-KI foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em solução isotônica (NaCl 0,9%) por 5 minutos, fixadas em 5 mL de solução fixadora contendo metanol e ácido acético (3:1) e 1 % de formaldeído por 10 min. Após esse tempo as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante dissolvido novamente em solução fixadora por 10 min, repetindo esta etapa 3 vezes. Na última etapa as suspensões foram gotejadas sobre lâminas histológicas mantidas a 65°C sob vapor de água por cerca de 3 min ou até o material secar. A secagem foi finalizada a temperatura ambiente por uma noite. As lâminas foram coradas com solução de coloração preparada segundo Giemsa (pó Giemsa 5% em tampão Sorensen, pH 6,8) por 15 min, enxaguadas em água destilada e secas novamente em temperatura ambiente protegidas do pó e da luz até o momento da leitura por microscopia óptica. Foram realizados três ensaios em duplicatas. Para os experimentos que seguiram o protocolo tradicional, não foram realizados grupos com ativação metabólica (presença de S9).

4.7 Testes do micronúcleo seguindo técnica modificada (laranja de acridina)

Culturas celulares foram diretamente cultivadas em lamínulas estéreis de vidro para microscopia (40 x 25 mm). Foram preparadas suspensões celulares contendo 17.000 células viáveis por mL de meio de cultura. Cinco mil células foram ajustadas em um volume de 300 µL e cuidadosamente pipetadas em lamínulas estéreis depositadas no fundo dos poços das placas de 6 poços ou placas de Petri individuais (6cm²). Após 24 horas em incubadora, as lamínulas foram lavadas vagarosamente com 1 mL de solução salina-fosfato tamponada (PBS), estéril (37°C) e em seguida a solução foi aspirada cuidadosamente, com uma ponteira acoplada à mangueira da bomba de vácuo. Após a lavagem dos poços foi adicionado 2 mL do meio de cultura, e submetidas a mais 24 horas em incubadora.

As células CHO-K1 foram tratadas com os controles positivos e negativos e compostos-teste devidamente preparados nas concentrações adequadas. Após 4 horas de incubação, o meio de cultura dos poços foi aspirado. Posteriormente, as células foram lavadas nas lamínulas com PBS (37°C) e receberam 2 mL de meio de cultura contendo 4µg / mL de citocalasina B (CITOB, Sigma-Aldrich, CAS 14930-96-2), composto que possibilita a formação de células binucleadas, durante um período de cultivo de 24 ±0,5 horas. Logo em seguida, as células foram lavadas com 2 mL de PBS e submetidas à uma solução isotônica (NaCl 0,9%) por 15 minutos em temperatura ambiente. Finalizando essa etapa, as células nas lamínulas foram fixadas com solução 4% de paraformaldeído em PBS por 15 minutos (pH 7,2), seguidos de três lavagens com PBS e deixadas para secagem ao ar ambiente por ao menos 24 horas.

4.8 Coloração e leitura das lamínulas no microscópio

O material preparado segundo a técnica tradicional foi analisado adotando critérios estabelecidos pela AIEA (2001). As células quantificadas precisaram exibir o citoplasma preservado e apresentar micronúcleos coloração igual ao núcleo principal. A análise microscópica de cada amostra foi realizada em microscópios ópticos NIKON e CARL ZEISS, utilizando luz branca e objetiva de aumento 20 vezes.

Para a análise do material obtido segundo a técnica modificada, as células em lamínulas secas foram coradas com solução 0,0001% de laranja de acridina (Sigma-Aldrich, CAS 10127-02-3) em PBS, montadas em lâminas histológicas e visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon 80i), utilizando filtros específicos (filtro de excitação: 450-490nm; filtro de barreira: 515nm), que permitiram visualizar o DNA nuclear e os micronúcleos em cor verde brilhante e o citoplasma em vermelho vivo e usando objetiva de aumento 20 vezes.

Experimentos com a técnica convencional foram avaliados por apenas um analista. O material preparado com a técnica modificada foi avaliado por dois analistas independentes após codificação e randomização das lâminas para evitar viés de observação.

4.9 Cálculos e estatística

Para os ensaios de citotoxicidade, foram utilizados os valores das absorvâncias obtidas pelo espectrofotômetro, que foram convertidos em porcentagens de viabilidade celular. As células nas culturas-controle (apenas meio de cultura) representaram 100% de viabilidade celular. Concentrações que trataram culturas cuja viabilidade total apresentou-se menor que 90% dos controles foram consideradas citotóxicas. Para os ensaios de genotoxicidade, foram contabilizadas todas as células mononucleadas e multinucleadas até atingir a contagem de 1000 células binucleadas em cada preparação histológica. Células binucleadas com micronúcleos foram contabilizadas desde que possuíssem no máximo quatro corpos micronucleares, com o intuito de não inserir na contagem células com características morfológicas assemelhadas às de células apoptóticas. Os números de células binucleadas, mononucleadas e multinucleadas de cada amostra foram utilizados para o cálculo do índice de proliferação (*Cytokinesis-block proliferation index*, CBPI), representada na Equação 1. A porcentagem da frequência de micronúcleos (% FMN) foi calculada por meio dos valores contabilizados de micronúcleo (MN) e células binucleadas (CB), demonstrados na Equação 2, segundo a seguinte fórmula:

$$CBPI = \frac{((N^{\circ} \text{ mononucleadas}) + (2 \times N^{\circ} \text{ binucleadas}) + (3 \times N^{\circ} \text{ multinucleadas}))}{(\text{Número total de células})}$$

Equação (1)

$$\% \text{ FMN} = \frac{MN}{CB} \times 100$$

Equação (2)

Todos os resultados foram analisados utilizando o software Prism5 (GraphPad). Desta forma, foram apresentados em gráficos que permitem a comparação de possíveis diferenças entre grupos controle e tratados. A significância estatística encontrada para estas diferenças foi determinada por metodologia de análise de variância (ANOVA) e pós-testes segundo Bonferroni. Foram comparados os valores obtidos para cada amostra em relação aos controles de células (CC)). Foi considerada genotóxica a concentração que apresentou frequência de células binucleadas com micronúcleos maior à frequência encontrada nos controles, e com diferença estatística mínima de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular após exposição à Ubiquicidina₂₉₋₄₁ ou DOTATATO

A Figura 4 mostra o perfil de viabilidade celular obtido em função das diferentes concentrações de Ubiquicidina₂₉₋₄₁ e DOTATATO. Os valores de viabilidade celular das culturas tratadas não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, nem toxicidade maior ou igual a 10% (viabilidade igual ou menor a 90%).

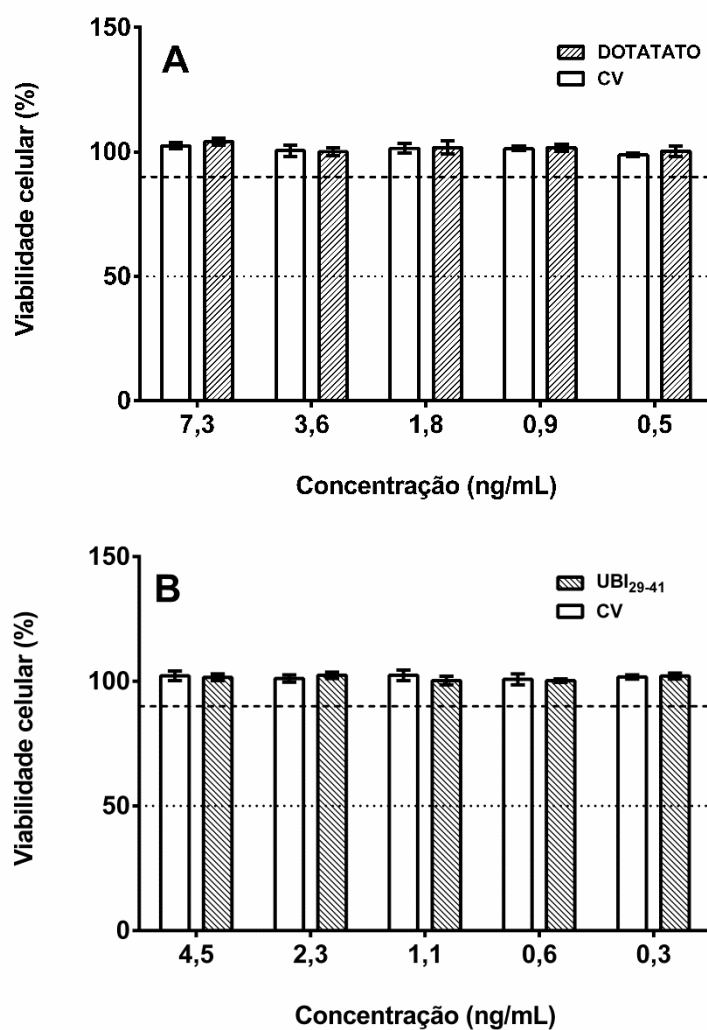


Figura 4: Efeitos de diferentes concentrações de DOTATATO (A) e Ubiquicidina₂₉₋₄₁ (B) na viabilidade celular de células CHO-K1. (CV): controle de veículo.

5.2 Teste de micronúcleo tradicional - Coloração com Giemsa de culturas tratadas com DOTATATO

Na figura 5(A), observa-se um aumento significativo de % BNCMN (células binucleadas com micronúcleo) nos controles positivos (MTMC; COLCH) em relação ao controle celular. Em 5(B) houve uma redução significativa no CBPI dos controles positivos em relação ao controle celular. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores dos controles de células (CC) e os valores experimentais (0,1X; 1X e 10X), para ambos os índices.

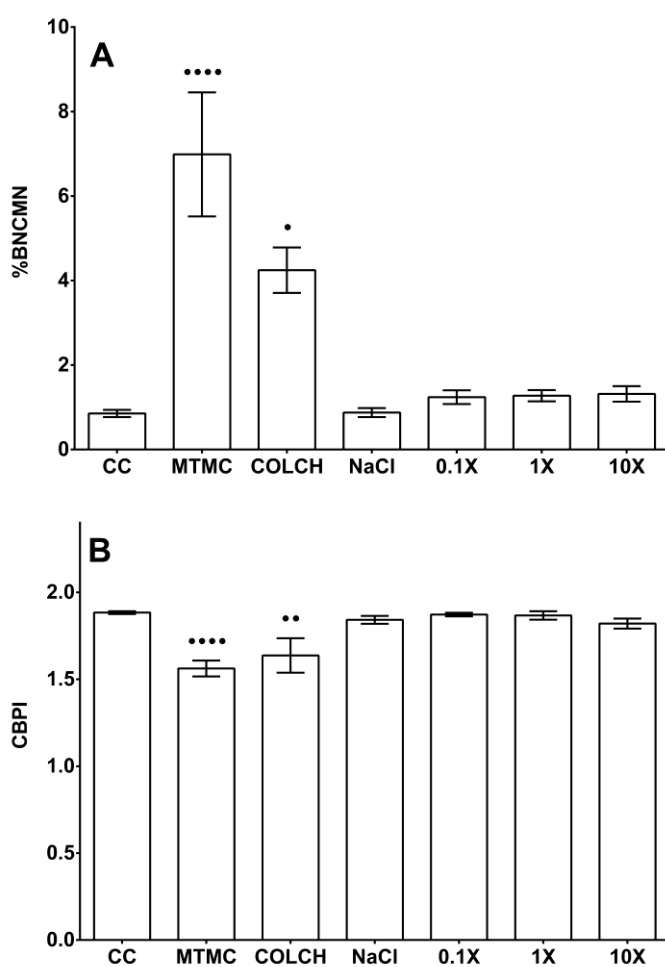


Figura 5: (A) porcentagem de células binucleadas (%BNCMN) com micronúcleos e (B) Índice de proliferação (CBPI) de DOTATATO. Barras representam valores de erro-padrão das médias. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina. 0,1X, 1X e 10X referem-se às concentrações de DOTATATO utilizadas em relação ao cálculo do homem-padrão. $p < 0,0001$ (****); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (•).

5.3 Testes de micronúcleo tradicional - Coloração com Giemsa de culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁

Na figura 6(A) observa-se um aumento significativo da % BNCMN nas amostras contendo MTMC e COLCH em relação ao controle celular. Na figura 6(B) houve uma redução significativa no CBPI na MTMC e COLCH em relação ao controle celular. Não foram detectadas alterações nos dois parâmetros nas culturas-teste.

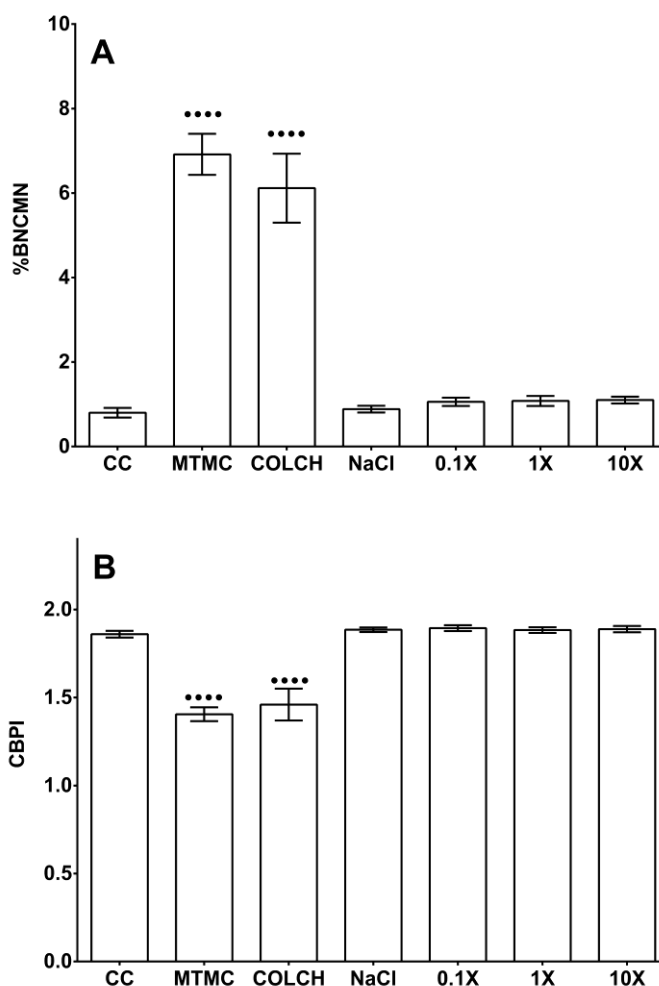


Figura 6: (A) porcentagem de células binucleadas com micronúcleos (%BNCMN) e (B) Índice de proliferação (CBPI) da Ubiquidina₂₉₋₄₁. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina. Barras representam valores de erro-padrão das médias. 0,1X, 1X e 10X referem-se às concentrações de Ubiquidina₂₉₋₄₁ utilizadas em relação ao cálculo do homem-padrão. $p < 0,0001$: (●●●●).

