AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Análise automatizada da frequência de micronúcleos em culturas celulares expostas
a agentes genotóxicos físicos e químicos**

LUMA RAMIREZ DE CARVALHO

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

**Orientador:
Prof. Dr. Daniel Perez Vieira**

**São Paulo
2019**

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

**Análise automatizada da frequência de micronúcleos em culturas celulares expostas
a agentes genotóxicos físicos e químicos**

LUMA RAMIREZ DE CARVALHO

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

Orientador:
Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

Versão Corrigida

São Paulo
2019

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

Como citar:

RAMIREZ DE CARVALHO, L. ***Análise automatizada da frequência de micronúcleos em culturas celulares expostas a agentes genotóxicos físicos e químicos***. 2019. 58 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

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

Ramirez de Carvalho, Luma
Análise automatizada da frequência de micronúcleos em
culturas celulares expostas a agentes genotóxicos físicos e
químicos / Luma Ramirez de Carvalho; orientador Daniel Perez
Vieira. -- São Paulo, 2019.
58 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. radiação. 2. fármacos. 3. micronúcleo. 4.
genotoxicidade. I. Perez Vieira, Daniel, orient. II. Título.

*Dedico esta dissertação à minha grande amiga Mayara
Ledier de Azevedo (in memorian), que me apresentou a
este mundo e esteve do meu lado nessa jornada
acadêmica. Amo você, amiga. Saudades eterna!*

Agradecimentos

FIM. É com muito alívio e felicidade que eu encerro este trabalho, que misturou todos os tipos sentimentos: felicidade, frustração, tensão, empolgação, determinação... enfim, persisti e consegui. Só quem faz pós-graduação sabe a emoção de conquistar um título.

Meu primeiro agradecimento vai para minha família e amigos, que me apoiaram e acreditaram em mim.

Ao Centro de Radiofarmácia IPEN/CNEN-SP, por fornecer os fármacos estudados, em especial ao Dr Luis Alberto Pereira Dias, que se disponibilizou a avaliar meu trabalho.

Ao Centro de Biotecnologia, que me acolheu e hoje somos uma família incrível. Em especial, meu grupo de Radiobiologia, que me deu suporte e me ajudaram nos momentos mais difíceis. Obrigada, Kleicy Cavalcante Amaral e Letícia Bonfim, sem a ajuda de vocês eu não teria terminado com essa energia boa.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela estrutura e apoio. À CAPES pelo apoio financeiro.

E por último e mais especial, agradeço meu orientador Dr Daniel Perez Vieira, que acreditou no meu potencial e me ajudou do começo ao fim, me dando a motivação necessária para seguir de cabeça erguida.

MUITO OBRIGADA!!!

Resumo

CARVALHO, Luma R. *Análise automatizada da frequência de micronúcleos em culturas celulares expostas a agentes genotóxicos físicos e químicos*. 2019. 55 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN. São Paulo.

O ensaio de frequência de micronúcleos é uma técnica importante utilizada para avaliar danos genotóxicos de agentes químicos ou físicos (como radiação ionizante) em células, baseado na quantificação de células contendo micronúcleos, que são fragmentos derivados de DNA danificado com coloração semelhante ao dos núcleos principais, mas com 5 a 30% do seu tamanho. Tradicionalmente, este ensaio é realizado usando microscopia de coloração convencional de acordo com Giemsa, mas atualmente esta técnica está sendo atualizada para uma abordagem automatizada que se baseia na dissolução da membrana plasmática por detergentes levando em conta apenas núcleos e micronúcleos com seu DNA corados por corantes fluorescentes, que pode discriminar núcleos de células viáveis das células inviáveis e permite a contagem por citometria de fluxo. Este trabalho avaliou a extensão de dano genotóxico radioinduzido por radiação gama (^{60}Co) em doses entre 0,5 e 16Gy, e o potencial genotóxico de três peptídeos utilizados em medicina nuclear (PSMA-617, PSMA-11 e Ubiquidina 29-41). As membranas celulares foram lisadas na presença dos corantes SYTOX[®] Green e EMA, e núcleos marcados com os dois fluorocromos foram considerados provenientes de células inviáveis e, portanto, removidos da análise. As quantidades de micronúcleos (porcentagem de eventos) nas amostras, foram proporcionais às doses de radiação, e puderam ser ajustadas a um modelo linear-quadrático ($R^2 = 0,993$). Somente doses mais altas (8 e 16 Gy) e controles positivos induziram aumentos relevantes nas quantidades de micronúcleos. Os radiofármacos foram testados com concentrações de 0,1x, x, 10x e 100x a concentração utilizada em adultos, e não induziram dano em concentrações praticáveis.

Palavras-chave: radiação, fármacos, genotoxicidade, micronúcleo

Abstract

CARVALHO, Luma R. *Automated analysis of the frequency of micronuclei in cell cultures exposed to physical and chemical genotoxic agents.* 2019. 55 p. Dissertation (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN. São Paulo.

The micronucleus frequency assay is an important technique used to evaluate genotoxic damage of chemical or physical agents (such as ionizing radiation) in cells, based on the quantification of micronucleus-containing cells, which are fragments derived from damaged DNA with similar coloration to of the main nuclei, but with 5 to 30% of its size. Traditionally, this assay is performed using conventional staining microscopy according to Giemsa, but currently this technique is being updated to an automated approach that relies on the dissolution of the plasma membrane by detergents taking into account only nuclei and micronuclei with their DNA stained by dyes fluorescence, which can discriminate nuclei from unviable or living cells and allows counting by flow cytometry. The genotoxic potential of three peptides used in nuclear medicine (PSMA-617, PSMA-11 and Ubiquicidine 29-41) was evaluated by gamma radiation (^{60}Co) at doses in the range among 0.5 and 16Gy. Cell membranes were lysed in the presence of the SYTOX[®] Green and EMA dyes, and cores labeled with the two fluorochromes were considered to be from non-viable cells and therefore removed from the analysis. The amount of micronucleus (percentage of events) in the samples was proportional to the radiation doses, and could be adjusted to a linear-quadratic model ($R^2 = 0.993$). Only higher doses (8 and 16 Gy) and positive control induced significant increases in micronucleus amounts. Radiopharmaceuticals were tested at concentrations of 0.1x, 1x, 10x, and 100x the concentration used in adults, and did not induce damage at feasible concentrations

Key words: radiation, pharmaceuticals, genotoxicity, micronucle

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Organização do material genético em células eucarióticas e em organismos procarióticos	9
2.2. Mecanismos de reparo do DNA	11
2.2.1 Reparo por excisão de base.....	11
2.2.2 Reparo por excisão de nucleotídeos	11
2.2.3 Recombinação homóloga.....	12
2.2.4 Recombinação não-homóloga.....	13
2.2 Genotoxicidade	15
2.3 Teste de Frequência de Micronúcleos (FMN)	15
2.4 Outros testes que identificam dano ao DNA.....	15
2.5 Citometria de fluxo	20
2.6 Radiação	22
2.6 Fármacos	22
2.6.1 PSMA	22
2.6.2 Ubiquidina.....	23
2.7 Utilização da linhagem CHO para avaliação de genotoxicidade	24
3 OBJETIVOS.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	25

4.1 Cultivos celulares	25
4.2 Irradiação.....	26
4.3 Concentrações de PSMA-11, PMSA-617 e Ubiquidina	26
4.4 Controles positivos (colchicina e mitomicina	27
4.5 Controles Negativos	27
4.6 Citometria de fluxo para quantificação de micronúcleos	27
4.7 Análise de dados.....	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Padronização e controle de qualidade	31
5.2 Análise de diferenças das frequências de micronúcleos obtidas nos.....	34
controles positivos e negativos.....	34
5.3 Aspecto dos núcleos obtidos após a lise.....	36
5.4 Indução de micronúcleos por radiação gama.....	39
5.5 Diferenças estatísticas da frequência de micronúcleos.....	39
5.6 Avaliação da citotoxicidade induzida por radiação	40
5.7 Alterações na proliferação celular	41
5.8 Teste de potencial genotóxico do fármaco PSMA-617.....	41
5.9 Avaliação da proliferação celular.....	42
5.10 Teste de potencial genotóxico do fármaco PSMA-11.....	43
5.11 Avaliação da proliferação celular.....	44
5.12 Teste de potencial genotóxico do fármaco Ubiquidina.....	44

5.13 Avaliação da proliferação celular.....	45
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	50

1 INTRODUÇÃO

Anteriormente à sua comercialização, compostos como fármacos, aditivos alimentares, tóxicos agrícolas ou seus componentes devem ter sua segurança e eficácia comprovada. São previstos ensaios com metodologias que comprovem que a molécula em teste não produza risco potencial (toxicidade), seja ela direta e observável *in vitro* ou *in vivo*, seja sob a forma de dano genético propagável hereditariamente ou indutor de risco de oncogênese (FDA *et al.*, 2012). Uma hipótese a ser estudada é aquela que leva em consideração a possibilidade de que certa substância-teste, em uma ou mais concentrações, possa desencadear determinada proporção de mortalidade celular. A citotoxicidade, ou toxicidade celular, deve ser avaliada preliminarmente em relação a outros experimentos.

Os testes de citotoxicidade são realizados mediante a exposição por tempo previamente padronizado de cultivos celulares *in vitro* a várias diluições da substância-teste. Padrões internacionais consideram exposições mínimas de quatro horas para que se possa observar potencial efeito citotóxico. Os mesmos padrões consideram citotóxica qualquer concentração de uma substância-teste que seja capaz de induzir ao menos 10% de morte celular em relação aos controles não-expostos (OECD, 2016).