5.4 Teste de micronúcleo modificado: Coloração com laranja de acridina

Na figura 7 é observado o aspecto geral das preparações com células CHO-K1 após coloração pela metodologia modificada.

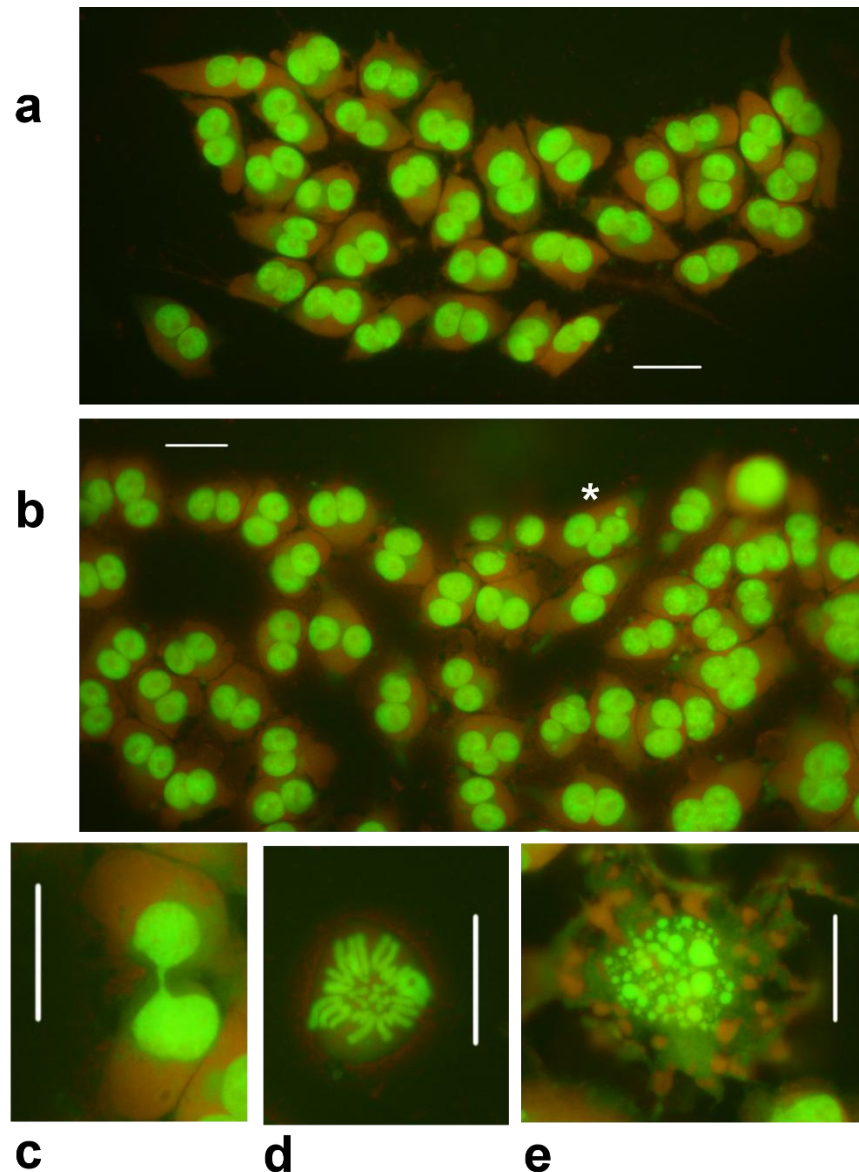


Figura 7: Aspecto típico de uma preparação com células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), utilizada para análise de frequência de micronúcleos e visualizada em aumento de 40X. Imagens obtidas em culturas controle (CC). (a) Células CHO-K1 binucleadas; (b) Células binucleadas e um exemplo de micronúcleo no interior de uma célula trinucleada (*); (c) ponte nucleoplasmática, derivada de translocação; (d) metáfase e (e), célula com morfologia apoptótica. Barras representam 50 μ m. Filtros: excitação: 450-490nm; barreira: 515nm.

As Figuras 8 a 15 reúnem imagens que permitem comparar preparações típicas de experimentos com coloração por AO ou por Giemsa. O aspecto geral das preparações da técnica modificada mostra maior capacidade de discernimento entre núcleos, micronúcleos e citoplasma, em relação à coloração convencional.

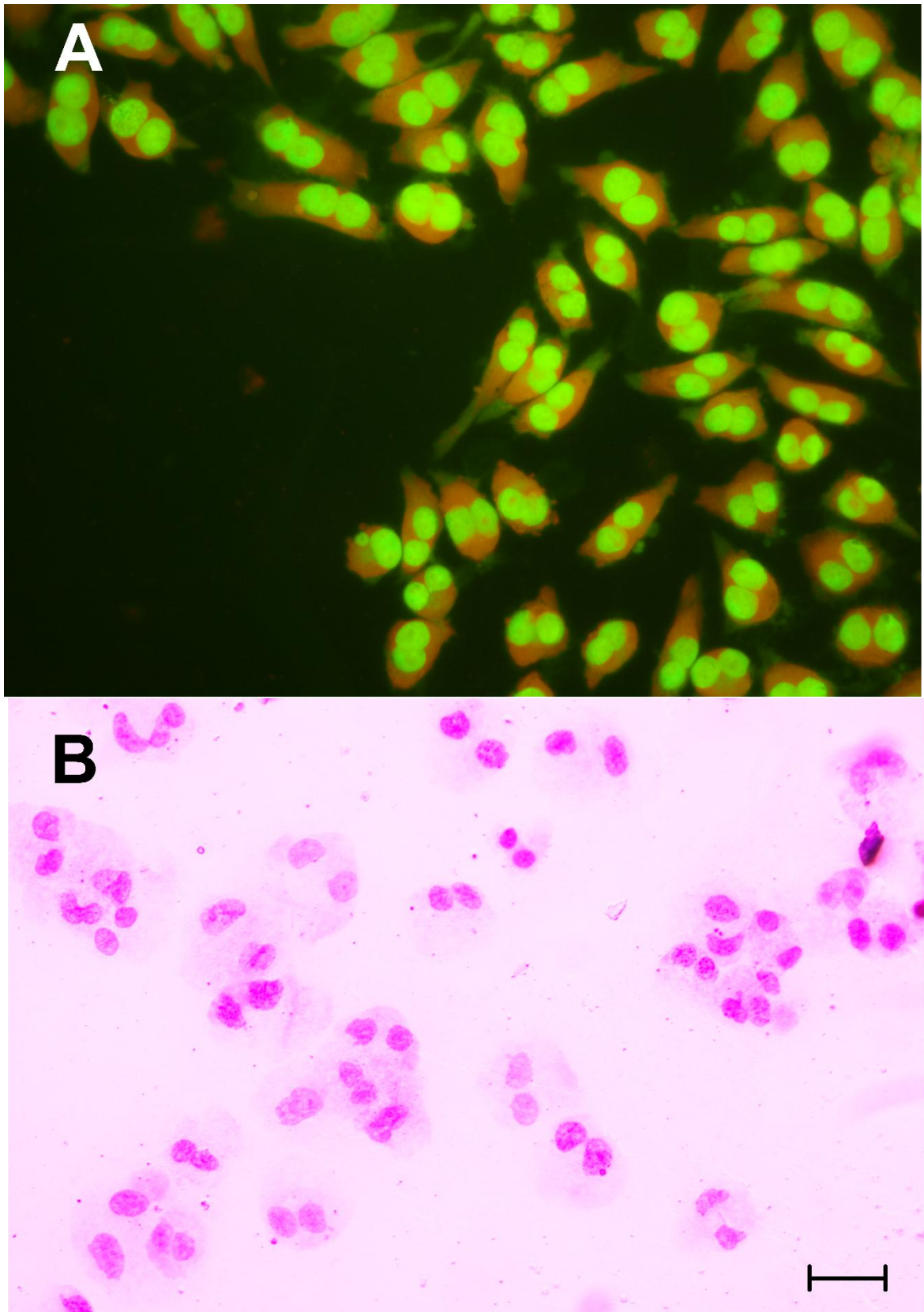


Figura 8: Visualização do aspecto final da coloração das culturas não-tratadas. (A) Laranja de acridina (AO), (B) Giemsa. Visualizadas em aumento de 20X Barra: 50 μ m.

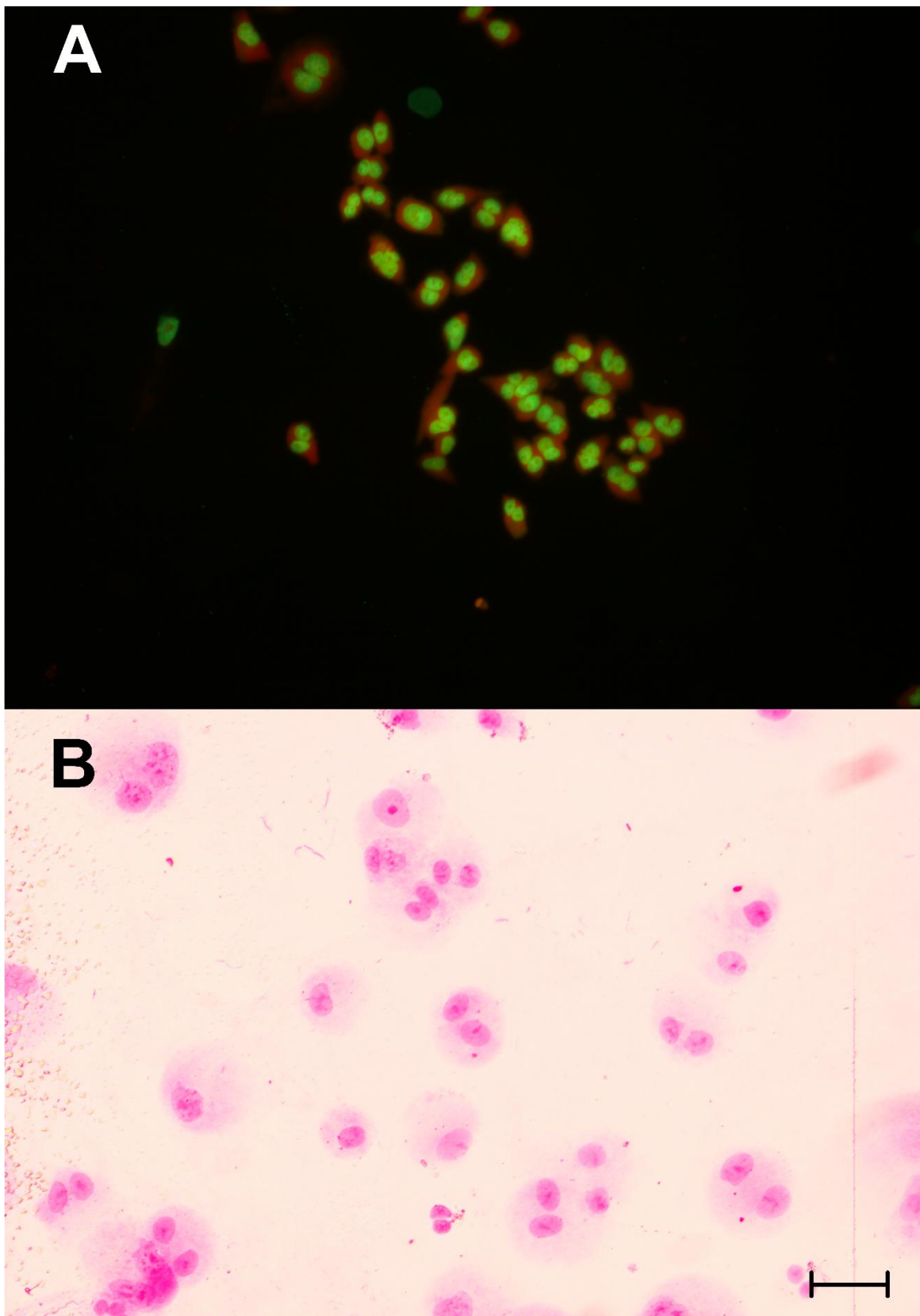


Figura 9: Visualização do aspecto final da coloração das culturas tratadas com NaCl 0,9%. (A) Laranja de acridina (AO), (B) Giemsa. Visualizadas em aumento de 20X Barra: 50 μ m.

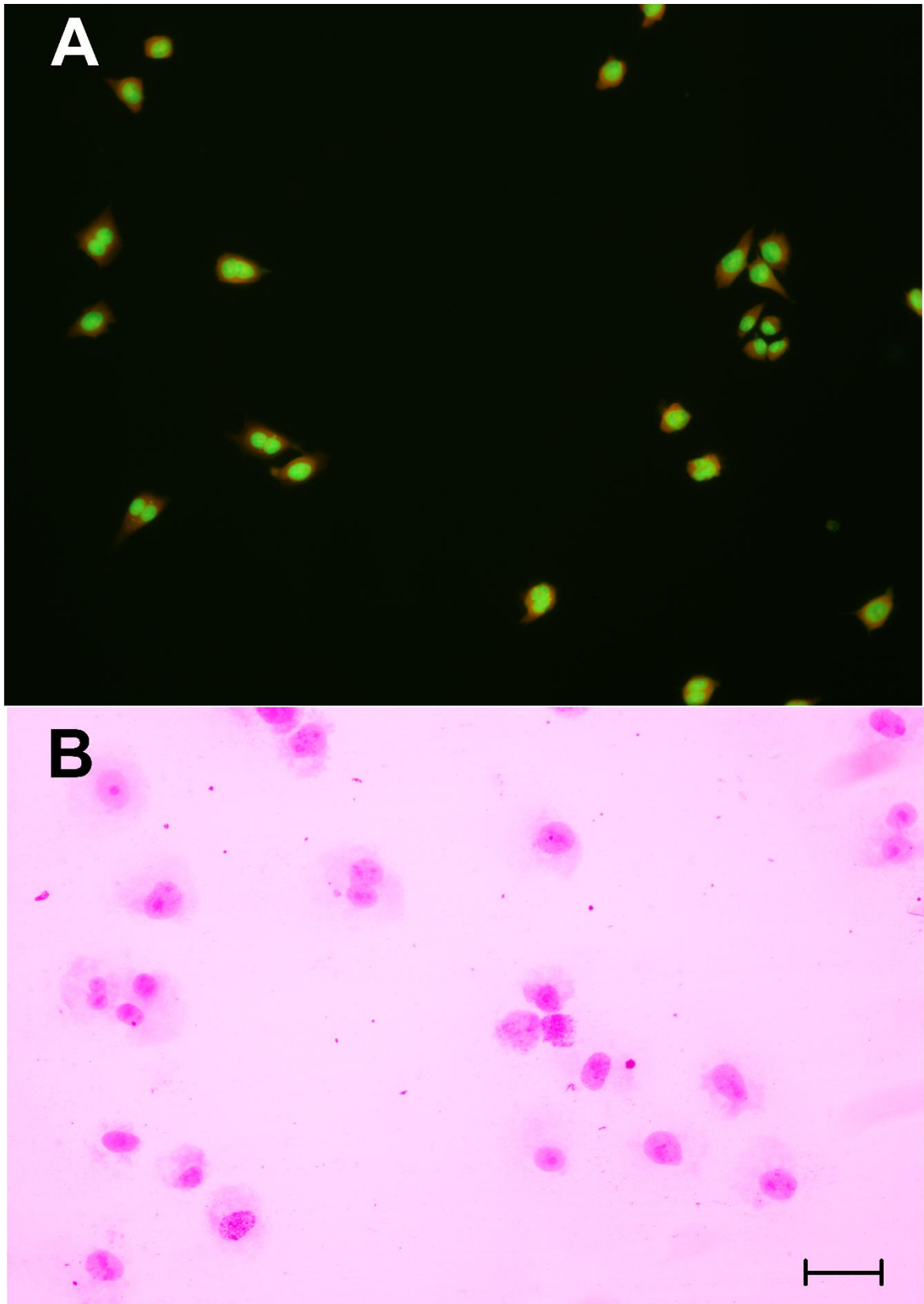


Figura 10: Visualização do aspecto final da coloração das culturas tratadas com Colchicina. (A) Laranja de acridina (AO), (B) Giemsa. Visualizadas em aumento de 20X Barra: 50 μ m.

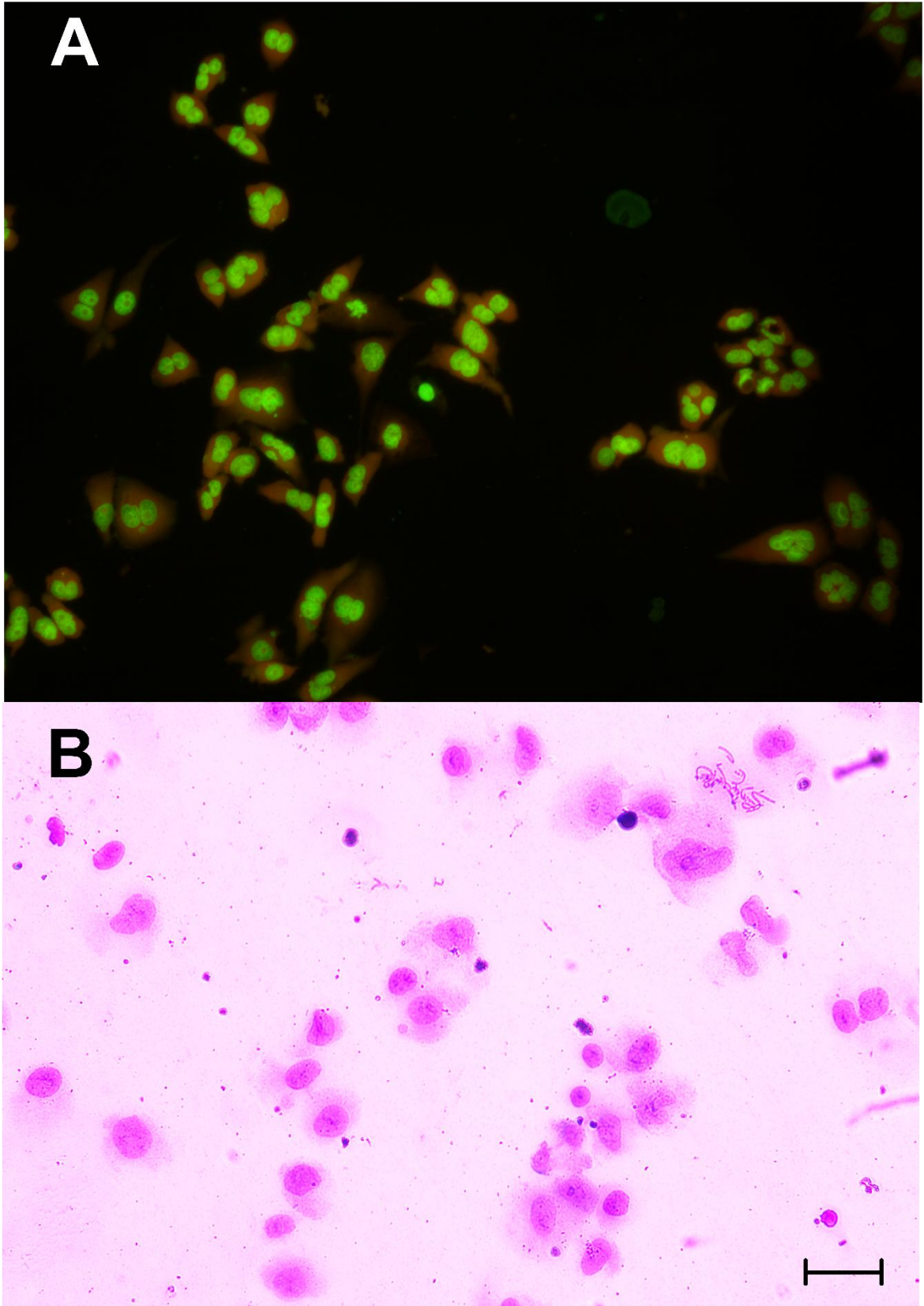


Figura 11: Visualização do aspecto final da coloração das culturas tratadas com Mitomicina. (A) Laranja de acridina (AO), (B) Giemsa. Visualizadas em aumento de 20X Barra: 50 μ m.

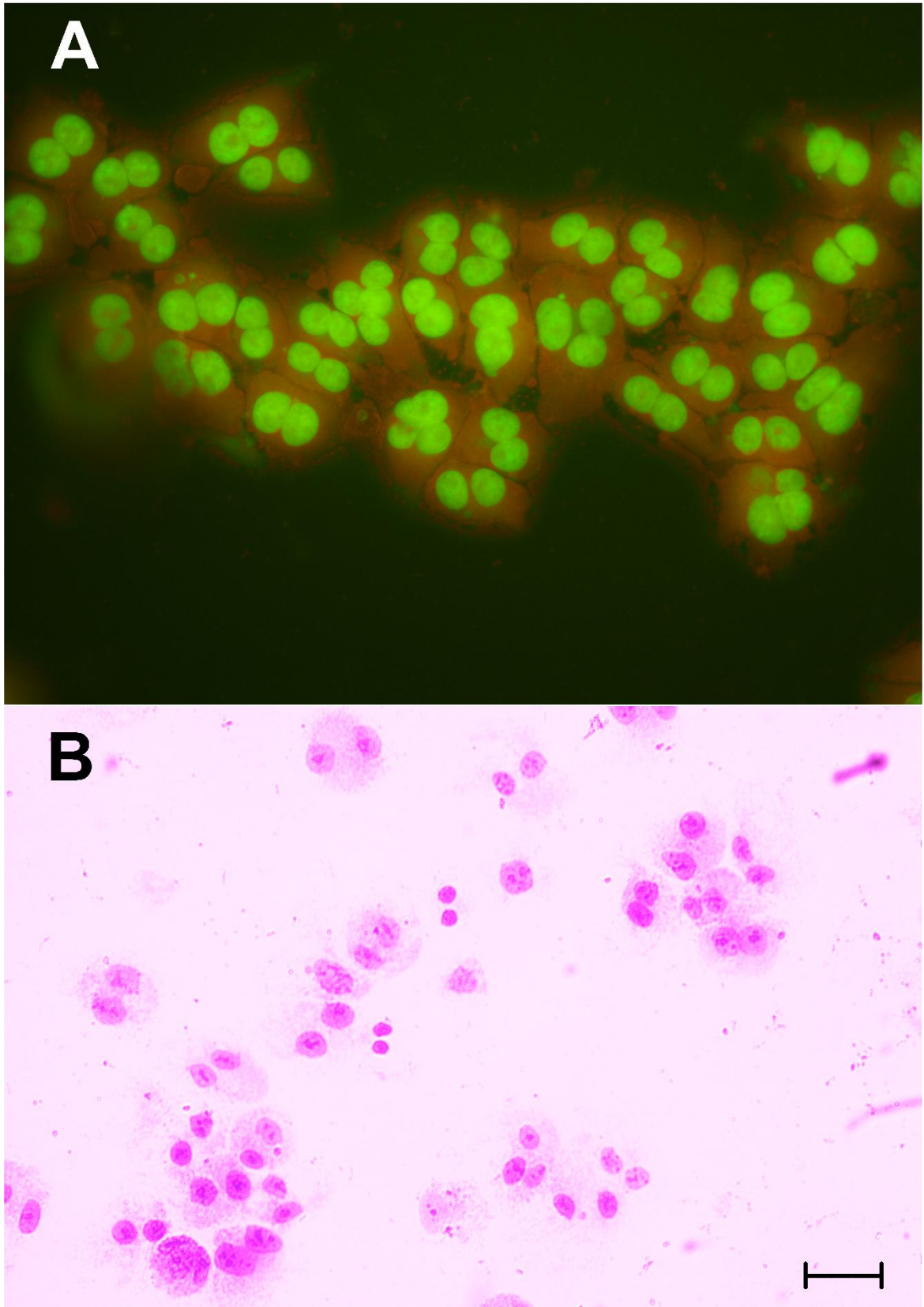


Figura 12: Visualização do aspecto final da coloração das culturas tratadas com Benzo[a]pireno. (A) Laranja de acridina (AO), (B) Giemsa. Visualizadas em aumento de 20X Barra: 50 μ m.

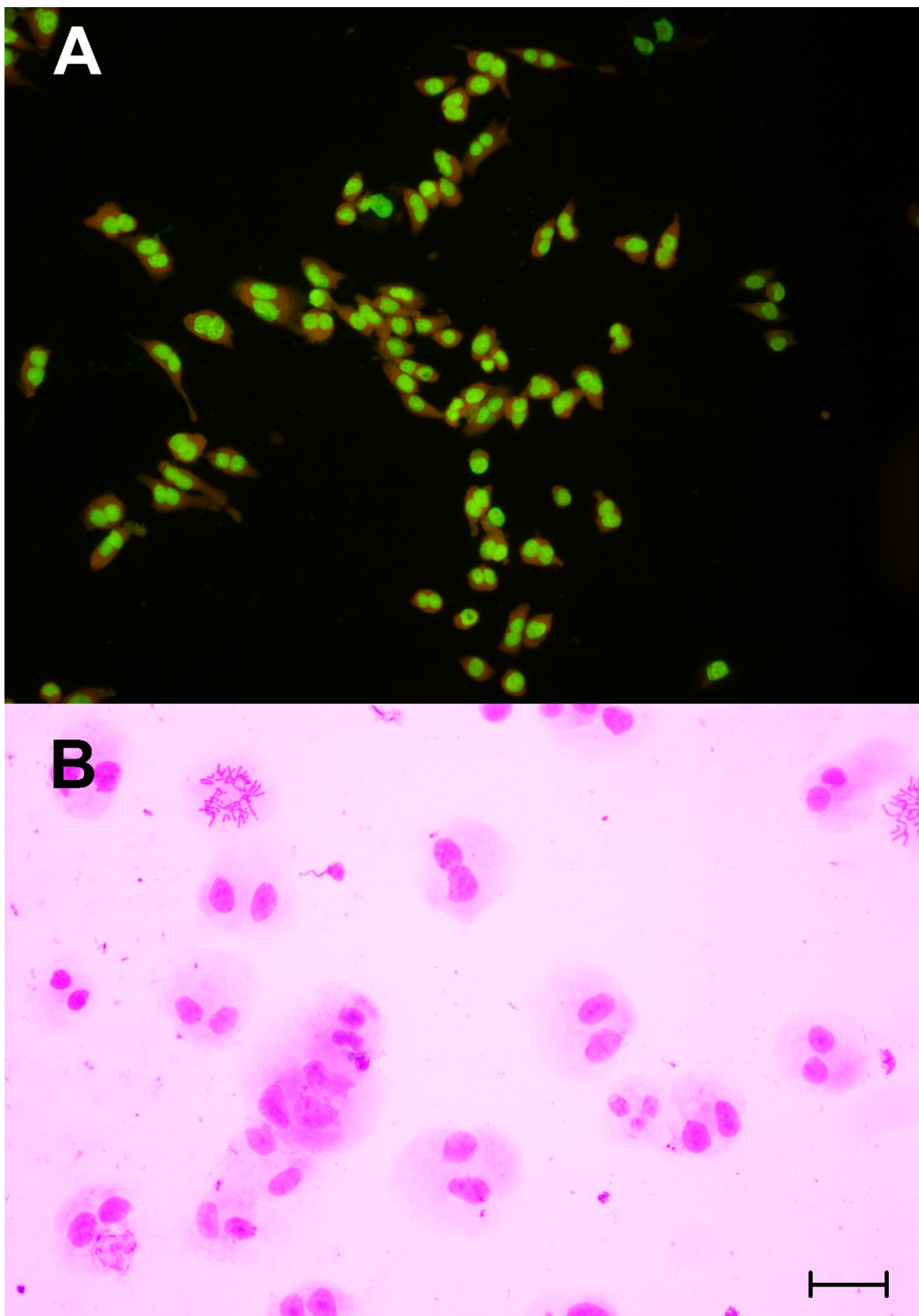


Figura 13: Visualização do aspecto final da coloração das culturas tratadas com UBI₁₉₋₄₁ 0,1X. (A) Laranja de acridina (AO), (B) Giemsa. Visualizadas em aumento de 20X Barra: 50µm.