O ensaio de frequência de micronúcleos é uma técnica importante utilizada para avaliar dano genotóxico de agentes químicos ou físicos (como radiações ionizantes) nas células, baseado na quantificação de células portadoras de micronúcleos, que são fragmentos derivados de danos (quebra) do DNA com coloração semelhante à dos núcleos principais, mas com 5 a 30% do seu tamanho (OECD, 2016). Atualmente, esta técnica está sendo atualizada para uma abordagem automatizada que se baseia na dissolução da membrana plasmática por detergentes e leva em conta apenas núcleos e micronúcleos com seu DNA corado por corantes fluorescentes, que podem até discriminar núcleos de células mortas ou vivas e permite a contagem por citometria de fluxo (Bemis *et al.*, 2016; Bryce *et al.*, 2018; Bryce, *et al.*, 2017). Alternativamente à técnica por microscopia, a metodologia por citometria de

fluxo considera como eventos relevantes e derivados de quebras não-reparada de DNA as partículas com fluorescência com intensidade de ao menos 1/100 da fluorescência emitida pelos núcleos principais (Bryce *et al.*, 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Organização do material genético em células eucarióticas e em organismos procarióticos

Uma célula eucarionte apresenta uma estrutura celular compartimentalizada, tendo componentes ligados por membranas intracelulares, e podem ser unicelulares ou multicelulares. Na perspectiva genética, as células possuem um envoltório nuclear, que circunda o material genético para formar um núcleo e separa o DNA dos outros conteúdos celulares. O DNA está associado a uma classe especial de proteínas, as histonas, para formar um cromossomo suficientemente compacto. Esse complexo de DNA e histonas é chamado genericamente de cromatina, e é o que compõe a estrutura física dos cromossomos eucarióticos. As histonas limitam o acesso de enzimas e outras proteínas que copiam e leem o DNA, mas permitem que o DNA caiba compactado dentro do núcleo delimitado pela membrana (carioteca) (Pierce, 2011).

Um organismo procarionte possui uma estrutura relativamente simples e unicelular, organizadas fundamentalmente em duas famílias: a *Eubacteriae* e a *Archaea*. O material genético está em íntimo contato com outros componentes da célula. As *Archaea* também possuem proteínas histoniformes que formam complexos com o DNA, mas a estrutura de sua cromatina é diferente dos eucariontes. Já as eubactérias não possuem histonas, logo, seu DNA não existe em um arranjo ordenado e bem compacto (Pierce, 2011).

Nas figuras 1 e 2, o DNA procariótico e eucariótico são comparados.

Figura 1: DNA procariótico (em vermelho) não é circundado por membrana nuclear nem associado a proteínas histonas. Fonte: (Pierce, 2011)

Figura 2: DNA eucariótico associa-se a proteínas histona para formar cromossomos que estão situados no núcleo. Fonte: (Pierce, 2011)

2.2. Mecanismos de reparo do DNA

Erros durante o processo de duplicação e danos mecânicos no DNA acontecem nas células de maneira sistemática nas células animais. Na maioria dos casos, eles não levam a células que carreguem mutações ou ainda que possam se reproduzir em formações neoplásicas. Isto porque tais danos geralmente são detectados e corrigidos por mecanismos de revisão do DNA e correção (Dexheimer, 2013). Neste trabalho, somente os mecanismos mais importantes em eucariontes serão mencionados, como o de reparação por excisão de base e nucleotídeos, que são danos limitados à fita molde da síntese do novo DNA durante o processo de reparo. Há também a recombinação homóloga e a não-homóloga, que podem afetar ambos os filamentos da molécula, com maior dificuldade de reparo.

2.2.1 Reparo por excisão de base

Uma base modificada é primeiro removida e então o nucleotídeo inteiro é substituído. A excisão de bases modificadas é catalisada por um conjunto de enzimas chamadas de DNA glicosilases, cada uma das quais reconhece e remove tipos específicos de bases modificadas. O nucleotídeo inteiro é então removido e um trecho do filamento polinucleotídico é substituído (Cooper, 2000).

2.2.2 Reparo por excisão de nucleotídeos

É uma via de reparo final que remove lesões volumosas de DNA que distorcem a dupla hélice. Os dois filamentos de DNA são separados, e um trecho do DNA contendo a distorção é removido. A DNA polimerase preenche o espaço, e a DNA ligase fecha o espaço preenchido. É encontrado em células de todos os organismos, de bactérias a humanos, e está entre os mais importantes de todos os mecanismos de reparo (Hang, 2010).

2.2.3 Recombinação homóloga

Esse reparo utiliza a região homóloga da cromátide irmã como molde para correção da quebra na dupla fita, o que evita erros e perdas, conferindo maior acurácia ao reparo. Por necessitar de um molde de DNA, ocorre apenas nas fases S e G2 do ciclo celular, etapas em que o cromossomo homólogo se encontra disponível para servir como molde. Está diretamente envolvida no reparo de quebra de fitas duplas causadas pelo colapso da forquilha de replicação durante a replicação do DNA em células somáticas, sendo responsável pela manutenção da integridade genômica (Helleday *et al.*, 2007).

A recombinação homóloga envolve diversas proteínas e, para que ocorra, é necessário o reconhecimento do dano por um complexo proteico, denominado complexo MRX, o qual é composto pelas proteínas Mre11, Rad50 e Xrs2. Este complexo, além de reconhecer moléculas de DNA com quebras duplas, é capaz de recrutar outras proteínas para proceder ao reparo (Williams *et al.*, 2009). Sae2 é uma das proteínas recrutadas que atua com o complexo MRX nos passos iniciais do reparo, participando da excisão de pares de bases que ocorre nas extremidades do DNA danificado (Cannavo e Cejka, 2014). Outras proteínas que são recrutadas e participam do processamento destas extremidades são as nucleases Dna2 e Exo1 responsáveis pela digestão, atuando em conjunto com a helicase Sgs1, que desenrola o DNA expondo regiões de DNA fita simples (Zhu *et al.*, 2008). Após as extremidades terem sido processadas para gerar extremidades de fita simples 3'-OH, a proteína RPA liga-se ao DNA, a fim de eliminar possíveis estruturas secundárias. A proteína mediadora Rad52 faz a interação entre as sequências homólogas e um nucleofilamento é formado quando a proteína Rad51 se liga ao DNA de fita simples, sendo capaz de invadir o DNA homólogo. Com o alinhamento das regiões homólogas, a síntese de DNA ocorre pela ação da DNA polimerase, reparando o dano da molécula (Cejka, 2015) (Figura 3).

Figura 3: Esquema da via de recombinação homóloga no reparo de quebras de fita dupla do DNA. Fonte: (Fell e Schild-Poulter, 2015), modificado.

2.2.4 Recombinação não-homóloga

O reparo de quebras duplas na cadeia de DNA é essencial para a manutenção da integridade genômica. A primeira etapa da via de recombinação não homóloga é o reconhecimento da ruptura do DNA, o qual ocorre pela proteína Ku, que consiste em um heterodímero composto pelas subunidades Ku70 e Ku80. A subunidade Ku70 possui um domínio de ligação ao DNA e alta afinidade por moléculas de DNA contendo quebras de fita dupla, permitindo o reconhecimento rápido de moléculas de DNA com danos. Já a subunidade Ku80 apresenta um domínio de ligação à proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), recrutando esta proteína quando o

heterodímero está interagindo com a molécula de DNA. Este processamento é necessário para o recrutamento de outras proteínas, tais como polimerases, nucleases e quinases que criam extremidades compatíveis para a ligação das extremidades do DNA corrigidas. O complexo de ligação composto pela Ligase IV, XRCC4 e XLF possui função de ligar as duas extremidades do DNA. Este complexo é recrutado interagindo diretamente com o heterodímero. Após esse processo, Ku é removida, possivelmente por degradação por proteases e via de ubiquitinação (Fell e Schild-Poulter, 2015) (Figura 4).

Figura 4: esquema da via de recombinação não homóloga no reparo de quebras de fita dupla do DNA. Fonte: (Fell e Schild-Poulter, 2015)

A proteína Ku age com efeito inibitório sobre as outras vias de reparo de quebras de fita dupla de DNA, uma vez que é a primeira proteína a se ligar nas extremidades de moléculas danificadas em qualquer estágio do

ciclo celular. Além disso, sua superexpressão é capaz de reduzir o recrutamento de fatores da via de recombinação homóloga, mesmo quando esta seria a via de reparo preferencial (Clerici *et al.*, 2008).

2.2 Genotoxicidade

O termo “genotoxicidade” é uma definição ampla de dano ao material genético nuclear ou mitocondrial, que quantifica a capacidade de compostos atingirem o DNA (Ślarczyńska *et al.*, 2014) e causa lesão não reparada.

Referindo-se à toxicidade genética são considerados os testes de genotoxicidade, cuja função é avaliar a presença ou ausência de quebras provocadas direta ou indiretamente nas fitas de DNA (clastogênese) em células de linhagens já estabelecidas para tanto, em culturas padronizadas. Além disso, os ensaios de genotoxicidade podem avaliar se determinado composto-teste possui a mutação genética, ou seja, a não-disjunção (aneugênese) (FDA *et al.*, 2012).