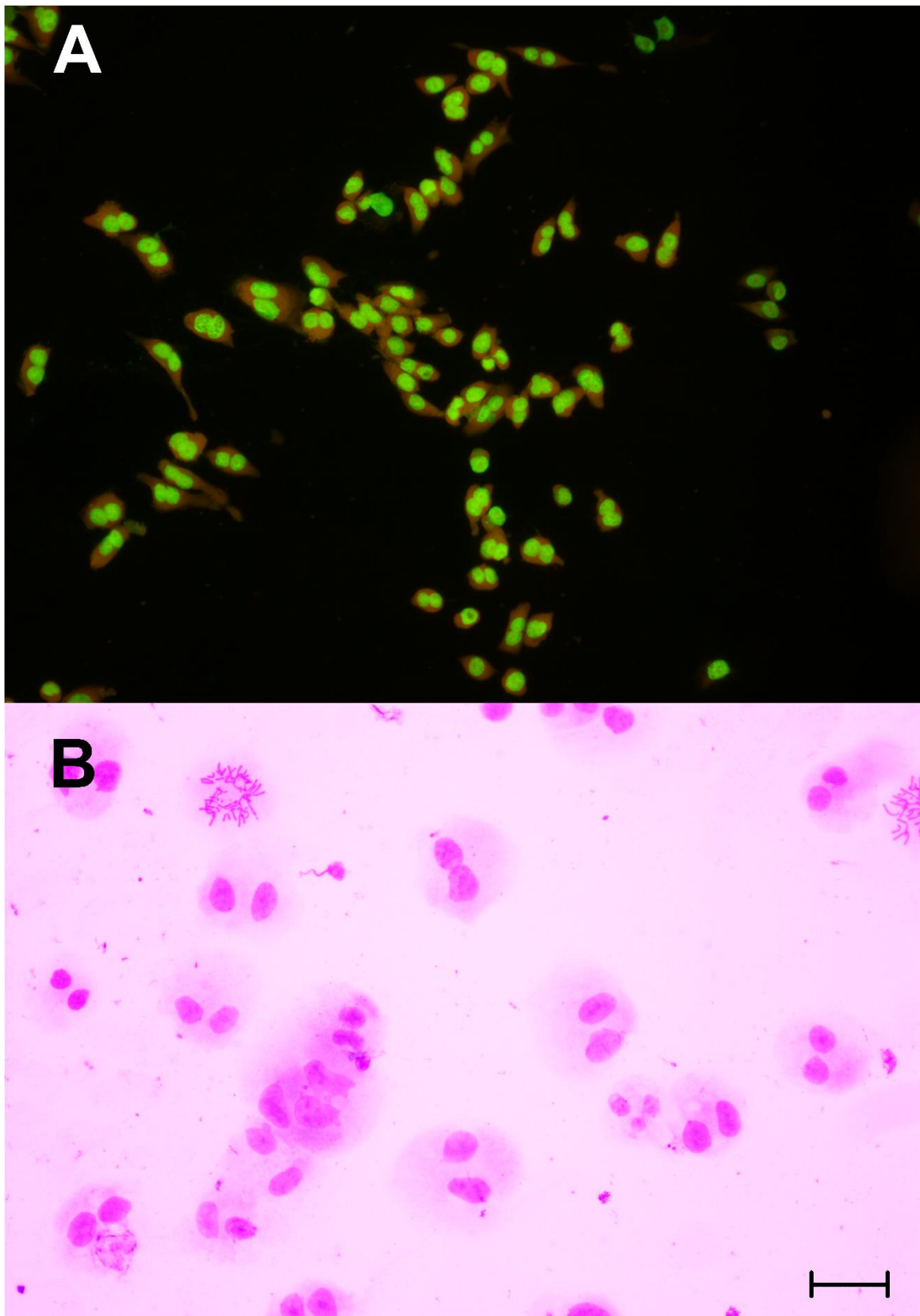


Figura 14: Visualização do aspecto final da coloração das culturas tratadas com UBI₁₉₋₄₁ 1X. (A) Laranja de acridina (AO), (B) Giemsa. Visualizadas em aumento de 20X Barra: 50µm.

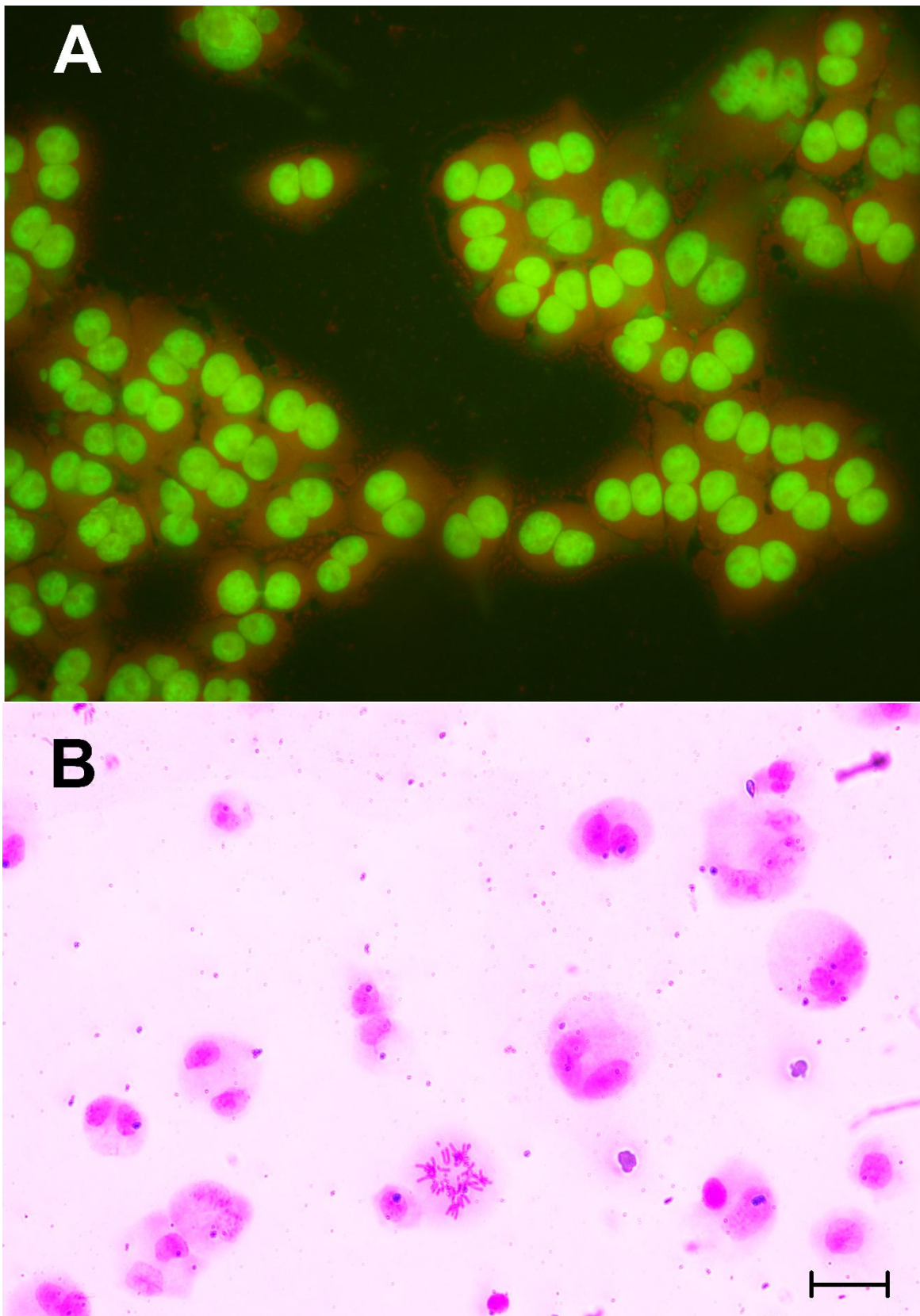


Figura 15: Visualização do aspecto final da coloração das culturas tratadas com UBI₁₉₋₄₁ 10X. (A) Laranja de acridina (AO), (B) Giemsa. Visualizadas em aumento de 20X Barra: 50µm.

5.5 Índice de proliferação (CBPI) de culturas tratadas com DOTATATO: Coloração com laranja de acridina

Na figura 16 são representados os índices de proliferação celular das amostras expostas ao DOTATATO. Em 16(A) sem ativação metabólica (S9) e com S9 em 16(B), mostraram que todas as diferentes concentrações testadas deste fármaco não induziram diferenças estatisticamente significantes nos CBPI em relação aos controles (CC). Apenas houve redução do CBPI de maneira significativa nos controles positivos (MTMC, COLCH e BZP).

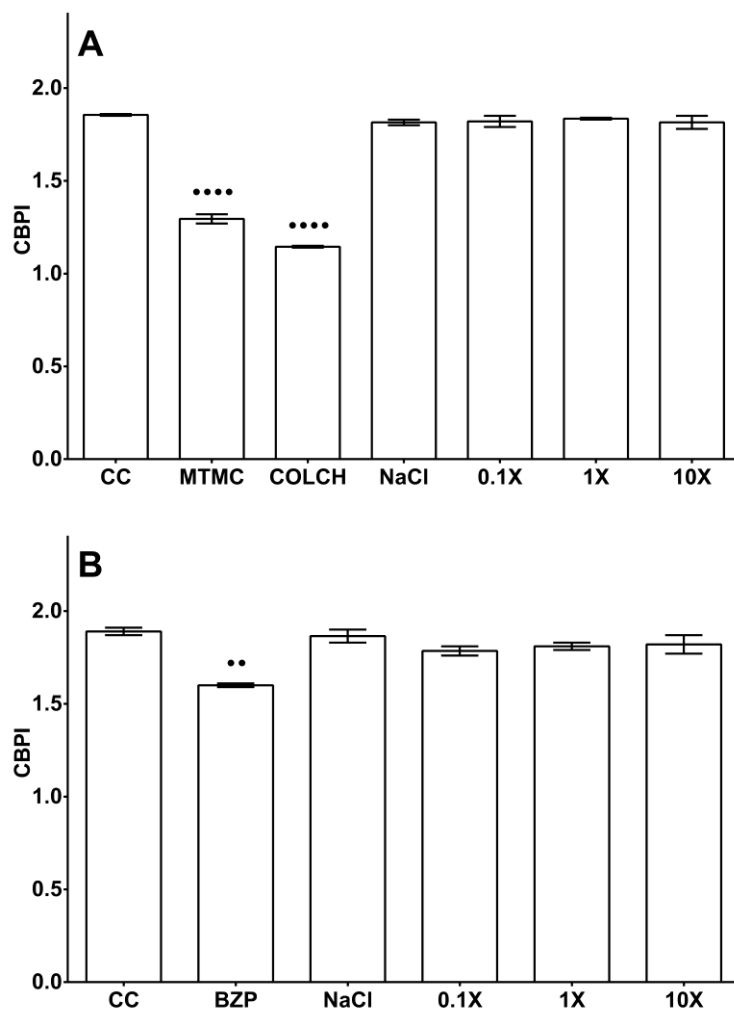


Figura 16: (A) Índice de proliferação (CBPI) de células tratadas com DOTATATO sem ativação metabólica (S9) e (B) com S9. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina; BZP: Benzo[a]pireno. Barras representam valores de erro-padrão das médias. 0,1X, 1X e 10X referem-se às concentrações de DOTATATO utilizadas em relação ao cálculo do homem-padrão. $p < 0,001$: (●●●●); $p < 0,01$: (●●).

5.6 Porcentagem de frequência de células binucleadas com micronúcleos de culturas tratadas com DOTATATO : Coloração com laranja de acridina

Na figura 17 Foi avaliado % BNCMN de células tratadas com DOTATATO Em (A) sem S9 e em (B) com S9. Nenhuma das concentrações utilizadas com DOTATATO mostraram diferença significativa em relação aos controles. Observou-se diferença estatística nos controles positivos (MTMC, COLCH e BZP)

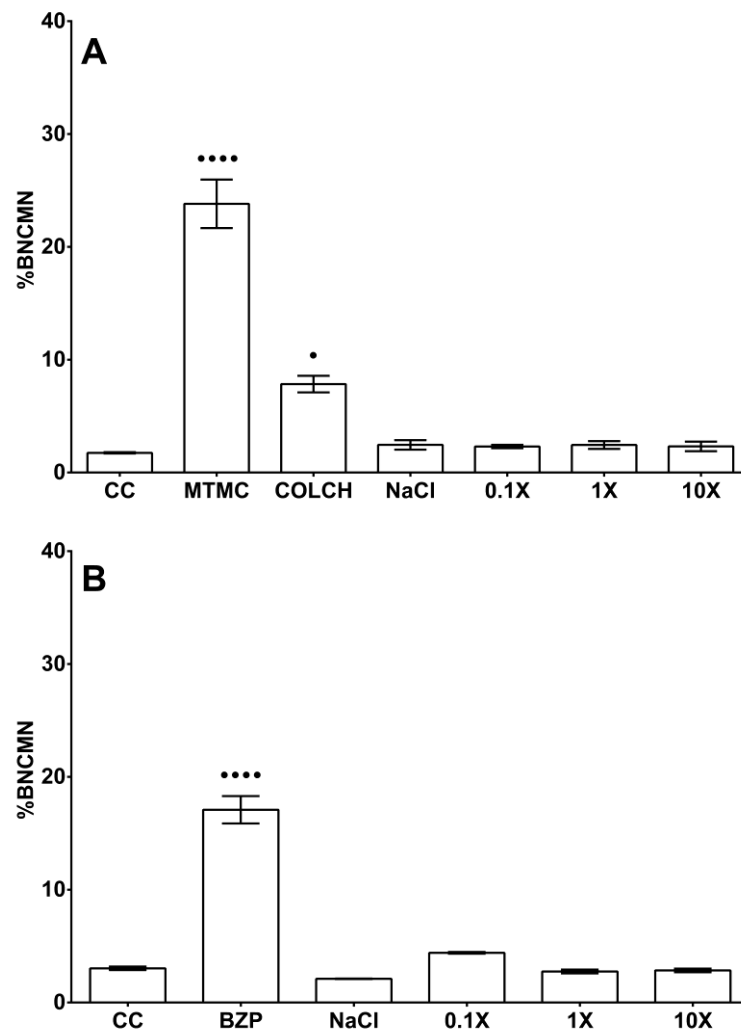


Figura 17: (A) porcentagem de células binucleadas com micronúcleos (%BNCMN) submetidas ao DOTATATO sem ativação metabólica (S9) e (B) com S9. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina; BZP: Benzo[a]pireno. Barras representam valores de erro-padrão das médias. 0,1X, 1X e 10X referem-se às concentrações de DOTATATO utilizadas em relação ao cálculo do homem-padrão. $p < 0,001$: (●●●); $p < 0,01$: (●●); $p < 0,001$: (●●●).

5.7 Índice de proliferação (CBPI) de culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁: Coloração com laranja de acridina

Os índices de proliferação (CBPI) das amostras que sofreram exposição à Ubiquidina estão representadas na figura 18. Sendo representadas em (A) amostras sem ativação metabólica S9 e em (B) com S9. Nenhuma das concentrações utilizadas deste fármaco induziram diferenças estatisticamente significantes no CBPI em relação ao controle CC. Os controles positivos (MTMC, COLCH e BZP) mostraram redução estatisticamente significativa do CBPI.

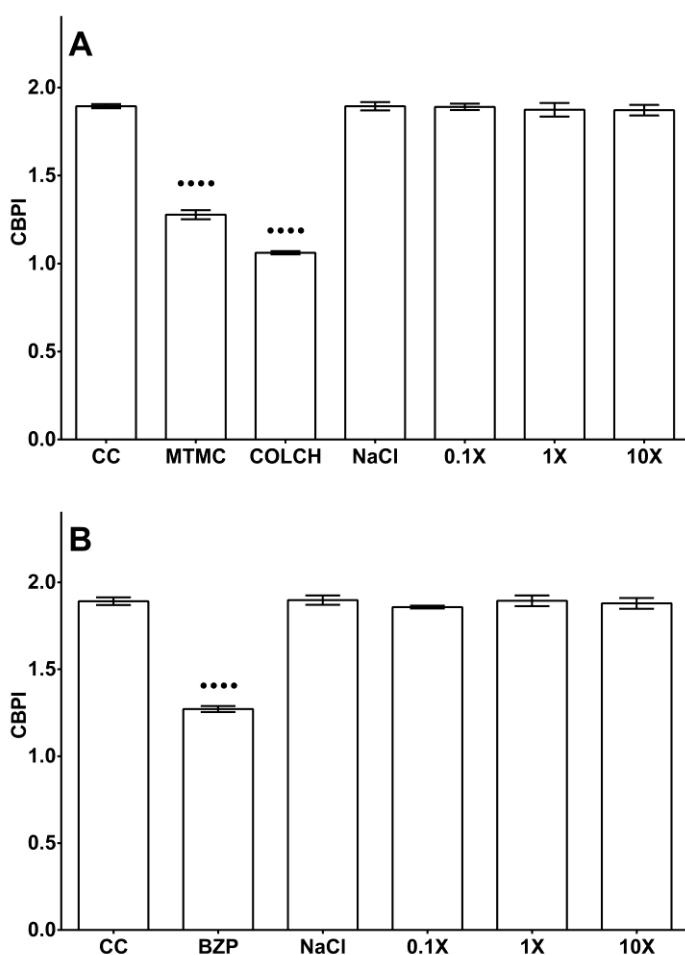


Figura 18: (A) Índice de proliferação (CBPI) de células tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁ sem ativação metabólica (S9) e (B) com S9. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina; BZP: Benzo[a]pireno. Barras representam valores de erro-padrão das médias. 0,1X, 1X e 10X referem-se às concentrações de Ubiquidina₂₉₋₄₁ utilizadas em relação ao cálculo do homem-padrão. $p < 0,001$: (●●●); $p < 0,0001$: (●●●●).

5.8 Porcentagem de frequência de células binucleadas com micronúcleos de culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁: Coloração com laranja de acridina

A figura 19 mostra a porcentagem de BNCMN em culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁. Em 13(A) sem ativação metabólica e em 13(B) com S9, nenhuma das concentrações de ubiquidina mostrou significância estatística, e só houve diferenças significantes entre o controle de células (CC) e os controles positivos (MTMC; COLCH e BZP).

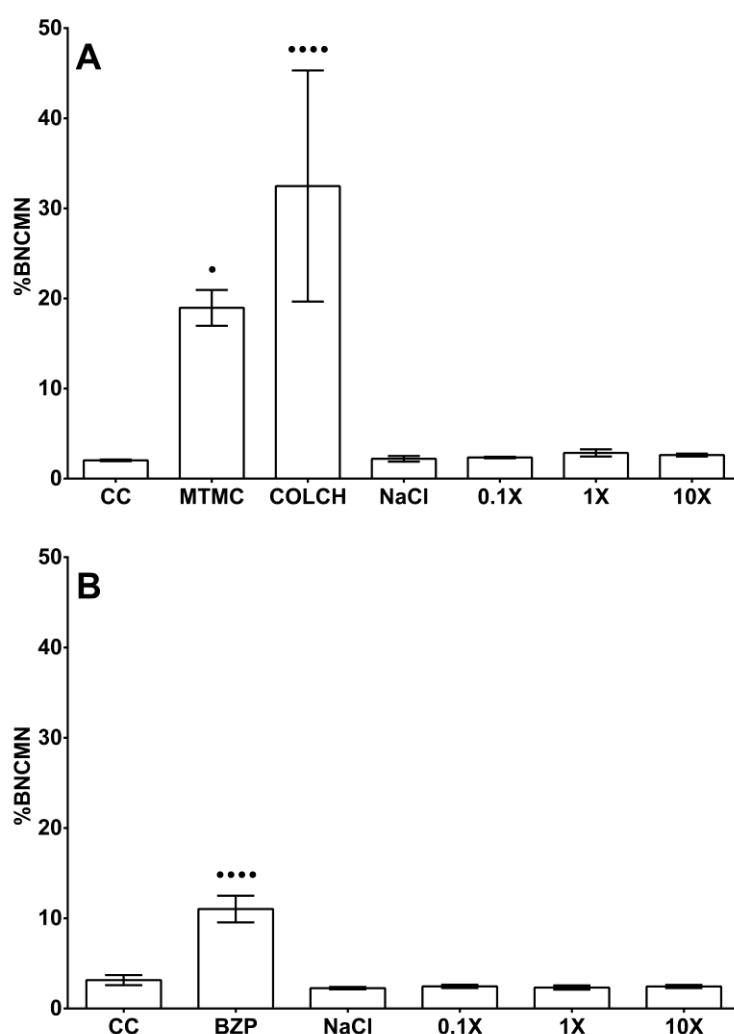


Figura 19: (A) porcentagem de células binucleadas com micronúcleos (BNCMN) tratadas com Ubiquidina sem ativação metabólica (S9) e (B) com S9. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina; BZP: Benzo[a]pireno. Barras representam valores de erro-padrão das médias. 0,1X, 1X e 10X referem-se às concentrações de Ubiquidina₂₉₋₄₁ utilizadas em relação ao cálculo do homem-padrão. $p < 0,001$: (●●●●); $p < 0,05$: (●)

5.9 Comparações dos valores de CBPI de culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁ e analisadas por dois analistas independentes.

Experimentos utilizando Ubiquidina₂₉₋₄₁ nas concentrações indicadas foram realizados para que se pudesse fazer comparação entre as contagens obtidas por dois analistas independentes. Na figura 20 observamos a comparação entre estas contagens. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os índices obtidos por dois analistas.

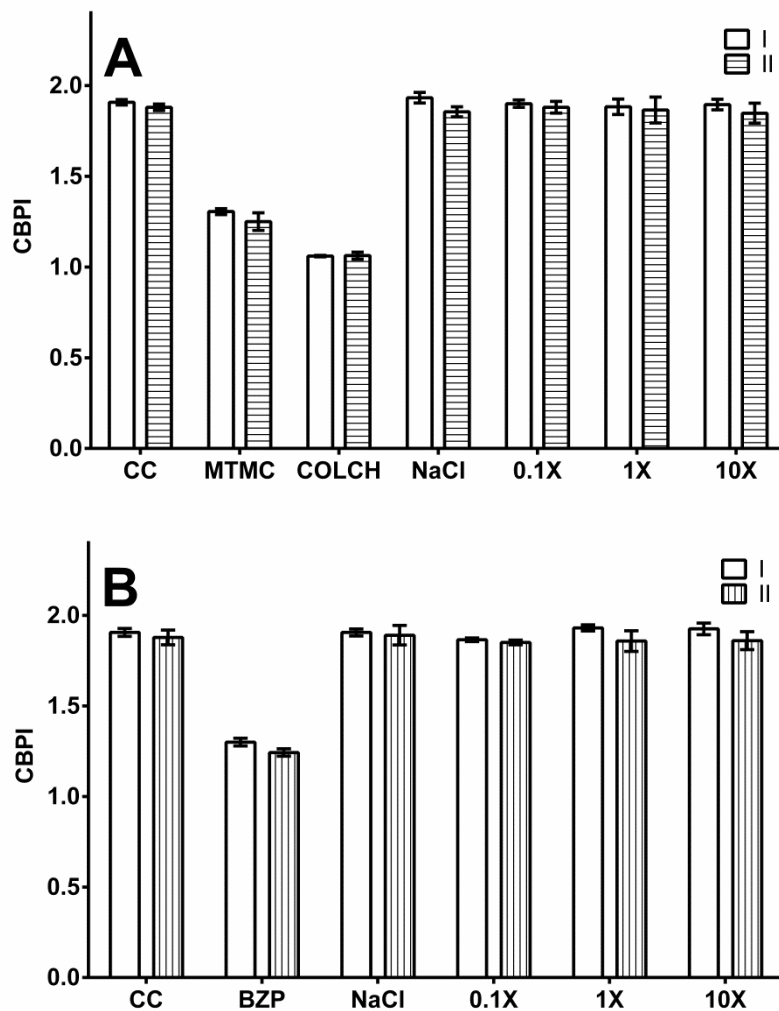


Figura 20: Cálculos das contagens de CBPI de culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁ e avaliadas por dois analistas independentes I: Analista 1; II: Analista 2 (A) sem ativação metabólica (S9) e (B) com S9. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina; BZP: Benzo[a]pireno. Barras representam valores de erro-padrão das médias. 0,1X, 1X e 10X referem-se às concentrações de Ubiquidina₂₉₋₄₁ utilizadas em relação ao cálculo do homem-padrão.

5.10 Comparações das FMN de culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁ e analisadas por dois analistas independentes.

Na figura 21 observa-se a comparação das contagens de FMN por analistas independentes. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as contagens relacionadas aos controles positivos Colchicina e Benzo[a]pireno

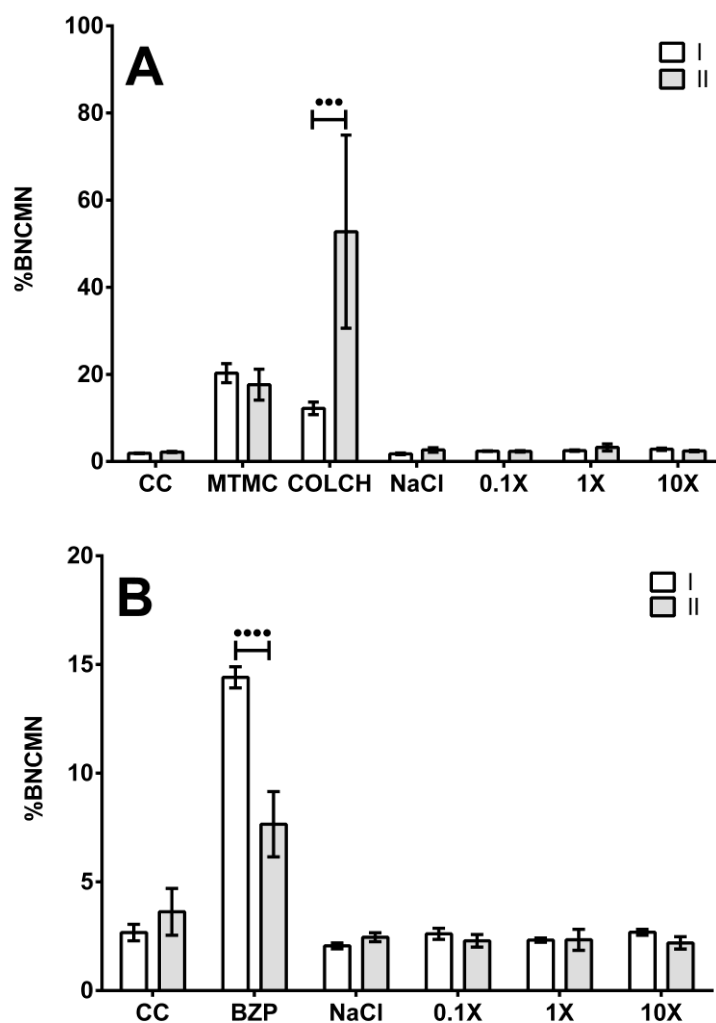


Figura 21: Contagens de BNCMN de culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁ e avaliadas por dois analistas independentes I: Analista 1; II: Analista 2. (A) sem ativação metabólica (S9) e (B) com S9. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina; BZP: Benzo[a]pireno. 0,1X, 1X e 10X referem-se às concentrações de Ubiquidina₂₉₋₄₁ utilizadas em relação ao cálculo do homem-padrão. $p < 0,001$: (●●●); $p < 0,0001$: (●●●●).

5.11 Comparação entre índices de proliferação celular das culturas celulares coradas com Giemsa ou laranja de acridina

Experimentos com Ubiquidina₂₉₋₄₁ e DOTATATO forneceram dados para comparações entre as contagens obtidas em lâminas coradas pela metodologia convencional e pela modificada, proposta pelo trabalho. Na figura 22(A) observa-se que houve diferença estatística entre as contagens de células binucleadas com micronúcleos em lâminas coradas com Giemsa e entre as preparadas com laranja de acridina, nas amostras tratadas com colchicina (COLCH), nos experimentos com UBI₂₉₋₄₁. Em culturas tratadas com DOTATATO (22(B)), foram encontradas diferenças nas amostras MTMC e COLCH.