2.3 Teste de Frequência de Micronúcleos (FMN)

O teste de frequência de micronúcleos (FMN) *in vitro* é uma das metodologias de escolha no desenvolvimento de testes de segurança toxicológica, recomendada pela Agência Internacional de Energia Atômica, AIEA, como uma forma de dosimetria biológica a ser usada no monitoramento da exposição às radiações ionizantes (IAEA, 2011) e pela OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) para testes *in vitro* de toxicologia genética (OECD, 2016).

A técnica baseia-se na observação de micronúcleos através do bloqueio de citocinese (CBMN), e é realizada utilizando a citocalasina B, composto de origem fúngica que tem a capacidade de inibir a citocinese (divisão celular propriamente dita) sem inibir a cariocinese (divisão do núcleo

celular após a duplicação do DNA). Desta forma, células tratadas por este composto exibem dois ou mais corpos nucleares.

Os micronúcleos são normalmente observados em células imediatamente após a divisão nuclear, em telófase, sob a forma de células binucleadas. Em células interfásicas, o produto de tais quebras apresenta-se sob a forma de micronúcleos, que são aglomerados de DNA com coloração similar à do núcleo principal, e com 5 a 30% de seu tamanho. Podem ser originários de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que são incapazes de migrar com o resto dos cromossomos durante a anáfase da divisão celular (OECD, 2016)

O aumento da proporção de células que apresentam micronúcleos, bem como a sua quantidade no citoplasma das células analisadas, são indicativos de dano genotóxico, uma quebra irreparada das fitas de DNA. Após a análise, tal aumento pode relacionar a concentração utilizada da substância-teste ao potencial genotóxico da mesma (Speit, Zeller e Neuss, 2011).

Utilizando os mesmos dados são também calculados o índice de proliferação sob bloqueio da citocinese (*cytokinesis-blocking proliferation index*, CBPI) e o índice de replicação (*replication index*, RI), cujos valores analisados juntos às proporções de células binucleadas com micronúcleos indicam possíveis fenômenos clastogenicidade e aneugenicidade, que descrevem dois tipos de dano no DNA caracterizados por fatores estruturais ou numéricos em alterações nos cromossomos. O dano ao DNA pode ser cromossômico, afetando ambas as cromátides irmãs de um cromossomo, ou envolvendo apenas uma das duas cromátides. O dano aneugênico do DNA é considerado indireto ou dano secundário, ao contrário da clastogenicidade que é considerado um dano direto ao DNA (Bignold, 2009). Diferentes tipos de danos no DNA são acumulados devido à clastogenicidade, incluindo inserções, deleções, translocações, inversões e aberrações da cromátide (Beedanagari *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, este ensaio é realizado usando microscopia, (Ocampo *et al.*, 2016), usando uma coloração convencional segundo Giemsa

(Heddle *et al.*, 2011) ou com corantes fluorescentes que permitem a contagem manual de células binucleadas com micronúcleos (Çelik, Öğenler e Çömelekoğlu, 2005).

O protocolo de teste é realizado após a exposição de células em cultura a concentrações variáveis de determinada substância-teste. Após este período, as células são fixadas com metanol ou formaldeído tamponado, recebem coloração conveniente e são submetidas à análise por microscopia óptica (Heddle *et al.*, 2011) ou de fluorescência (Çelik, Öğenler e Çömelekoğlu, 2005).

No caso de pesquisas que utilizam células primárias, os micronúcleos formados *in vivo* podem também ser avaliados diretamente em células mononucleadas, sem a necessidade de cultivo. É o que ocorre no caso de linfócitos primários não cultivados. Para células que normalmente apresentam um baixo índice mitótico, os danos nos cromossomos só podem ser razoavelmente expressos na forma de micronúcleos se as células forem estimuladas a se dividir. No entanto, alguns tecidos apresentam uma alta capacidade de regeneração e, portanto, possuem células com alto índice mitótico. Nesse caso, a identificação dos micronúcleos e o cálculo de sua frequência podem ser feitos a partir das células primárias coletadas sem necessidade de induzi-las a se dividir (Kirsch-Volders *et al.*, 2011).

Os micronúcleos observados são indicador confiável de dano cromossômico. Altas frequências de MN podem ter relação com o aumento de dano ao DNA, o que pode ter como consequência maior risco para o desenvolvimento de câncer ou doenças genéticas, (Bonassi *et al.*, 2007) (Furness, Dekker e Hague, 2010).

A Figura 5 mostra em esquema as duas vias prováveis de formação de micronúcleos em células em divisão.

Figura 5: Esquema de formação de micronúcleos sem bloqueio da citocinese.

Fonte: (Valente et al., 2018) modificado

2.4 Outros testes que identificam dano ao DNA

Outra técnica conhecida e com importância científica (Nascimento *et al.*, 2001) é o ensaio de cometa, onde células contidas numa matriz de gel (agarose) e espalhadas sobre uma lâmina de vidro são submetidas a uma corrente elétrica que proporciona a migração de segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para longe da região onde o núcleo se encontra. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo regular são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por mostrarem uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (Singh, 2016). A identificação do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras como, por exemplo, medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma escala, ou ainda classificar visualmente, em diferentes níveis de dano, as células analisadas, podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células (Kyoya *et al.*, 2018)

O teste de Ames é um outro exemplo, que analisa uma mutação gênica que consiste em uma reversão de mutação bacteriana, que depende de aminoácidos para formar colônias, exclusivas de células bacterianas. O ensaio consiste na utilização de várias cepas de *Salmonella typhimurium* com mutações pré-existentes que deixam as bactérias impossibilitadas de sintetizar um aminoácido essencial, a histidina. Assim, as bactérias são incapazes de crescer e formar colônias num meio sem histidina. Quando expostas a uma substância que possa induzir mutações no gene responsável pela síntese da histidina, ou na sua proximidade, a função do gene pode ser restaurada, permitindo que as células passem a sintetizar esse aminoácido. Desta forma, as bactérias conseguem crescer e formar colônias na ausência da histidina. O número de colônias formadas após a exposição das várias cepas bacterianas a várias concentrações do composto em estudo estará diretamente relacionado com o seu potencial mutagênico (Mortelmans e Zeiger, 2000).

2.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia baseada em análises por *lasers* que explora várias características de partículas isoladas, geralmente componentes de suspensões celulares (análise de membrana e intracelular), como o tamanho (*Front Scatter* – FSC), complexidade/rugosidade (*Side Scatter* – SSC) e fluorescência (Figura 6).

Figura 6: Detecção da FSC e SSC. Fonte: (Martins, D; Minguini, G, 2008)

Essa é uma análise quantitativa e multiparamétrica de milhares de partículas por segundo e ajuda a identificar adequadamente ou caracterizar funcionalmente as populações de células complexas de interesse, como divulgada através de métodos variados (Nüsse e Kramer, 1984; Nüsse e Marx, 1997; Schreiber *et al.*, 1992) em que relatam procedimentos de quebra da membrana externa das células para gerar núcleos livres e micronúcleos. A partir desses primeiros procedimentos que a técnica foi melhorada e algumas adaptações foram feitas. Alguns autores (Bryce *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Kirsch-Volders *et al.*, 2011) também utilizam a citometria de fluxo para

quantificar micronúcleos, que nestes casos são caracterizados como partículas com 1/10 a 1/100 da fluorescência dos núcleos principais, e incorporar o corante fluorescente brometo de etídio-monoazida (EMA) para diferenciar micronúcleos da cromatina associada à células mortas ou em processo de morte e a incorporação de SYTOX® Green no DNA de todas as células após o rompimento da membrana.

A análise deste trabalho seguiu a metodologia descrita na literatura (Bryce *et al.*, 2007). Resumidamente, os eventos marcados com EMA foram excluídos da contagem total. Os eventos com SYTOX® Green foram avaliados de acordo com seu tamanho (FSC) e fluorescência (FL1) para discriminação entre núcleos e micronúcleos (Figura 7). Pelo menos 20000 eventos foram contados na região dos núcleos em cada amostra. Os dados finais desse experimento consistem em: porcentagem de micronúcleos (para EMA negativo e SYTOX positivo), em relação ao controle em comparação aos poços de controle (células não-irradiadas, não tratadas). A relação entre núcleos e esferas foi usada para analisar se houve ou não proliferação celular.

Figura 7: Detectores de fluorescência. Fonte: (Martins, D; Minguini, G, 2008)

2.6 Radiação

A radiação ionizante é um agente físico que pode afetar as células induzindo mutação, morte celular ou câncer. O dano depende de outros fatores como dose absorvida, tipo de radiação e da radiosensibilidade da célula. (Santos *et al.*, 2014). A obtenção da frequência de micronúcleos é uma técnica utilizada não só para a quantificação de dano genotóxico de agentes químicos, mas também está sendo relatada como importante ferramenta para dosimetria biológica das radiações (Garty *et al.*, 2015) uma vez que o reflexo biológico de sua interação com a matéria biológica se dá sob a forma de quebras nas fitas duplas de DNA (Hall *et al.*, 1988).

2.6 Fármacos

Antes da comercialização de um fármaco, são feitas diversas avaliações para que sejam comprovadas sua eficácia, estabilidade e a segurança. Um fármaco associado a um radionuclídeo denomina-se radiofármaco, e pode servir tanto para tratamento quanto para diagnóstico precoce (ou ainda, às duas propostas), sendo doenças de fundo oncogênico ou infecciosas, ou focos inflamatórios. Neste trabalho, foi feito um estudo pré-clínico para avaliar a toxicidade do produto através teste agudo de genotoxicidade.