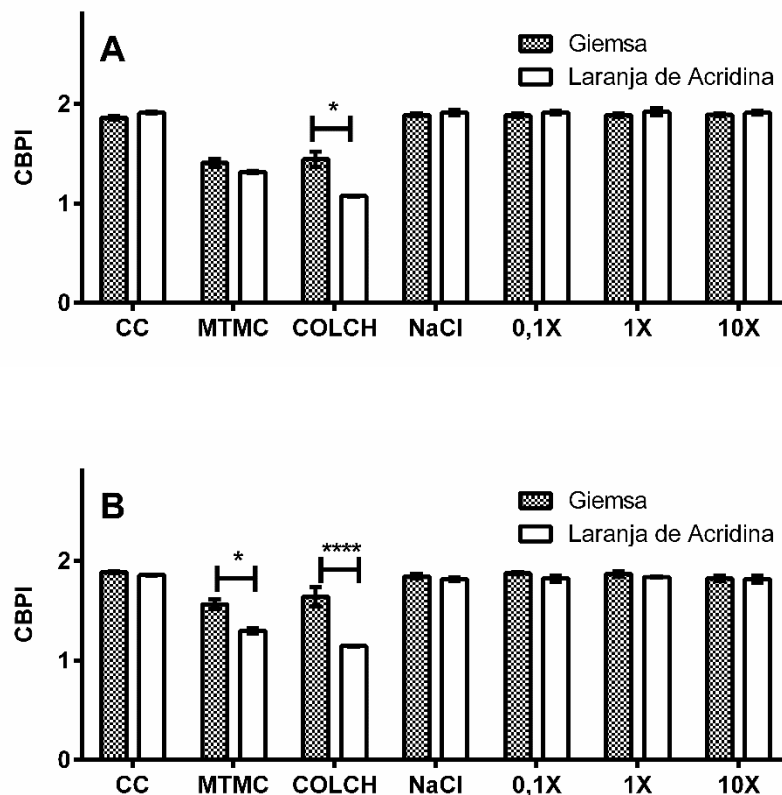


Figura 22: Comparação do CBPI entre as amostras coradas com Giemsa e laranja de acridina. (A) UBI₂₉₋₄₁, (B) DOTATATO. Barras representam valores de erro-padrão das médias. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina. p<0,05: (*). P<0,0001(****).

5.12 Comparação das porcentagens de células binucleadas com micronúcleo das culturas celulares coradas com Giemsa ou laranja de acridina

Na figura 23 observa-se diferença estatística entre as amostras tratadas com Colchicina (COLCH) e Mitomicina (MTMC) em experimentos com UBI₂₉₋₄₁ (23(A)) ou DOTATATO (23(B)).

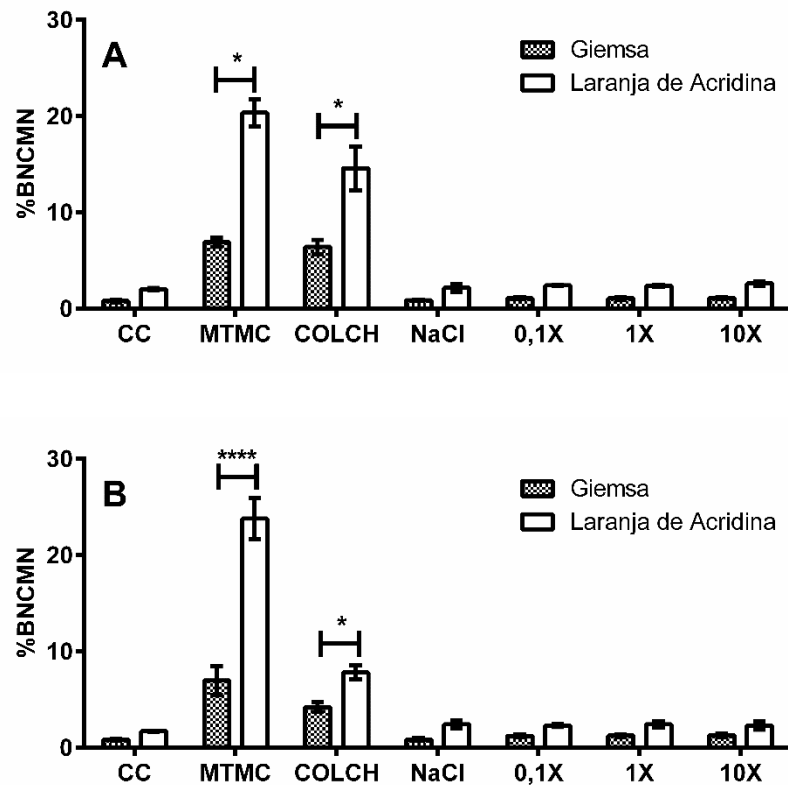


Figura 23: Comparação da %BNCMN entre as amostras coradas com Giemsa e laranja de acridina. (A) UBI₂₉₋₄₁, (B) DOTATATO. Barras representam valores de erro-padrão das médias. (CC): controle celular; (MTMC): Mitomicina; (COLCH): Colchicina. p<0,05: (*). P<0,0001(****).

Na tabela 2 podemos observar a comparação dos tempos de preparo, o volume de rejeito por amostra e o tempo de análise por lâmina das técnicas convencional e modificada.

Tabela 2: comparação entre os tempos para realização da metodologia convencional e modificada do ensaio de micronúcleo

	Metodologia	Tempo de preparação (min/por amostra)	Tempo de análise (min/ por lamina)	Volume de rejeitos (mL/por amostra)
CONVENCIONAL	Destacamento das células	5-7	50 – 90	15 (3 etapas de centrifugação)
	Lavagem da suspensão celular:	5-7		
	Tratamento com solução isotônica	15-1		
	Fixação: 3 etapas sucessivas de fixação e lavagem por centrifugação: 3 x 15	18		
	Gotejamento e adesão em lâminas de microscopia	3-5		
	Coloração (anterior à análise):	15-20		
	Total: 58 – 74			
MODIFICADA	Lavagem de células aderidas	5-7	5 - 60	3 (fixação direta nas lâminas)
	Tratamento com solução isotônica	15-17		
	Fixação em solução de formaldeído	15-17		
	Lavagem	10-12		
	Coloração (no momento da análise)	1		
		Total: 46 - 54		

6 DISCUSSÃO

O teste de citotoxicidade tem como objetivo a detecção imediata de deficiências celulares mediante avaliação do número de células viáveis após um tratamento com substâncias-teste. Desta maneira contribui para seleção de concentrações adequadas para estudos toxicológicos subsequentes, sendo tais como a toxicidade *in vivo* de uma concentração ou o estudo de segurança farmacológica (OECD/GD 129, 2010). A detecção e o modo de ação tóxica sobre níveis celulares e moleculares possui grande importância dentro da pesquisa não-clínica. Para a indústria farmacêutica o teste de citotoxicidade é utilizado como medida para rastreio de novos candidatos de fármacos (UKELIS et al., 2007). Para que o ensaio de citotoxicidade seja considerado aceitável, pelo menos uma das concentrações avaliadas deve apresentar citotoxicidade $> 0\%$ e $\leq 50\%$ de viabilidade celular, e citotoxicidade $> 50\%$ e $< 100\%$ (OECD/GD 129, 2010).

Na figura 4 observa-se que os resultados confirmam que administrações dos fármacos DOTATATO e Ubiquidina₂₉₋₄₁ nas concentrações testadas não produzem agressão às células, apresentando a viabilidade celular mantida acima de 90% em todas as situações do teste. Desta forma os valores de viabilidade celular das culturas tratadas com os compostos-teste não mostraram diferença significativa em relação aos controles.

Peptídeos radio marcados acoplados com DOTA como quelante bifuncional foram desenvolvidos e mostraram estabilidade *in vivo*, farmacocinética favorável e absorção elevada e específica mediada pelo receptor do tumor. Estudos recentes mostraram que peptídeos marcados com ⁶⁸Ga tem grande potencial para diagnóstico de tumores neuroendócrinos através da PET, mostrando eficácia superior em relação a outros métodos de imagem mais usados (AMOJTAHEDI et al. 2014).

A metodologia de preparação de ⁶⁸Ga-DOTATATO está bem caracterizada e padronizada para a prática clínica (BREEMAN et al. 2011). Este

radiofármaco vem sendo utilizado de maneira abrangente por diversos países para diagnóstico de tumores neuroendócrinos. (ALBANUS et al. 2015). Em Março de 2014 foi concedida pelo FDA e EMEA à empresa *Advanced Accelerator Applications* (AAA) a autorização para designar o ^{68}Ga -DOTATATO como *orphan drug*. Os medicamentos ou produtos biológicos que atendem a esta designação são definidos como seguros e eficazes para tratamento, diagnóstico ou prevenção de doenças/doenças raras que afetam menos de 200.000 pessoas em os EUA, ou que afetam mais de 200.000 pessoas, mas não há expectativa de recuperação de custos de desenvolvimento e comercialização a prazos estabelecidos por critérios financeiros. A denominação de *orphan drug* qualifica o patrocinador da droga para vários incentivos de desenvolvimento da The Orphan Drug Act (ODA), incluindo os créditos fiscais para o teste clínico qualificado (FDA, 2015). Esta resolução deve promover o rápido desenvolvimento do agente para o benefício dos pacientes GEP-NET (portadores de tumores neuroendócrinos gastro-entero-pancreáticos) ao menos nos Estados Unidos e na Europa.

A Ubiquidina₂₉₋₄₁ está sendo testada de maneira eficaz em diferentes trabalhos de pesquisa. Os estudos demonstraram que $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI₂₉₋₄₁ mostra uma especificidade aos tecidos-alvo com precisão admirável, com bom rendimento de marcação, além de pureza radioquímica (>97 %) e estabilidade compatíveis com aplicações *in vivo*. As imagens provenientes de gamagrafias mostraram uma rápida depuração renal, sendo um radiofármaco promissor para uso na medicina nuclear (WELLING et al., 2002; FERRO-FLORES et al., 2005; EBENHAN et al., 2014;).

Os resultados de %BNCMN e CBPI encontrados a partir das culturas celulares que foram tratadas com DOTATATO e Ubiquidina₂₉₋₄₁ utilizando o método tradicional de micronúcleo mediante a coloração com Giemsa, mostraram que para o DOTATATO foi encontrada diferença estatística de %BNCMN em relação aos controles CC apenas em culturas tratadas com controles positivos (MTMC e COLCH). Isso mostra que os controles positivos cumpriram sua função de genotoxicidade, assim como descrito nas normativas citadas, tornando a comparação confiável e mantendo assim a eficácia do teste. Também foi observado que nenhuma das concentrações utilizadas (0,70ng / mL: 0,1X; 7,0ng / mL: 1X; e 70ng / mL: 10X) de DOTATATO causou danos ao DNA e não houve

aumento na porcentagem de células binucleadas com micronúcleos de maneira significativa em relação às células não tratadas, mostrando assim sua segurança para uso. Da mesma forma, o CBPI mostrou que apenas os controles positivos induziram diferenças significantes no ciclo celular conforme esperado. Da mesma forma, nas culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁ foi observada diferença estatística entre o controle celular (CC) em relação aos controles positivos MTMC e COLCH para a %BNCMN e o CBPI. As concentrações usadas de Ubiquidina₂₉₋₄₁ (0,4 ng / mL: 0,1X; 4 ng / mL: 1X; 40 ng / mL: 10X) não apresentaram toxicidade no contexto do núcleo celular, concordando assim com os parâmetros de administração e de toxicidade da OECD 487 (2010).

Os resultados encontrados utilizando o método modificado do micronúcleo e corados com laranja de acridina nas culturas celulares tratadas com DOTATATO e Ubiquidina, sem e com ativação metabólica (S9), foram representados em gráficos de CBPI e % BNCMN. Para o CBPI de ambos os radiofármacos sem S9, encontramos diferenças significantes na redução da taxa mitótica das células tratadas com MTMC e COLCH. Da mesma forma, as amostras contendo ativação metabólica mostraram uma diferença significativa relativa à redução da taxa de divisão celular no controle positivo Benzo[a]pireno em relação aos controles CC. No que se refere ao potencial de proliferação celular, foi possível observar que tanto o DOTATATO como a Ubiquidina não possuíram nenhum potencial genotóxico que possa inibir ou acelerar a proliferação celular, diferentemente aos controles positivos. Os dados obtidos contribuem à verificação de que este fármaco está dentro dos parâmetros de segurança exigidos pelas normas internacionais (OECD, 2010; ICH, 1995).

Os resultados referentes às análises de FMN para DOTATATO e Ubiquidina mostraram que nenhuma das concentrações utilizadas de ambos radiofármacos foi capaz de induzir quebra no DNA, não induzindo efeito genotóxico estatisticamente significativo com relação aos controles. Houve um aumento na porcentagem de micronúcleos estatisticamente significativo nos controles positivos (mitomicina C, colchicina e benzo[a]pireno) em relação aos controles (CC). Nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de induzir quebra no DNA, não induzindo efeito genotóxico estatisticamente significativo com relação aos controles.

A avaliação de porcentagem de células binucleadas com micronúcleos compõe um dos principais ensaios pré-clínicos como base primordial para qualquer tipo de medicamento utilizado para diagnóstico e tratamento (fármacos e radiofármacos) de doenças, os quais precisam passar por testes específicos que garantam sua eficácia e segurança, e assim possam ser comercializados (HARAPANHALLI, 2010).

O ensaio de micronúcleo é considerado como marcador de toxicidade genética e utilizado como teste de rotina por possuir uma avaliação rápida para aberração cromossômica interfásica *in vitro* (DIAZ et al. 2007). Por este motivo tem sido automatizado de maneira semelhante ao manual padrão *in vitro* do ensaio de micronúcleo. Sendo a principal diferença a marcação de células por compostos fluorescentes e a substituição dos operadores treinados a ler visualmente lâminas sob o microscópio pela utilização de análise de imagem por software (DIAZ et al. 2007) ou pela automatização da técnica utilizando citometria de fluxo descrito principalmente para eritrócitos de roedores (STYLES et al. 2001; BRYCE, 2007). Porém estes métodos podem ser economicamente pouco viáveis para pequenos laboratórios ou em vias de crescimento.

Vários autores consideram que o teste do micronúcleo com coloração por laranja de acridina para toxicologia ambiental, um ensaio simples e vantajoso na análise de material por permitir um fácil reconhecimento dos eventos em relação a técnica convencional de MN utilizando corante Giemsa (POLARD, 2011; ÇAVAS, 2008; NERSESYAN, et al. 2006). O corante laranja de acridina é recomendado pela (OECD 487, 2010) para uso no teste de micronúcleo. Desta maneira a discriminação de células binucleadas com micronúcleos, células mononucleadas e células multinucleadas torna-se rápida e de maior confiabilidade. Na figura 7 é possível observar claramente a diferença entre a coloração das amostras com laranja de acridina e Giemsa em quanto ao aspecto visualizado no microscópio, verificando claramente uma maior facilidade para análise das amostras em comparação a Giemsa (Figuras 8 e 9).

Diaz e colaboradores (2007) usaram como critério de avaliação para porcentagem de frequência de micronúcleos os resultados positivos que apresentam diferença estatística significativa $p < 0,05$ comparados ao controle

celular correspondendo a um aumento ≥ 3 vezes na porcentagem de frequência de micronúcleos. Estes autores classificam este dano igual ou menor a duas vezes o dano encontrado nos controles, sendo neste caso caracterizado como levemente genotóxico. Frequências de dano maiores que três vezes as encontradas nos controles são indicativas de compostos fortemente genotóxicos (ESTEVEZ-PEDRO, 2013). A OECD 487 (2010) exige parâmetros de administração dos fármacos testes em *vitro*, para garantir seu não potencial genotóxico colocando critérios de aceitabilidade a serem cumpridas, os seguintes critérios são considerados para avaliação dos resultados. Um resultado positivo no ensaio de micronúcleo indica que a substância teste induz a perdas e quebras cromossômicas; um resultado negativo indica que nas condições utilizadas a substância teste não induz quebras, perda ou ganho cromossômicas. Para considerar estes critérios foi necessário o uso de substâncias controles positivos com potencial genotóxico como são a MTMC, COLCH e BZP os quais mostraram interferência na cinética do ciclo celular e toxicidade nuclear em relação ao CC, como esperado por serem controles positivos e possuir atividade aneugênica e clastogênica cumprindo com os critérios da OECD.

Nenhuma das concentrações teste utilizadas de DOTATATO e Ubiquidina atingiu estes parâmetros em amostras processadas segundo o protocolo modificado, mostrando sua segurança farmacológica também por esta metodologia. Concordando com os parâmetros de administração e de toxicidade da OCDE, a ubiquidina não apresentou em nenhuma das concentrações utilizadas toxicidade em nível celular, com ou sem ativação por S9. Portanto é considerada segura para uso humano. Também não foram observadas mudanças nos índices de proliferação, indicando que o composto não tem influência no ciclo celular. Também foi realizada uma avaliação de comparação de contagens realizadas por dois analistas independentes sendo observado este resultado na figura 15. A comparação mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens dos analistas em relação ao CBPI de culturas tratadas com Ubiquidina₂₉₋₄₁, com ou sem ativação metabólica. Houve, portanto, concordância entre as contagens realizadas, mostrando que as modificações propostas na metodologia de FMN preservaram a reprodutibilidade das análises por microscopia.

Nesta comparação foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as contagens relacionadas aos controles positivos Colchicina e Benzo[a]pireno. Embora estes controles possuam atividades aneugênica e clastogênica respectivamente, não é possível assumir que esta diferença esteja relacionada à atividade metabólica dos mesmos, sendo mais provável atribuir esta inconsistência ao efeito do tempo de leitura entre um analista e outro, ou ainda à degradação do material fixado por erro na manipulação do analista. Embora sejam observadas estas discrepâncias, foi possível mostrar que todas as amostras e os controles negativos não mostraram diferenças estatísticas significativas entre as contagens dos analistas, mantendo assim a compatibilidade com o ensaio. Os controles positivos Colchicina e Benzo[a]pireno se mantiveram mostrando sua ação tóxica sendo três vezes maiores que os controles, mostrando resultados reprodutíveis e confiáveis seguindo as normas da OECD 487. Futuras repetições com maior quantidade de amostras poderiam esclarecer estes resultados.

Os resultados da comparação entre as colorações com Giemsa e laranja de acridina dos índices de proliferação celular observados na figura 16 nos mostram que as concentrações do radiofármaco como os controles celulares permaneceram sem diferença significativa tanto na coloração com laranja de acridina como as amostras coradas com Giemsa. Houve uma diferença estatística nas culturas celulares tratadas com colchicina. Observa-se que as duas colorações mostraram que o controle positivo colchicina cumpriu sua função como agente aneugênico como mostrado por Kirsch-Volders e colaboradores (1997) na qual a Colchicina pode apresentar expressivas alterações cromossômicas proporcionais ao aumento das concentrações avaliadas em concentrações entre 0,025 e 0,038 μM . No caso a concentração final utilizada para colchicina no ensaio foi 1,1 μg / mL equivalente a 0,275 μM , capaz de causar efeitos aneugênicos bem definidos, porém existe diferença estatística nas comparações das amostras com colchicina. Mostrando um menor CBPI na coloração com laranja de acridina em relação as amostras coradas com Giemsa, pode-se assumir que esta diferença é resultado da contagem realizada entre analistas independentes, mas foi considerado irrelevante, pelo fato da colchicina ter mantido sua função aneugênica e a relação desta diferença relacionada à

percepção dos analistas na contagem do material. Da mesma forma é observado na figura 17a %BNCMN que houve diferença estatística somente nos controles positivos (COLCH e MTMC). Estes controles mantiveram sua função aneugênica e clastogênica. No entanto, foi possível observar um aumento na porcentagem de MN maior nas amostras coradas com laranja de acridina o que possibilitou observar maior número de micronúcleos. Este fato seria então consequência do aumento da confiabilidade na contagem de núcleos e micronúcleos, vantagem atribuída ao corante fluorescente laranja de acridina e a sua característica seletiva para ácidos nucleicos, em especial o DNA. (ÇAVAS, 2007; POLARD et al., 2010). Considerando assim a contagem dos núcleos e micronúcleos uma maneira segura sem a necessidade de eliminar eventos por assumir falsos positivos, como acontece nas amostras com Giemsa, na qual geralmente eventos são discriminados para evitar falsos positivos. Foi observado também que o tempo utilizado para desenvolver a técnica modificada foi reduzido em comparação à técnica convencional (tabela 2). A metodologia modificada possibilitou um rápido desenvolvimento do teste, economia de tempo e recursos, além de reduzir o volume de rejeitos de maneira considerável proporcionando um grande impacto econômico, humano e ambiental.

7 CONCLUSÃO

DOTATATO e Ubiquidina₂₉₋₄₁ não apresentaram citotoxicidade, genotoxicidade ou potencial aneugênico entre 10 a 1000% das concentrações máximas utilizadas em pacientes. A metodologia modificada possibilitou economia de tempo e recursos, além de reduzir o volume de rejeitos.

APÊNDICE A:

Artigo completo em anexo de evento – INAC 2015

2015 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2015
São Paulo, SP, Brazil, October 4-9, 2015

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR - ABEN
ISBN: 978-85-99141-06-9

IN VITRO CITOTOXICITY TESTING OF UBIQUICIDIN 29-41-^{99m}Tc.

Ivette Z. Ocampo¹, Kayo Okazaki¹, Priscila Passos², Natalia M. Esteves-Pedro², Luis Alberto Pereira Dias³, Olga Z. Higa^{1,2}, Fabiana M. da Silva² and Daniel P. Vieira¹

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)
Centro de Biotecnologia
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP, Brazil
dpvieira@ipen.br

² Laboratório Biosíntesis, Ltda.
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP, Brazil
fabiana@biosintesis.com.br

³ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)
Diretoria de Radiofarmácia
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

The work carried out cytotoxicity tests using a radiopharmaceutical compound produced at IPEN/CNEN-SP to certify its safety through *in vitro* cytotoxicity tests. Since 2009, the Brazilian regulatory agency (ANVISA) requires that such tests have to be carried out following good laboratory practices (GLP) and in accordance to the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) guidelines in order to certify its safety for medical use. Those guidelines comprises series of technical recommendations performed to assure quality of experiments. The study chose Ubiquicidin 29-41, an antimicrobial peptide used to discriminate bacterial infection foci from inflammatory sites. Amounts of UBI₂₉₋₄₁ were conjugated or not to ^{99m}Tc and diluted to equivalent concentrations of 10, 100 and 1000% of the maximum dose (or activity) administered in adults. Possible cytotoxic effects were evaluated in comparison to untreated controls as well as positive and negative damage controls. Both full (radioactive) radiopharmaceuticals, as their precursors (only molecules without conjugation to isotopes) showed no significant cytotoxic effect (citotoxicity ≤ 10%). The study was conducted for the first time in the country comprising preclinical testing of this radiopharmaceutical in accordance with internationally accepted quality parameters, ensuring the safety of its use and enabling inclusion in the pharmaceutical regulatory agenda.

1. INTRODUCTION

Nuclear medicine technologies have been used for years to detect or treat various types of pathologies. The use of these technologies often involve the administration of radiopharmaceuticals, which are specific bioactive compounds that carries radioactive isotopes and has the ability to turn cells, tissues or organs into detectable targets. Due to its efficacy and safety, the use of radiopharmaceuticals has been expanded, in general, in all countries. Ubiquicidin is a synthetic cationic peptide with antimicrobial activity with affinity for cell walls of microorganisms [1]. Its use as a diagnostic radiopharmaceutical for fungal infections [2]

and bacterial [3] has been shown to be promising. One of its main positive features is to be able to differentiate septic inflammatory foci regions of aseptic inflammation, helping in the choice of treatment of patients suffering from various infections [4]. This bioactive compound potentially have the ability to induce significant cytotoxic or genotoxic damage, and should be considered as pharmacological non-radioactive compounds; analysis of unlabeled compound is encouraged [5], and thus prone to be tested in pre-clinical trials [6,7,8]. Ubiquicidin is administered in patients in maximum amount of 25 μ g, (or maximum activity of 10 μ Ci) per injection.

In vitro cytotoxicity tests are performed following well established protocols. Usually, Chinese hamster ovary cells (CHO) are exposed to various concentrations of test substances and negative or positive controls. Cell viability can be expressed in percentages relative to unexposed controls. The work tested Ubiquicidin 29-41 (peptide comprising the sequence between aminoacids 29 to 41 from complete protein sequence) conjugated or not with 99m-Tc, an isotope used in nuclear medicine diagnostic procedures, in peptide concentrations carrying up to the equivalent of ten times (10X) maximum injected activity in human adults.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell Cultures

Chinese hamster ovary cells (CHO-K1; ATCC CCL-61) were routinely maintained by Biosintesis Laboratory, Ltda. All experimental cultures were maintained using DMEM as culture medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) without antibiotics in incubators with constant temperature (37°C) and controlled atmosphere containing 95% O₂ and 5% CO₂. After confluence, cells were detached with Trypsin/EDTA (0.5%/5mM), diluted in complete medium and kept in room temperature until experiments (inferior to 20 min).

2.2. Ubiquicidin 29-41

Commercial Ubiquicidin 29-41 (UBI₂₉₋₄₁) was provided as lyophilized powder by the Quality Assurance of Center Radiopharmacy (CR) of the Institute of Nuclear Energy Research (IPEN/CNEN-SP). Using the "standard man" calculations (70kg and 5.5 L of blood), sterile peptide samples were first diluted in deionized water to stock concentrations that were used to make the 0.045 ng/mL of UBI₂₉₋₄₁ solution in medium (DMEM without serum), corresponding to concentration equivalent to ten times the maximum administered peptide mass to adult patients (10X). Primary dilutions were diluted in DMEM without serum to 0.00045 ng/ml (1/10X) and 0.0045 ng/mL (1X). UBI₂₉₋₄₁ conjugated with 99m-Tc was produced by Radiopharmacy Center at Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN/CNEN-SP), bearing radioactive concentrations from 5 to 6mCi/mL. After arriving at cell culture room, activities were recalculated taking account of elapsed time from production to experimentation using radioactive decay classic equation. Samples were diluted as same as non-radioactive, considering 10 μ Ci as maximum dose in adults. For testing of radioactive peptides, the radioactive concentrations were 0.00018, 0.0018 and 0.018 μ Ci/mL (0.1, 1 and 10X, respectively).

2.3. Cytotoxicity testing

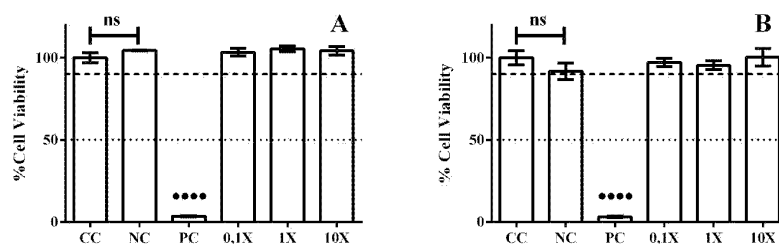
Sodium chloride (0.9% in medium, w/v) was used as negative control (NC), incapable to induce cytotoxicity in the test system. Latex rubber fragments (1cm²) were UV-sterilized (30 min each side in sterile chamber) and added to 10mL of DMEM (0.2g/mL medium). After incubation for 24h (37°C), latex conditioned media was sterilized by filtering (0.22µm) and used as positive controls (PC), in order to induce strong cytotoxicity in test system. CHO cultures were prepared as suspensions in DMEM+FBS 10%, and plated in 96-well plates in 10,000 cells/well density (100µL).

After allowing 24±2 hours for proper cell adhesion, media were replaced by 100µL of medium containing 0.9% NaCl (negative controls), or 0.5% (v/v) of 2mg/mL latex conditioned medium (positive controls). Experimental wells received 100µL of DMEM containing 0.045 (10X), 0.0045 (1X) or 0.00045 (0.1X) ng/mL. Cells in experiments using 99m-Tc-labelled peptides received 100µL of medium containing 0.018 (10X), 0.0018 (1X) or 0.00018 (0.1X) nCi/mL. Control cells (CC) received 100 µL of medium. All groups were incubated for 24±2 hours in quadruplicates.