2.6.1 PSMA

O antígeno de membrana específica da próstata (*Prostate-specific membrane antigen*, PSMA) é uma proteína de superfície celular, que se encontra expressa em quase todas as formações neoplásicas prostáticas (Lütje *et al.*, 2015). O PSMA foi identificado como uma proteína homóloga N-acetil-L-aspartil-L-glutamatopeptidase I (NAALADase I ou folato hidrolase I), que é ativa no sistema nervoso central, onde se junta ao neurotransmissor N-acetil-laspartil-l-glutamato (NAAG) em N-acetilaspártato (NAA) e glutamato (Zhou *et al.*, 2005) (Silver e Fair, 1997). Em formações carcinogênicas com malignância, o PSMA é usado por estar envolvido na angiogênese, aumentando sua expressão no estroma adjacente à vasculatura de tumores sólidos. Uma série

de estudos pré-clínicos avaliaram o papel de uma pequena molécula radiomarcada com ligantes de inibição de PSMA para imagem de câncer de próstata humana usando vários radionuclídeos para fins diagnósticos e terapêuticos, como ^{11}C (Foss *et al.*, 2005), ^{18}F , ^{123}I (Maresca *et al.*, 2009), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Hillier *et al.*, 2013) e ^{68}Ga (Banerjee *et al.*, 2010). No Brasil, o câncer de próstata é o mais prevalente na população adulta de sexo biológico masculino, com uma estimativa de 68.220 novos casos a para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2017).

O PSMA-11 pode ser marcado com ^{68}Ga e usado para fim de diagnostico, já o PSMA-617 pode ser radiomarcado com ^{68}Ga , ^{44}Sc ou ^{177}Lu e usado para terapia (Umbricht *et al.*, 2017), como mostrado na Figura 7.

Figura 7: Estrutura química do PSMA-617 (a) e PSMA-11 (b). Fonte: (Umbricht *et al.*, 2017)

Atualmente, os exames de imagem convencionais, incluindo ultrassonografia, cintilografia óssea e tomografia computadorizada (TC), são utilizadas para detectar câncer de próstata primário e metastático (Lütje *et al.*, 2015).

2.6.2 Ubiquidina

A Ubiquidina é um peptídeo catiônico sintético com atividade antimicrobiana com afinidade pelas paredes celulares dos microrganismos (Akhtar *et al.*, 2005). Seu uso como radiofármaco de diagnóstico ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI₂₉-

41) para infecções fúngicas (Lupetti *et al.*, 2011) e bacterianas tem se mostrado promissor. Uma de suas principais características positivas é a capacidade de diferenciar regiões de focos inflamatórios sépticos da inflamação asséptica, auxiliando na escolha do tratamento de pacientes que sofrem de várias infecções (Ostovar *et al.*, 2013). Peptídeos antimicrobianos são componentes importantes do sistema imunológico de todos os organismos vivos e geralmente contêm aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos, ou seja, são moléculas que apresentam característica de possuírem uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos) e uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), respectivamente. A UBI é um peptídeo promissor para solução de casos de inflamação asséptica (Palestro, Glaudemans e Dierckx, 2013), como mostrado na Figura 8.

Figura 8: Estrutura molecular de UBI 29-41, calculada pela mecânica molecular.

Fonte: FLORES; MURPHY; ALAFORT, 2005.

2.7 Utilização da linhagem CHO para avaliação de genotoxicidade

O trabalho utiliza células não tumorais de ovário de hamster chinês (CHO-K1, ATCC CCL-61), que é uma linhagem padrão para testes de genotoxicidade (OECD, 2016).

A taxa de crescimento é relativamente rápida com duração do ciclo celular de aproximadamente 12 a 14 horas (IAEA, 2001), e possuem cromossomos grandes e em pequeno número ($2n = 20$ a 22), enquanto o

cariótipo humano é de $2n=46$ e de camundongos $2n=40$. Sendo assim, são consideradas como modelo de estudo citogenéticos, carcinogênese, mutagenicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, entre outros, porque possuem um crescimento estável em cultura, apresentando geralmente, um grande número de metáfases analisáveis (Preston *et al.*, 1981)

3 Objetivos

Geral

Utilizar técnica de quantificação de frequência de micronúcleos por citometria de fluxo para avaliação de dano genotóxico induzido por radiação ionizante (gama, ^{60}Co) e avaliação de segurança de radiofármacos.

Específicos

- Utilização da técnica para avaliação de aspectos da segurança farmacológica de radiofármacos produzidos pelo IPEN, no âmbito da genotoxicidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivos celulares

As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol (Vitrocell-Embriolife) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB-GIBCO-BRL) e 1% de antibióticos (Penicilina 10000 U/mL, Estreptomicina 10000µg/mL - GIBCO-BRL), incubadas a 37° C na presença de 5% de CO₂ até aproximadamente 70% de confluência em monocamada, com substituição do meio de cultura a cada 48 horas e subcultivadas a cada 7 dias em cultura. Todos os experimentos foram realizados utilizando culturas submetidas a pelo menos uma passagem de

subcultura após descongelamento, com número de passagens subsequentes inferior a nove.

4.2 Irradiação

As células foram removidas de frascos de cultura usando solução de tripsina/EDTA (0,05%/0,05M), lavadas por centrifugação em meio de cultura fresco e ressuspensas em 1 mL de PBS (solução salina-fosfato tamponada / *Phosphate Buffered Saline*) para procedimentos de irradiação gama em doses entre 0,5 e 16Gy de ^{60}Co dentro de microtubos estéreis em temperatura ambiente. As irradiações foram realizadas em um equipamento GammaCell 220 (Unidade de Irradiação da Comissão de Energia Atômica Canadense, Ltd.) no Centro de Tecnologia de Radiação (IPEN/CNEN-SP) usando um escudo de chumbo metálico correspondente a 90% de atenuação de radiação. Com esta atenuação, a taxa de dose não ultrapassou a marca de 85Gy/h à época das irradiações (Ago/2016 a Jan/2017). Após a irradiação, as suspensões foram centrifugadas e as proporções de células viáveis determinadas pelo método de exclusão do azul de tripano. As concentrações foram ajustadas para 50 000 células/mL, com 100 μL (5000 células) semeadas por poço em placas de 96 poços. Após semeadura, as células foram incubadas durante 72 horas nas condições descritas acima, em 4.2.

4.3 Concentrações de PSMA-11, PMSA-617 e Ubiquidina

Alíquotas de todos os fármacos foram cedidas pelo Centro de Radiofarmácia (IPEN/CNEN-SP), que adquiriu os produtos em suas formas comerciais da Advanced Biochemical Compounds (ABX – Alemanha) e os diluiu em água ultrapura estéril na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Para a obtenção da concentração final do fármaco, foi utilizado o cálculo do “homem padrão” (70kg e 5,5L de sangue) (Snyder, W.S. *et al*, 1975). Foram produzidas diluições dos peptídeos em meio de cultura de forma a obter concentrações equivalentes a 1/10, 1, 10 e 100 vezes as concentrações máximas administradas a pacientes. Para PSMA-617, a concentração de

100µg/pessoa resultou em 1,63 ng/mL (0,1x), 16,3 ng/mL (1x), 163 ng/mL (10x) e 1630 ng/mL (100x), para PSMA-617.

O PSMA-11 resultou em 0,18 ng/mL (0,1x), 1,8 ng/mL (1x), 18 (10x) e 180 ng/mL (100x).

Para a Ubiquidina foi utilizado 25 µg/pessoa que resultou em 0,45 ng/mL (0,1x), 4,5 ng/mL (1x), 45 ng/mL (10 x) e 450 ng/mL (100x). As culturas permaneceram em contatos com estas concentrações de fármacos por 4 ou 24 horas, com o intuito de se observar danos agudos ou tardios.

4.4 Controles positivos (colchicina e mitomicina)

Os controles foram colocados após 4 horas de incubação como descrito, e os poços foram lavados com PBS e receberam meio de cultura fresco e continuaram em cultura durante 24 horas. A colchicina (Sigma-Aldrich, CAS 50-07-7), com uma concentração final de 8,8 µg / mL. A mitomicina (Sigma-Aldrich, CAS 50-07-7) com uma concentração final de 4 µg/mL, também por 4 ou 24 horas.

4.5 Controles Negativos

Foi usado como controle negativo uma solução de NaCl 0,9% (NaCl, Synth Ltda. C1060, CAS, 764714-5), na concentração final de 24µL / mL. Foram designados poços como controle de células (CC), cujas células receberam apenas meio de cultura completo e fresco. Após 4 ou 24 horas, o meio de cultura dos poços CC e dos controles negativos foi removido e as células receberam meio de cultura fresco.

4.6 Citometria de fluxo para quantificação de micronúcleos

De acordo com (Bryce *et al.*, 2007), após três dias em cultura, as células semeadas em placas de 96 poços irradiadas ou em concentrações com os fármacos, bem como as tratadas com os agentes genotóxicos descritos, foram centrifugadas (1500 RPM, em 10 minutos) e receberam uma solução de corante brometo de etídio monoazida (Thermo-Fisher Scientific, E1374) em uma concentração de 8,5 µg / mL diluída em PBS suplementado com 2% de

soro bovino fetal. As placas de cultura foram abertas e expostas a uma fonte de luz de led azul (440-450nm, 30W) por 30 minutos para a fotoativação do composto, o que associa o corante irreversivelmente ao DNA das células inviáveis, que possuem a membrana com a integridade comprometida. Este procedimento teve como objetivo rotular eficientemente as células que não devem ser incluídas na contagem de núcleos e micronúcleos, além de fornecer alguma medida de citotoxicidade. Após este passo, as células receberam PBS com 2% de soro bovino fetal e centrifugadas para remoção de corante livre.