Upon completion of this incubation period, culture media was aspirated and cells received 2mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboximethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS; *CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, Promega) and 0.9% of phenazine methosulfate (PMS, Sigma-Aldrich, CAS 299-11-6) diluted in DMEM (120 µL). After 2 hours of incubation (37°C, 5%CO₂, 95% O₂), metabolically active cells converted the compound MTS in the presence of PMS in formazan. Absorbance values were obtained by spectrophotometric readings at 490nm, and converted into percentages of cell viability relative to controls (CC). Absorbance values of control untreated cells represented 100% of cell viability. A dilution of test compound was not considered cytotoxic if cell viability values were at least 90% of untreated or negative controls. Two-way ANOVA and Dunnett post-analysis were performed to find statistical relevance between cell viability values comparing to controls.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Citotoxicity values obtained from experiments are shown in Fig. 1.



INAC 2015, São Paulo, SP, Brazil.

Figure 1: Ubiquicidin 29-41 conjugated (A) or not (B) with ^{99m}Tc was not able to induce cytotoxicity in CHO cells. CC: Control cells (only medium); NC: Negative control (NaCl 0.9%); PC: Positive control (latex fragments, 0.5%). 0.1X, 1X and 10X corresponds to 10, 100 or 1000% of maximum activity or concentration allowed to administration in adult patients (10 μ Ci or 25 μ g). Dashed (----) and punctuated (····) lines indicate 90 and 50% of control cell viability. Bars represent standard error of means. (●●●●): p<0,0001.

The present experiments could not show cytotoxicity in any level in cells exposed to all tested concentrations of ubiquicidin, conjugated or not with ^{99m}Tc. Cell viability values of test cultures (% of controls) were not reduced significantly (p>0.05). Viability of control (untreated) cells was statistically equivalent to negative controls exposed to NaCl 0.9%. Latex-conditioned medium (PC) induced very prominent cytotoxicity (p<0.0001). The work adopted the OECD protocol for cytotoxicity testing (OECD, 2010), which describes any concentration of a given compound as cytotoxic if it can reduce cell viability in at least 10% relative to controls (cell viability equivalent to \leq 90%). Regarding this parameter, UBI₂₉₋₄₁ or UBI₂₉₋₄₁ ^{99m}-Tc could not be considered cytotoxic.

In this scale, radiation could not induce any damage to cultures. Activities ranging from nanocuries (nCi) per well were not able to raise (or reduce) cytotoxicity, what could lead to an interpretation in which UBI₂₉₋₄₁ ^{99m}-Tc can be safe even if using radioactive concentrations near from 100 μ Ci/injection when administered in adults. Cytotoxicity of peptide itself also could not be detected by the present test system.

The work could ascertain the safety of ubiquicidin administration using *in vitro* cytotoxicity testing, even if in aberrant and hypothetical case in which a patient could receive ten times the maximum recommended dose.

Side studies are being conducted to assess safety of this peptide regarding genotoxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

The group wish to thank Drs. Elaine Bortoletti de Araújo and Maria Teresa Coulturato for invaluable assistance. The work was completely supported by IPEN/CNEN-SP resources.

REFERENCES

1. Akhtar MS, Qaisar A, Irfanullah J, Iqbal J, Khan B, Jehangir M, Nadeem MA, Khan MA, Afzal MS, Ul-Haq I, Imran MB. "Antimicrobial peptide ^{99m}Tc-ubiquicidin 29-41 as human infection-imaging agent: clinical trial." *J Nucl Med.* 46(4):567-73 (2005)
2. Lupetti A, de Boer MG, Erba P, Campa M, Nibbering PH. "Radiotracers for fungal infection imaging." *Med Mycol.* 49 Suppl 1:S62-9. (2011).

3. Brouwer CP, Sarda-Mantel L, Meulemans A, Le Guludec D, Welling MM. "The use of technetium-99m radiolabeled human antimicrobial peptides for infection specific imaging." *Mini Rev Med Chem.* **8**(10):1039-52 (2008).
4. Brouwer CP, Wulferink M, Welling MM. "The pharmacology of radiolabeled cationic antimicrobial peptides." *J Pharm Sci.* **97** (5):1633-51 (2008).
5. Harapanhalli RS. "Food and Drug Administration requirements for testing and approval of new radiopharmaceuticals." *Semin Nucl Med.* **40**(5):364-84 (2010).
6. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH Harmonised Tripartite Guideline. S2 (R1). Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals (http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf) (2011)
7. Organisation for Economic Co-operation and Development OECD Guidelines for the testing of Chemicals – Test 487: In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9748701e.pdf?expires=1381712350&id=id&accname=guest&checksum=352D2E5C23387C60915480F04D723DE1> (2010)
8. World Health Organization – WHO. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparation - RADIOPHARMACEUTICALS Final text for addition to The International Pharmacopoeia. <http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/Radgenmono.pdf>. (2008)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS (AAA). **AAA Annual Report 2014** Disponível em: < http://www.adacap.com/wp-content/uploads/2015/05/AAA_Rapport-Annuel-2014_BD.pdf>
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) **Resolução RDC nº 63, de 18 de dezembro de 2009**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a8bee00046b4303abec8fe2e64280806/Resol-RDC-63-09+\(2\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a8bee00046b4303abec8fe2e64280806/Resol-RDC-63-09+(2).pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 18 de janeiro 2016
3. AKHTAR, Muhammad Saeed et al. Antimicrobial peptide 99mTc-ubiquicidin 29–41 as human infection-imaging agent: clinical trial. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 46, n. 4, p. 567-573, 2005.
4. ALBANUS, D. R. et al. Clinical value of 68 Ga-DOTATATE-PET/CT compared to stand-alone contrast enhanced CT for the detection of extra-hepatic metastases in patients with neuroendocrine tumours (NET). **European journal of radiology**, v. 84, n. 10, p. 1866-1872, 2015.
5. ASSADI, Majid et al. Diagnostic value of 99mTc-ubiquicidin scintigraphy for osteomyelitis and comparisons with 99mTc-methylene diphosphonate scintigraphy and magnetic resonance imaging. **Nuclear medicine communications**, v. 32, n. 8, p. 716-723, 2011.
6. BALDELLI, Roberto et al. Somatostatin analogs therapy in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: current aspects and new perspectives. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, 2014.
7. BEIKI, Davood et al. 99mtc-Ubiquicidin [29–41], a Promising Radiopharmaceutical to Differentiate Orthopedic Implant Infections from Sterile Inflammation. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 12, n. 2, p. 347, 2013.

8. BREEMAN, Wouter AP et al. 68 Ga-labeled DOTA-peptides and 68 Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research, clinical applications, and future perspectives. In: **Seminars in nuclear medicine**, 2011. p. 314-321.
9. BROUWER, C. P. J. M. et al. The use of technetium-99m radiolabeled human antimicrobial peptides for infection specific imaging. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1039-1052, 2008
10. BROUWER, Carlo PJM; WULFERINK, Marty; WELLING, Mick M. The pharmacology of radiolabeled cationic antimicrobial peptides. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 5, p. 1633-1651, 2008.
11. BRYCE, Steven M. et al. In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 630, n. 1, p. 78-91, 2007.
12. ÇAVAŞ, Tolga. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 352-358, 2008.
13. ÇELİK, Ayla; ÖĞENLER, Oya; ÇÖMELEKOĞLU, Ülkü. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, v. 20, n. 6, p. 411-415, 2005.
14. CESCATO, Renzo et al. Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 47, n. 3, p. 502-511, 2006.
15. COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN) **Produção de radiofármacos**. Rio de Janeiro 2015 Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/radiofarmacos>

16. DIAZ, Dolores et al. Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 630, n. 1, p. 1-13, 2007.
17. ESTEVES-PEDRO, Natalia Mencacci. Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos. 2013. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
18. EBENHAN, Thomas et al. Preclinical evaluation of ⁶⁸Ga-labeled 1, 4, 7-triazacyclononane-1, 4, 7-triacetic acid-ubiquicidin as a radioligand for PET infection imaging. ***Journal of Nuclear Medicine***, v. 55, n. 2, p. 308-314, 2014.
19. FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. ***Nature protocols***, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.
20. FERRO-FLORES, G. et al. Kit for instant ^{99m}Tc labeling of the antimicrobial peptide ubiquicidin 29-41. ***Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry***, v. 266, n. 2, p. 307-311, 2005.
21. FERRO-FLORES, Guillermina et al. In vitro and in vivo assessment of ^{99m}Tc-UBI specificity for bacteria. ***Nuclear medicine and biology***, v. 30, n. 6, p. 597-603, 2003
22. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Designating an Orphan Product: Drugs and Biological Products 2015**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ForIndustry/DevelopingProductsforRareDiseasesConditions/HowtoapplyforOrphanProductDesignation/default.htm>> Acesso: 18 de janeiro 2016
23. HARAPANHALLI, Ravi S. Food and Drug Administration requirements for testing and approval of new radiopharmaceuticals. In: ***Seminars in nuclear medicine***. 2010. p. 364-384.

24. HEDDLE, John A. et al. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, 26(1) p. 3-10, 2011.
25. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Inca/Pro-Onco) - Ministério Da Saúde. **Estimativa da incidência de câncer no Brasil 2014**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso: 18 de dezembro de 2015.
26. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Inca/Pro-Onco) - Ministério Da Saúde. **Tratamento pelo sistema único de saúde. Rio de Janeiro, 2013**. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento/onde_tratar_sus Acesso: 18 de dezembro de 2015.
27. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO) **Avaliação da Conformidade**. São Paulo, 2015 Disponível em: <http://inmetro.gov.br/inmetro/oque.asp>. Acesso: 18 de janeiro de 2016
28. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (AIEA) 2001 **Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment -technical reports series 405**. Disponível em: http://wwwpub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/TRS405_scr.pdf
29. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Harmonised Tripartite Guideline. S2A. Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals 1995**. Disponível em: <http://www.ich.org>.
30. KAYANI, Irfan et al. Functional imaging of neuroendocrine tumors with combined PET/CT using 68Ga-DOTATATE (DOTA-DPhe1, Tyr3-octreotate) and 18F-FDG. *Cancer*, v. 112, n. 11, p. 2447-2455, 2008.
31. KIRSCH-VOLDERS, Micheline et al. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 392, n. 1, p. 19-30, 1997.

32. KUMAR, V. Radiolabeled white blood cells and direct targeting of micro-organisms for infection imaging. ***The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging***, v. 49, n. 4, p. 325-38, 2005.
33. LI, Jing et al. Urinary cytology with acridine orange fluorescence is highly valuable for predicting high-grade upper urinary tract urothelial carcinoma. ***International journal of clinical and experimental pathology***, v. 7, n. 2, p. 774, 2014.
34. LUPETTI, Antonella et al. Radiolabelled antimicrobial peptides for infection detection. ***The Lancet - Infectious diseases***, v. 3, n. 4, p. 223-229, 2003
35. LUPETTI, Antonella et al. Radiotracers for fungal infection imaging. ***Medical mycology***, v. 49, n. sup1, p. S62-S69, 2011.
36. MCKINLEY, Eliot T. et al. Limits of [18F]-FLT PET as a biomarker of proliferation in oncology. ***PLoS One***, v. 8, n. 3, p. e58938, 2013.
37. MEARADJI, Amir et al. Somatostatin receptor gene therapy combined with targeted therapy with radiolabeled octreotide: a new treatment for liver metastases. ***Annals of surgery***, v. 236, n. 6, p. 722, 2002.
38. MOJTAHEDI, Alireza et al. The value of 68Ga-DOTATATE PET/CT in diagnosis and management of neuroendocrine tumors compared to current FDA approved imaging modalities: a review of literature. ***American journal of nuclear medicine and molecular imaging***, v. 4, n. 5, p. 426, 2014.
39. MURAKAMI, Daniella et al. Genotoxic and cytotoxic effects of 60Co γ -rays and 90Sr/90Y β -rays on Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). ***Radiation and environmental biophysics***, v. 43, n. 2, p. 91-99, 2004.
40. NAGAMATI, Lucio Takeshi. ***Marcação do peptídeo dota-tyr3-octreotato com radioiodo e estudo da biodistribuição e afinidade por células de***

carcinoma pancreático. 2006. Dissertação (mestrado em tecnologia nuclear - aplicações) - instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
Disponível: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-30052007-155826/>>. Acesso em: 2014-09-18

41. NERSESYAN, Armen et al. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 10, p. 1835-1840, 2006.
42. OCAK, M. et al. Full automation of 68 Ga labelling of DOTA-peptides including cation exchange prepurification. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 68, n. 2, p. 297-302, 2010.
43. ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (2010) **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests.- 125**. Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en)>
44. ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (2010) **OECD guidelines for the testing of chemicals – test 487: in vitro mammalian cell micronucleus test**. Disponível em: <http://www.oecd.org>
<http://www.oecd.org/docserver/download/9748701e.pdf?expires=1381712350&id=id&accname=guest&checksum=352d2e5c23387c60915480f04d723de1>
45. PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKO, Telma Mary; OHARA, Mitsuko Taba. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. São Paulo, Atheneu, 2003
46. POLARD, Thierry et al. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 1, p. 144-149, 2011.

47. PRICE, Patricia M.; GREEN, Melanie M. Positron emission tomography imaging approaches for external beam radiation therapies: current status and future developments. *The British journal of radiology*, 2014.
48. RAHNAMAEIAN, Mohammad. Antimicrobial peptides: modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant signaling & behavior*, v. 6, n. 9, p. 1325-1332, 2011.
49. SADIKOVIC, Bekim; RODENHISER, David I. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 216, n. 3, p. 458-468, 2006.
50. SIGNORE, Alberto et al. Can we produce an image of bacteria with radiopharmaceuticals? *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 35, n. 6, p. 1051-1055, 2008.
51. STYLES, J. A. et al. Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry. *Cytometry*, v. 44, n. 2, p. 153-155, 2001.
52. VELIKYAN, Irina. Prospective of ⁶⁸Ga-radiopharmaceutical development. *Theranostics*, v. 4, n. 1, p. 47, 2014.
53. WELLING, Mick M. et al. Radiochemical and biological characteristics of ^{99m}Tc-UBI 29–41 for imaging of bacterial infections. *Nuclear medicine and biology*, v. 29, n. 4, p. 413-422, 2002.
54. ZHU, Aizhi; LEE, Daniel; SHIM, Hyunsuk. Metabolic positron emission tomography imaging in cancer detection and therapy response. In: *Seminars in oncology*. WB Saunders, 2011. p. 55-69.