Foram realizados duas etapas de lise para liberar núcleos e micronúcleos e marcar o DNA. O primeiro passo consistiu em lise das células utilizando uma solução com cloreto de sódio (0,854 mg / mL), citrato de sódio (1 mg / mL) e IGEPAL® (0,3 µL / mL), bem como 0,4 µM de corante fluorescente verde SYTOX® Green (Thermo-Fisher Scientific, S7020). Esta solução também continha RNase A (Sigma, SLB5176V) o que elimina a chance dos corantes se associarem a moléculas de RNA residual. Após a lise por 60 minutos (37°C), as placas foram centrifugadas e o material biológico recebeu a segunda solução de lise (sacarose 85,6 mg / mL, ácido cítrico 15 mg / mL e SYTOX® Green 0,4 µM). As segundas soluções de lise foram suplementadas com 5 µL / de esferas de látex. As amostras foram incubadas com esta solução por mais 30 minutos no escuro. Após 30 minutos, o material ficou em temperatura ambiente para leitura no citômetro de fluxo (Accuri C6, BD Biosciences).

Foram utilizadas as esferas de látex AccuCheck Counting Beads (Thermo-Fisher Scientific, PBC100), com cerca de 6 µm de diâmetro e que, na análise por citometria de fluxo, apresentam-se sob a forma de duas subpopulações bem discriminadas, com fluorescências no canal FL2. Foram adicionadas na concentração de 5 µL/poço, e a quantidade encontrada nos poços variou pouco ($1054 \pm 40,48$, Média $\pm$ erro padrão da média, dados não mostrados). Assim, foi possível calcular a relação entre a quantidade de núcleos e *beads* em cada amostra. Desvios desta razão em relação à encontrados nos controles, foram interpretados como mudanças na velocidade de divisão mitótica.

A estratégia de detecção da análise é descrita na Figura 9.

Figura 9: Estratégia de *gating* para a análise da frequência de micronúcleos dos experimentos. (a) Total de eventos. Discriminação baseada em tamanho (FSC) e granulidade (SSC) ; (b) Região das esferas de calibração (*beads*) (c) eliminação de células agregadas / caracterização de células separadas (d) separação de eventos com pelo menos 1/100 de fluorescência do pico de menor fluorescência (e) Discriminação final de fluorescência em relação à rugosidade / complexidade (SSC) (f) Somente eventos EMA/SYTOX⁺ considerados. Eventos EMA⁺ foram relacionados à mortalidade celular

4.7 Análise de dados

Os dados obtidos foram analisados com os *softwares* BD CSampler Software ou FlowJo VX sempre mantendo a estrutura de *gating* mostrada acima. As quantidades de micronúcleos (MN) e núcleos EMA⁺ e razões entre núcleos e *beads* foram expressas em porcentagens do total obtido após a execução da estratégia de *gating*. Os resultados foram expressos em relação às quantidades encontradas no controle de células (CC).

Para avaliação do efeito genotóxico radionduzido, as quantidades de MN em relação aos controles foram ajustadas à função polinomial de segunda-

ordem, que usualmente é utilizada para avaliação de efeitos genotóxicos clastogênicos das radiações ionizantes.

Diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguida de pós testes Bonferroni, utilizando o *programa GraphPad Prism 7*.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização e controle de qualidade

Nas condições das aquisições automáticas, a coleta de todos os eventos em placas de 96 poços requeria rotineiramente entre 4 a 5 horas (dados não mostrados). Devido a este tempo, certa variação na quantidade de eventos adquiridos entre as primeiras e últimas colunas pode ser observada. A Figura 10 mostra este efeito.

Figura 10: Variação nas quantidades de eventos adquiridos entre as primeiras e últimas colunas das placas de 96 poços nos experimentos. Números por poço. (A) *Beads*, (B) Núcleos de células inviáveis, (C) Micronúcleos, (D) Núcleos, (E) Razão Núcleos/*Beads*.

Após a percepção deste efeito, os experimentos subsequentes requereram a suspensão do processo de aquisição de eventos após o término de cada coluna, quando houve a ressuspensão dos conteúdos dos poços da próxima coluna a ser analisada com o auxílio de uma micropipeta multicanal. O procedimento adicionou cerca de 2 minutos para cada coluna ao tempo final de aquisição. A Figura 11 mostra dados adquiridos em placas nas condições descritas.

Figura 11: Variação nas quantidades de eventos adquiridos entre as primeiras e últimas colunas das placas de 96 poços nos experimentos, após a adoção do procedimento de ressuspensão a cada coluna. Números por poço. (A) *Beads*, (B) Núcleos de células inviáveis, (C) Micronúcleos, (D) Núcleos, (E) Razão Núcleos/*Beads*.

Após ressuspensão, houve redução significativa da variabilidade inter-poços das contagens de *beads*, núcleos de células inviáveis, micronúcleos, núcleos e razão núcleos/*beads*, evidenciada pela obtenção de menores coeficientes de variação, exceto para MN. Foram encontradas

diferenças significativas dos números de eventos adquiridos entre as amostras coletadas sem ou com ressuspensão. A Tabela 1 mostra dos dados obtidos após comparação estatística.

		Sem ressuspensão		Com ressuspensão				Sem ressuspensão		Com ressuspensão	
		Média	CV(%)	Média	CV(%)			Média	CV(%)	Média	CV(%)
Beads (FSC-A x SSC-A)	0Gy	1	52.25953	1	24.95987	Núcleos não viáveis (SYTOX*/EMA*)	0Gy	1	59.89291	1	44.41843
	0.5Gy	1.299776	53.02818	0.857553	15.69274		0.5Gy	0.719149	49.61609	1.305677	33.00406
	1Gy	0.900598	42.29417	0.945892	32.57718		1Gy	3.425532	137.9983	2.342795	73.75963
	2Gy	0.826906	45.55129	1.108823	16.65141		2Gy	2.817629	65.30116	8.139738	115.1551
	4Gy	0.95299	55.41199	1.144545	16.19322		4Gy	3.164134	49.84617	7.834061	77.2415
	8Gy	0.841629	42.39685	1.628754	19.85082 (***)		8Gy	15.47113	90.30456	12.20524	48.92772
	16Gy	0.631689	61.07532	1.597284	7.712914 (****)		16Gy	53.78116	48.95534	33.18777	33.8661 (****)
	MTMC	0.935576	61.64167	0.771312	20.17784		MTMC	1.021581	70.04346	1.825328	23.07248
		Sem ressuspensão		Com ressuspensão				Sem ressuspensão		Com ressuspensão	
		Média	CV(%)	Média	CV(%)			Média	CV(%)	Média	CV(%)
MN (SYTOX*/EMA)	0Gy	1	48.29324	1	72.97468	Núcleos viáveis (SYTOX*/EMA)	0Gy	1	51.75798	1	17.96135
	0.5Gy	0.7366	66.29385	0.574914	67.56718		0.5Gy	2.275794	74.22827	1.011675	8.223873 (****)
	1Gy	1.851643	70.01931	0.685706	78.75783		1Gy	0.620065	61.52249	0.818142	11.62922
	2Gy	1.796713	50.33021	1.225316	74.42852		2Gy	0.535154	59.52005	0.976505	16.35863
	4Gy	2.214688	39.79513	1.630884	49.06605		4Gy	0.653185	63.57957	0.658318	17.93023
	8Gy	4.65798	33.86377	3.426808	41.68071		8Gy	0.194499	78.72619	0.274189	18.14567
	16Gy	7.203139	24.70491	5.65729	10.72696 (*)		16Gy	0.027471	66.28203	0.062054	18.26841
	MTMC	2.86408	45.22873	1.056257	47.94266 (**)		MTMC	0.682071	69.31087	0.443509	9.996483
		Sem ressuspensão		Com ressuspensão				Sem ressuspensão		Com ressuspensão	
		Média	CV(%)	Média	CV(%)			Média	CV(%)	Média	CV(%)
Razão Núcleos/beads	0Gy	1	62.74279	1	33.44087						
	0.5Gy	1.612191	51.78198	1.136405	19.76762						
	1Gy	0.637073	43.79794	0.852799	19.89971						
	2Gy	0.581978	43.70299	0.830918	9.621729						
	4Gy	0.621794	42.86265	0.544509	15.1911						
	8Gy	0.219301	62.96853	0.15963	14.16411						
	16Gy	0.040605	38.74925	0.036413	15.32168						
	MTMC	0.745104	60.29309	0.55992	23.49944						

Tabela 1: Variação nas quantidades de eventos adquiridos entre as primeiras e últimas colunas das placas de 96 poços nos experimentos, antes após a adoção do procedimento de ressuspensão a cada coluna. Valores em função da média dos controles. Barras: coeficientes de variação (CV%). (*) :p<0,05. () :p<0,01. (***) :p<0,001. (****) :p<0,0001. Sem ressuspensão: n=11. Com ressuspensão: n=7.**

5.2 Análise de diferenças das frequências de micronúcleos obtidas nos controles positivos e negativos.

Nas Figuras 12 e 13 é possível analisar os Resultados típicos derivados da exposição de células CHO-KI por 4 e 24 horas aos controles, respectivamente.

Figura 12: Resultados típicos derivados da exposição de células CHO-K1 por 4 horas aos controles: (A) Controle de células, controle negativo; (B) NaCl, controle negativo; (C) Colchicina, controle positivo; (D) Mitomicina, controle positivo. Regiões marcando a porcentagem de núcleos (Núcleos) e micronúcleos (MN) estão indicadas.

Figura 13: Resultados típicos derivados da exposição de células CHO-K1 por 24 horas aos controles: (A) Controle de células, controle negativo; (B) NaCl, controle negativo; (C) Colchicina, controle positivo; (D) Mitomicina, controle positivo. Regiões marcando a porcentagem de núcleos (Núcleos) e micronúcleos (MN) estão indicadas.

Nos experimentos com exposição por 4 horas, a porcentagem de micronúcleos dos controles (CC e NaCl) são numericamente comparáveis. No entanto, após 24 horas de incubação as culturas tratadas com NaCl mostraram porcentagens maiores do que as encontradas em CC, embora a diferença não tenha sido significativa estatisticamente.

5.3 Aspecto dos núcleos obtidos após a lise.

Nas Figuras 14 e 15, é possível observar os aspectos dos núcleos sob a microscopia óptica de fluorescência.

Figura 14: Núcleos de células CHO-K1 após a lise de membranas obtidos nos experimentos de 4 horas de exposição, destacando: (a) *bead*, (b) núcleo normal, (c) núcleo fragmentado, (d) núcleos de células inviáveis (EMA+). Aumentos: quadro maior – 10X; Destaque: 30X (10X óptico e 3X zoom digital). Barra em D: 50 μm .

Figura 15: Núcleos de células CHO-K1 após a lise de membranas obtidos nos experimentos de 24 horas de exposição, destacando: (a) núcleos de células inviáveis (EMA+), (b) *bead*, (c) núcleo fragmentado, (d) micronúcleos. Aumentos: quadro maior – 10X; Destaque: 30X (10X óptico e 3X zoom digital). Barra em D: 50 μm.

As Figuras 14 e 15 mostram o aspecto típico dos núcleos obtidos após a lise das membranas plasmáticas pelo procedimento.

5.4 Indução de micronúcleos por radiação gama.

O aumento da frequência de micronúcleos pode ser ajustado ao modelo clássico de dano ao DNA por radiação, como mostrado na Figura 16.

em culturas de células CHO-K1 irradiadas de 0 a 16Gy. Inserção: equação de regressão obtida a partir do coeficiente de dados e de ajuste.

A Figura 16 mostra uma interpretação de uma representação típica de experiências de dano ao DNA por radiação ionizante. A porcentagem de micronúcleos nas amostras, feitas em quintuplicatas, foi proporcional à dose de radiação, seguindo modelo linear quadrático ($R^2 = 0,993$).

5.5 Diferenças estatísticas da frequência de micronúcleos.

Diferenças estatisticamente significativas podem ser observadas entre os grupos, como mostrado na Figura 17.

Figura 17: Aumento de micronúcleos em culturas de células CHO-K1 irradiadas de 0 a 16Gy. (*): $p < 0,05$. (**): $p < 0,0001$. MTMC: controle de mitomicina.**

Somente as doses de 8 e 16Gy e o controle positivo (mitomicina) induziram porcentagens de micronúcleo estatisticamente diferentes em relação do controle.

5.6 Avaliação da citotoxicidade induzida por radiação

Os eventos EMA⁺ / SYTOX⁺ foram representativos dos núcleos e micronúcleos de células consideradas inviáveis no momento da experiência (Figura 18).

Figura 18: Núcleos e micronúcleos de células inviáveis em culturas de células CHO-K1 irradiadas de 0 a 16Gy. (*): $p < 0,05$. (**): $p < 0,0001$. MTMC: controle de mitomicina.**

Após 72h, apenas as culturas irradiadas por 8 ou 16Gy mostraram mudanças significativas na viabilidade celular.

5.7 Alterações na proliferação celular

As mudanças induzidas por radiação na proliferação celular são mostradas na Figura 19.

Figura 19: Proporção de núcleos por esferas em culturas de células CHO-K1 irradiadas de 0 a 16Gy. (): $p < 0,01$. (****): $p < 0,0001$. MTMC: controle de mitomicina.**

A análise mostra que irradiações com 4Gy induziram reduções na proliferação celular em culturas irradiadas, assim como, 8 e 16Gy e controle positivo. A mitomicina induziu uma redução significativa da proliferação celular. Apesar de não ser estatisticamente significativo, um aumento de proliferação poderia ser anotado a partir de células irradiadas por 0,5Gy.

5.8 Teste de potencial genotóxico do fármaco PSMA-617

A frequência de micronúcleos em PSMA-617, como mostrado na Figura 20.

Figura 20: Aumento da porcentagem de micronúcleos em relação ao controle (*fold-increase*) em culturas celulares de CHO-K1 com concentrações de PMSA-617 e controles, após 4 e 24 horas de exposição. (*): $p < 0,05$. (**): $p < 0,0001$.**

MTMC: controle de mitomicina; COLCH: controle colchicina.

Controles positivos (mitomicina e colchicina) induziram porcentagens de micronúcleos estaticamente diferentes em relação do controle de células (CC) em exposições de 4 horas. Já as concentrações não mostraram diferença estatística em relação ao controle.

Em 24 horas de exposição, a porcentagem de micronúcleos nas amostras, também feitas em octuplicatas. O controle positivo (colchicina) e a concentração de 1630ng/mL de PMSA-617 induziram porcentagens de micronúcleo estaticamente diferentes em relação do controle de células (CC). Controles de mitomicina não induziram toxicidade nas incubações de 24 horas.

5.9 Avaliação da proliferação celular

As mudanças na proliferação celular realizadas com PSMA-617 são mostradas na Figura 21.

Figura 21: Razões de núcleo-beads de células em relação ao controle (*fold-increase*) CHO-K1 tratadas com PMSA-617 após 4 ou 24 horas de

incubação. (**): $p < 0,01$. (***): $p < 0,001$. (****): $p < 0,0001$. MTMC: controle de mitomicina; COLCH: controle colchicina.

Somente o controle positivo (colchicina) demonstrou a redução da proliferação celular em culturas tratadas com PMSA-617, em 4 horas.

Em 24 horas, há redução da proliferação nos controles positivos (mitomicina e colchicina) e na concentração 1630 ng/mL (100 vezes) estatisticamente significante comparados com o controle de células.

5.10 Teste de potencial genotóxico do fármaco PSMA-11

A frequência de micronúcleos em PSMA-11, como mostrado na Figura 22.

Figura 22: Aumento da porcentagem de micronúcleos em relação ao controle (*fold-increase*) em culturas celulares de CHO-K1 com concentrações de PMSA-11 e controles, após 4 e 24 horas de exposição. (*): $p < 0,05$. (***): $p < 0,01$. (****): $p < 0,001$. MTMC: controle de mitomicina; COLCH: controle colchicina.

Em 4 horas de exposição, nenhuma concentração induziu aumento na porcentagem da frequência de micronúcleos comparado estatisticamente com o controle de células (CC).

A exposição de 24 horas, apenas os controles positivos MTMC e COLCH apresentaram aumento na porcentagem, comparando com o controle de células (CC)

5.11 Avaliação da proliferação celular

As mudanças na proliferação celular realizadas com PSMA-11 são mostradas na Figura 23.

Figura 23: Razões de núcleo-beads de células em relação ao controle (*fold-increase*) CHO-K1 tratadas com PMSA-11 após 4 ou 24 horas de incubação. (**): $p < 0,01$. (***): $p < 0,001$. (****): $p < 0,0001$. MTMC: controle de mitomicina; COLCH: controle colchicina.

Apenas a exposição aos controles positivos induziu redução significativa da proliferação celular em relação aos controles, tanto nos experimentos de 4 quanto nos de 24 horas de incubação.

5.12 Teste de potencial genotóxico do fármaco Ubiquidina

A frequência de micronúcleos em Ubiquidina, como mostrado na Figura 24.

Figura 24: Aumento da porcentagem de micronúcleos em relação ao controle (*fold-increase*) em culturas celulares de CHO-K1 com concentrações de UBI₂₉₋₄₁ e controles, após 4 e 24 horas de exposição. (*): $p < 0,05$. (*): $p < 0,01$. (****): $p < 0,001$. MTMC: controle de mitomicina; COLCH: controle colchicina.**

Apenas a exposição aos controles positivos induziu aumento significativo da frequência de micronúcleos em relação aos controles, tanto nos experimentos de 4 quanto nos de 24 horas de incubação.

5.13 Avaliação da proliferação celular

As mudanças na proliferação celular realizadas com Ubiquidina são mostradas na Figura 25.

Figura 25: Razões de núcleo-beads de células em relação ao controle (*fold-increase*) CHO-K1 tratadas com UBI₂₉₋₄₁ após 4 ou 24 horas de incubação. (): $p < 0,01$. (***): $p < 0,001$. (****): $p < 0,0001$. MTMC: controle de mitomicina; COLCH: controle colchicina.**

Apenas a exposição aos controles positivos induziu redução significativa da proliferação celular em relação aos controles, tanto nos experimentos de 4 quanto nos de 24 horas de incubação.

6 Discussão

O ensaio de micronúcleos por citometria de fluxo foi escolhido pois oferece mais rapidez e confiabilidade na análise, que passa a ser objetiva. Embora outras modificações positivas possam ser possíveis nas metodologias de contagem por microscopia, (Ocampo *et al.*, 2016), o experimento demandava dias para a finalização. Com a técnica automatizada, além da contagem de micronúcleos, pode ser observada até as características dos núcleos, como o tamanho e rugosidade, através dos *lasers*. Observa-se também a disposição dos poços, analisando a homogeneidade da pipetagem de acordo com a disposição da placa (Bemis *et al.*, 2016). Sendo uma técnica de microscopia, a análise da frequência de micronúcleos em dada amostra pode enfrentar certos desafios operacionais. Apesar de ter recebido diversas

modificações ao longo dos anos, há a necessidade de automatização da tecnologia para aplicação em larga escala.

No presente estudo, não houve a necessidade de aprofundar em ensaios mutagênicos, e como foi usado somente células de mamífero (CHO-K1), o teste de Ames não foi necessário, uma vez que, o objetivo era identificar micronúcleos por meio de citometria.

O ensaio de micronúcleo é um dos testes mais usados para avaliação de dano genotóxico (OECD, 2016). Pode ser usado para agentes químicos e físicos, como a radiação (Bryce *et al.*, 2007). O experimento realizado com radiação foi feito para padronizar a técnica modernizada (citometria de fluxo).

As doses de radiação mais elevadas (8 e 16Gy) podem induzir um aumento significativo na porcentagem de micronúcleos, apesar de sua ocorrência estar associada a uma resposta linear-quadrática. Os dados poderão ser utilizados para a construção de uma curva padrão para dosimetria biológica, usando linfócitos periféricos em vez de células CHO-K1 (Fenech *et al.*, 1991). As células CHO-K1 são relativamente resistentes à apoptose ou necrose radioinduzida quando irradiadas por doses de até 5Gy (OECD, 2004). Usando este parâmetro, os resultados atuais podem ser considerados consistentes e bem representativos do comportamento fisiológico de CHO-K1 quando irradiados por radiação gama.

Por razões de segurança farmacológica, foram realizados experimentos com concentrações maiores, além até das praticáveis, comprovando assim que os compostos-teste não apresentam genotoxicidade apreciável.

Os resultados obtidos não foram capazes de detectar fenômenos que pudessem ser interpretados como derivados de genotoxicidade, nem mecanismos capazes de induzi-la, em células CHO-K1 tratadas com concentrações entre 10 a 1000% das concentrações de uso de Ubiquidina ou

das formas -11 e -617 de PSMA em adultos, nem mesmo em incubações por 24 horas.

A genotoxicidade do PSMA-617 foi identificada somente nos controles positivos e na concentração de 100x, após 24 horas de exposição. Para PSMA-11 e UBI, apenas os controles positivos induziram dano, significando que mesmo acima do limite de dose por paciente, essas concentrações não são capazes de danificar o DNA.

A quantidade de células inviáveis não deve ser considerada em ensaios de genotoxicidade, pois a presença de dano genotóxico em células que não poderão prosseguir em seus ciclos de vida é considerada irrelevante do ponto de vista de carcinogênese. Se uma célula que carrega dano ao DNA, ainda que extenso, não continuará a se reproduzir, tal dano não tem chance de propagação à sua progênie. A contabilização destes eventos levaria a desvios que podem induzir a superestimativas de dano (Mavragani *et al.*, 2017). Nenhuma concentração de fármaco induziu aumento significativo do número de células inviáveis (dados não mostrados).

Usando uma relação de núcleos e esferas, onde as *beads* são dispersas homogeneamente entre os poços, a análise pode determinar se alguma dose de radiação ou exposição química reduziu ou aumentou o número de núcleos em uma amostra. Os dados dessa análise podem substituir a análise de CBPI (índice de proliferação mediante o bloqueio da citocinese), que é impraticável neste contexto, uma vez que, a lise das membranas celulares impossibilita a análise de células binucleadas (Avlasevich *et al.*, 2011). Os controles positivos reduziram a proliferação. O controle colchicina, apesar de induzir significativo dano genotóxico, não reflete necessariamente na redução da proliferação. De acordo com (Chen *et al.*, 2014), os micronúcleos causados pela ação da colchicina podem ser reincorporados ao núcleo até o término da divisão celular por ser uma não-disjunção (aneugênico) e refletir na proliferação.

A colchicina demonstrou também um dano maior que a mitomicina na frequência de micronúcleos. De acordo com a literatura, a colchicina afeta a

formação de microtúbulos, que origina a polimerização da tubulina e permite a capacidade de divisão mitótica (Hashimoto *et al.*, 2010), e interagindo com a CHO-K1, que possui proteínas como a ciclina β (Chang *et al.*, 2008) que regulam o ciclo (aumentando ou diminuindo a atividade celular), podem demonstrar oscilações diretamente ligadas à divisão celular. Desta forma, aumento de micronúcleos pode estar ligado nesta interação da tubulina com a ciclina. Incubações por 24 horas aparentemente reduzem o efeito genotóxico da mitomicina, que não pode ser observado no presente trabalho nestas condições. A recente sugestão sobre incubações feita pela OECD (OECD, 2016) mostra que as células devem ser expostas ao produto químico em teste com ativação metabólica por 3-6 horas e expostas em um tempo equivalente a cerca de 1,5 a 2,0 ciclos normais após o início do tratamento. O presente estudo optou por incubação de 24 horas como tentativa de simulação de tempo máximo da presença de fármacos no organismo, bem como utilizou concentrações muito maiores do que as praticáveis.

Não foram feitas análises aprofundadas sobre o dano direto ao DNA causada por esses fármacos estudados. Ainda assim algumas considerações devem ser feitas. É importante ter como exemplo o [^{18}F]-FLT ([^{18}F]-Fluortimidina ou Fludesoximidina) que é um nucleosídeo análogo da timidina e, um dos blocos construtores dos ácidos nucleicos (RNA ou DNA). O FLT é apenas fracamente incorporado ao DNA e a timidina quinase 1 pode ser regulada mesmo durante uma inibição da síntese do DNA (Anthony F. Shields, 2003). Além disso, o aumento da captação de FLT- ^{18}F pode ser estimulado pelo mecanismo de reparação celular ou pela via de recuperação do metabolismo pirimidínico. Ou seja, para esta molécula, há a evidência do mecanismo de associação ao DNA que poderia ser o efector das quebras observadas, pois trata-se de um nucleosídeo que seria incorporado ao DNA pela própria progressão da etapa de síntese de DNA (fase S) do ciclo celular. Para moléculas peptídicas tal associação não é direta.

No entanto há estudos sobre o PSMA (Mhawech-fauceglia *et al.*, 2008), que o descrevem como possuidor de atividade enzimática de folato hidrolase na superfície das células que pode ser responsável pela receptação

celular do folato poli-Y-glutamato liberado no meio intersticial pelas células mortas dentro do tumor. Esta ação possibilita que a forma livre do folato participe da síntese e metilação de DNA e síntese de poliaminas, importante para a proliferação celular. A metilação é um fator de indução de fragilidade do DNA (Sedgwick, 2004). No entanto trata-se de um estudo feito com células não tumorais, de modo a não se ter certeza de que esse folato possa reagir com todos os tipos de células, até as não-tumorais. Já a UBI, não foi encontrado até o presente momento pesquisas que discorram sobre.

7 Conclusão

O PSMA-617 e o PSMA-11 não induziram genotoxicidade até 10 vezes a concentração máxima utilizadas em pacientes, não importando o tempo de exposição. Em concentrações 100 vezes maiores do que as utilizadas, induz dano bastante significativo desde que a incubação perdure por até 24 horas no PSMA-617. A Ubiquidina não apresentou genotoxicidade em nenhuma concentração. Além disso, a técnica foi capaz de detectar micronúcleos de maneira sensível em culturas irradiadas, mostrando sua utilidade também em dosimetria biológica das radiações ionizantes.

Referências

AKHTAR, M. S. *et al.* Antimicrobial Peptide 99mTc-Ubiquicidin 29–41 as Human Infection-Imaging Agent: Clinical Trial Muhammad. **The Journal Of Nuclear Medicine**, v. 46, n. 4, p. 567–574, 2005.

ANTHONY F. SHIELDS, MD, P. PET Imaging with 18 F-FLT and Thymidine Analogs : Promise and Pitfalls. **The Journal Of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 9, p. 1432–1435, 2003.

AVLASEVICH, S. *et al.* Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures : past , present and future. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 147–152, 2011.

BANERJEE, S. R. *et al.* 68Ga-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5333–5341, 2010.

BEEDANAGARI, S. *et al.* Genotoxicity biomarkers : Molecular basis of genetic variability and susceptibility. *In: Biomarkers in Toxicology*. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 729–742.

BEMIS, J. C. *et al.* Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Best practices for application of attachment cells to in vitro micronucleus assessment by flow cytometry. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 795, p. 51–59, 2016.

BIGNOLD, L. P. Mutation Research / Reviews in Mutation Research Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations : A critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 681, p. 271–298, 2009.

BONASSI, S. *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans.

Carcinogenesis, v. 28, n. 3, p. 625–631, 2007.

BRYCE, S. 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. 1–2, p. 78–91, jun. 2007.

BRYCE, S. M. *et al.* Investigating the Generalizability of the MultiFlow V DNA Damage Assay and Several Companion Machine Learning Models With a Set of 103 Diverse Test Chemicals. **Toxicological Sciences**, v. 162, n. 1, p. 146–166, 2018.

BRYCE, S. M. ET AL. Interlaboratory Evaluation of a Multiplexed High Information Content In Vitro Genotoxicity Assay. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 58, n. 3, p. 146–161, 2017.

CANNAVO, E.; CEJKA, P. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. **Nature**, v. 514, n. 7520, p. 122–125, 2014.

CEJKA, P. DNA End Resection : Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous. **The Journal of biological chemistry** vol. v. 290, n. 38, p. 22931–22938, 2015.

ÇELİK, A.; ÖĞENLER, O.; ÇÖMELEKOĞLU, Ü. 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.

CHAIRMAN, W. S. S.; TIPTON, M. J. C. E. S. N. L. R. K. G. P. H. I. H. **Report of the Task Group on Reference Man**. U.K.; U.S.A; KOREA; JAPAN: [s.n.].

CHANG, Y.-C. *et al.* Expression of tumor suppressor p53 facilitates DNA repair but not UV-induced G2/M arrest or apoptosis in Chinese hamster ovary CHO-K1 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 528–537, 2008.

CHEN, P.-F. *et al.* Colchicine-induced degeneration of the micronucleus during conjugation in *Tetrahymena*. **Biology Open**, v. 3, n. 5, p. 353–361, 2014.

CHEN, Y. *et al.* Validating high-throughput micronucleus analysis of peripheral reticulocytes for radiation biodosimetry: Benchmark against dicentric and cbmn assays in a mouse model. **Health Physics**, v. 98, n. 2, p. 218–227, 2010.

CLERICI, M. *et al.* The Yku70–Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. **European Molecular Biology Organization**, v. 9, n. 8, 2008.

COOPER, G. M. **DNA repair. In The cell: A molecular approach.** 2nd. ed. Sunderland, MA: [s.n.].

DEXHEIMER, T. S. DNA repair pathways and mechanisms. *In*: MATTHEWS, S. M. CABARCAS, AND E. H. (Ed.). . **DNA repair of cancer stem cells.** 1. ed. L.A.: Springer Netherlands, 2013. p. 180.

FELL, V. L.; SCHILD-POULTER, C. Mutation Research / Reviews in Mutation Research The Ku heterodimer : Function in DNA repair and beyond. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 763, p. 15–29, 2015.

FENECH, M. F. *et al.* The cytokinesis-block micronucleus assay as a biological dosimeter in spleen and peripheral blood lymphocytes of the mouse following acute whole-body irradiation. **Mutation Research Letters**, v. 263, n. 2, p. 119–126, 1991.

FLORES, G. F.; MURPHY, C. A. DE; ALAFORT, L. M. **Tc-UBI 29-41 : Péptido antimicrobiano radiomarcado para el diagnóstico por imagen de procesos infecciosos**, 2005.

FOSS, C. A. *et al.* Radiolabeled Small-Molecule Ligands for Prostate-Specific Membrane Antigen : In vivo Imaging in Experimental Models of Prostate Cancer. **Imaging, Diagnosis, Prognosis**, v. 11, n. 11, p. 4022–4029, 2005.

FURNESS, D. L. F.; DEKKER, G. A.; HAGUE, W. M. Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and / or intrauterine growth restriction. **Mutagenesis**. v. 25, n. 5, p. 489–498, 2010.

GARTY, G. *et al.* An automated imaging system for radiation biodosimetry. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, n. 7, p. 587–598, 2015.

HALL, E. J. *et al.* Basic radiobiology. *In: American journal of clinical oncology*. [s.l: s.n.]. v. 11p. 220–252.

HANG, B. Formation and Repair of Tobacco Carcinogen-Derived Bulky DNA Adducts. **Journal of nucleic acids** v. 2010, p. 29, 2010.

HASHIMOTO, K. *et al.* An in vitro micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 208–216, 2010.

HEDDLE, J. A. *et al.* Reflections on the development of micronucleus assays. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 3–10, 2011.

HELLEDAY, T. *et al.* DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. v. 6, p. 923–935, 2007.

HILLIER, S. M. *et al.* 99mTc-Labeled Small-Molecule Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen for Molecular Imaging of Prostate Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, n. 8, p. 1369–1376, 2013.

IAEA. **Cytogenetic Dosimetry : Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies**. 3. ed. Viena: [s.n.].

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

KIRSCH-VOLDERS, M. *et al.* The in vitro MN assay in 2011: Origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 8, p. 873–899, 2011.

KYOYA, T. *et al.* The effect of different methods and image analyzers on the results of the in vivo comet assay. **Genes and Environment**, v. 40, n. 4, p. 1–7, 2018.

LUPETTI, A. *et al.* Radiotracers for fungal infection imaging. **Medical Mycology**, v. 49, n. SUPPL. 1, p. 62–69, 2011.

LÜTJE, S. *et al.* PSMA ligands for radionuclide imaging and therapy of prostate cancer: Clinical status. **Theranostics**, v. 5, n. 12, p. 1388–1401, 2015.

MARESCA, K. P. *et al.* A Series of Halogenated Heterodimeric Inhibitors of Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) as Radiolabeled Probes for Targeting Prostate Cancer. p. 347–357, 2009.

MARTINS, DANIELE MINGUINI; GAGLIANI, L. H. IMPORTÂNCIA DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEUCEMIAS. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 5, n. 8, p. 5–24, 2008.

MAVRAGANI, I. V. *et al.* Complex DNA damage: A route to radiation-induced genomic instability and carcinogenesis. **Cancers**, v. 9, n. 7, p. 1–21, 2017.

MHAWECH-FAUCEGLIA, P. *et al.* Prostate-Specific Membrane Antigen Expression Is a Potential Prognostic Marker in Endometrial Adenocarcinoma. **American Association for Cancer Research** v. 17, n. March, p. 571–578, 2008.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29–60, 2000.

NASCIMENTO, P. A. *et al.* Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 165–176, 2001.

NÜSSE, M.; KRAMER, J. Flow cytometric analysis of micronuclei found in cells after irradiation. **Cytometry**, v. 5, n. 1, p. 20–25, 1984.

NUSSE, M.; MARX, K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: Advantages and disadvantages. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, p. 109–115, 1997.

OCAMPO, I. Z. *et al.* In vitro cytotoxic and genotoxic evaluation of peptides used in nuclear medicine (DOTATATE and Ubiquicidin29-41) in CHO-K1 cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2301–2310, 2016.

OECD. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. **OECD Publishing**, n. July, p. 29, 2016.

OSTOVAR, A. *et al.* A Pooled Analysis of Diagnostic Value of 99m Tc-Ubiquicidin (UBI) Scintigraphy in Detection of an Infectious Process. **Clinical Nuclar Medicine**, v. 38, n. 38, p. 413–416, 2013.

PALESTRO, C. J.; GLAUDEMANS, A. W. J. M.; DIERCKX, R. A. J. O. Multiagent imaging of inflammation and infection with radionuclides. **Clinical and Translational Imaging**, v. 1, n. 6, p. 385–396, 2013.

PIERCE, B. A. **Genética: Um Enforque Conceitual**. Rio de Janeiro: [s.n.].

PRESTON, R. J. *et al.* Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U . S . EPA ' s Gene-Tox Program I Summary This report presents an assessment made by the U . S . Environmental Protection clastogenic effects of chemicals in in vivo and in vitro mammali. **Mutation Research**, v. 87, n. 79, p. 143–188, 1981.

SANTOS, G. S. *et al.* Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with⁶⁰Co gamma-radiation. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 762, p. 17–23, 2014.

SCHREIBER, G. A. *et al.* Multiparametric Flow Cytometric Analysis of Radiation-Induced Micronuclei in Mammalian Cell Cultures. **Cytometry**, v. 13, n. 1, p. 90–102, 1992.

SEDGWICK, B. Repairing DNA-methylation damage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 148–157, 2004.

SILVER, A.; FAIR, R. Prostate-specific Membrane Antigen Expression in Normal and Malignant Human Tissues. **Clinical Cancer Research**, v. 3, n. January, p. 81–85, 1997.

SINGH, N. P. Mutation Research / Reviews in Mutation Research The comet assay : Re fl ections on its development , evolution and. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 23–30, 2016.

SŁOCZYŃSKA, K. *et al.* Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 2, p. 273–285, 2014.

SPEIT, G.; ZELLER, J.; NEUSS, S. The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomonitoring studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 107–110, 2011.

STEVEN M.BRYCE, SVETLANA L. AVLASEVICH, JEFFREY C. BEMIS, AND S. D. Miniaturized Flow Cytometry-Based CHO-K1 Micronucleus Assay Discriminates Aneugenic and Clastogenic Modes of Action. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 36, n. 1, p. 249–255, 2011.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES *et al.* Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. **Guidance for Industry**, v. 2, n. June, p. 1–31, 2012.

UMBRICHT, C. A. *et al.* Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with 177 Lu-PSMA-617 — preclinical investigations in comparison with. **EJMMI Research**, 2017.

VALENTE, D. *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional** v 42 n 2. January, 2018.

WILLIAMS, R. S. *et al.* Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 97–109, 2009.

ZHOU, J. *et al.* NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 12, p. 1015–1026, 2005.

ZHU ZHU^{1, 3}, WOO-HYUN CHUNG^{1, 3}, EUN YONG SHIM², SANG EUN LEE², AND G. I. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double strand break ends. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 981–994, 2008.

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

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