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

**“ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO DE RADIOFÁRMACO MARCADO COM ^{99m}Tc
PELO MÉTODO INVASIVO E NÃO INVASIVO UTILIZANDO O MICRO
PET/SPECT/CT.”**

RAFAEL FERREIRA CAMPOS

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

**Orientadora:
Profa. Dra. ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO**

**São Paulo
2020**

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

**“ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO DE RADIOFÁRMACO MARCADO COM ^{99m}Tc
PELO MÉTODO INVASIVO E NÃO INVASIVO UTILIZANDO O MICRO
PET/SPECT/CT.”**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

RAFAEL FERREIRA CAMPOS

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

**Orientadora:
Profa. Dra. ELAINE BORTOLETI DE
ARAÚJO**

**São Paulo
2020**

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

Como citar:

Campos, F.C. **Estudo de biodistribuição de radiofármaco marcado com ^{99m}Tc pelo método invasivo e não invasivo utilizando o micro PET/SPECT/CT.** 2020, 95 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>.

Ficha catalográfica

Ferreira Campos, Rafael

Estudo de biodistribuição de radiofármacos marcados com ^{99m}Tc pelo método invasivo e não invasivo utilizando o micro PET/SPECT/CT. / Rafael Ferreira Campos; orientadora professora Dra. Elaine Bortoleti de Araújo - - São Paulo, 2020.

95 p.

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

1. Radiofármacos. 2. Controle de Qualidade. 3. Radiologia. 4. Física Médica. 5. Biodistribuição. I. Bortoleti de Araújo, Elaine, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Rafael Ferreira Campos.

Título: Estudo de biodistribuição de radiofármacos marcados com ^{99m}Tc pelo método invasivo e não invasivo utilizando o micro PET/SPECT/CT.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof.: Dra.: Elaine Bortoleti de Araújo. Julgamento: _____
Instituição: Instituto de Pesquisas energéticas e Nucleares.

Prof.: Dra.: Margareth Mie Nakamura Matsuda. Julgamento: _____
Instituição: Instituto de Pesquisas energéticas e Nucleares.

Prof.: Dr.: Sergio Querino Brunetto. Julgamento: _____
Instituição: UNICAMP.

Prof.: Dra.: Maria Ines Calil Cury Guimarães. Julgamento: _____
Instituição: Faculdade de Medicina da Faculdade de São Paulo.

Prof.: Dra.: Ana Claudia Machado Silva. Julgamento: _____
Instituição: A.C. Camargo.

Prof.: Dra.: Raquel Benedetto. Julgamento: _____
Instituição: MCE Farmácia Industrial

AGRADECIMENTOS

Seguindo via de protocolo agradeço primeiramente a minha orientadora Dra. Elaine Bortoleti de Araújo por aceitar o desafio de me orientar e sair de sua zona de conforto expandindo assim nossos conhecimentos.

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo por me dar a sabedoria e paciência necessária para moldar a conclusão desta obra.

Ao Dr. Phillip Patrick Cerri Dmitruk pelo apoio financeiro e flexibilidade com meus horários de trabalho. O qual, sem sua ajuda não seria possível a conclusão desta pesquisa.

Ao Msc. Natanael G. da Silva pela parceria e por toda ajuda e suporte no acompanhamento dos experimentos deste trabalho no IPEN e na Unicamp.

Ao Msc. Vicente de Paulo de Campos e ao Dr. Orlando Rodrigues Junior por disponibilizar os dosímetros e o laboratório de dosimetria do IPEN.

Ao Dr. Sergio Brunetto e sua equipe pelas orientações, por disponibilizar seu laboratório de imagens pré-clínicas e por confiar e me deixar a vontade em seu laboratório.

Ao Técnico de controle de qualidade biológico do Centro de Radiofarmácia, Jurandir Alves de Souza (Jurambeba), pela paciência e os cuidados com os animais usados nos experimentos.

A secretaria Bruna Roque da Silva pela parceria e toda a ajuda tornando mais simples todos os processos do IPEN.

Agradeço à Gorda. O amor e carinho de um Pet é muito confortante em momentos difíceis.

"No caminho das altas ciências, não convém empenhar-se temerariamente, mas, uma vez em caminho, é preciso, chegar ou perecer. Duvidar é ficar louco; parar é cair; voltar para traz é precipitar-se num abismo."

(Eliphas Levi)

"In Omnia Paratus..."

RESUMO

Campos, F.C. **Estudo de biodistribuição de radiofármaco marcado com ^{99m}Tc pelo método invasivo e não invasivo utilizando o micro PET/SPECT/CT.** 2020, 95 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

As farmacopeias Europeia e Americana (USP) recomendam que estudos de controle de qualidade de radiofármacos envolvendo sistemas biológicos sejam realizados por métodos invasivos. Entretanto, esses métodos consomem tempo considerável, contribuindo para a exposição do trabalhador à radiação. Por outro lado, a imagem pré-clínica permite uma perspectiva de estudos longitudinais, com potencial para fornecer medições quantitativas de biodistribuição de radiotraçadores e reduzir o número de animais necessários por estudo, sendo mais econômico e mais ético do que os métodos tradicionais encontrados na literatura. Este trabalho avaliou o potencial do método de imagem em micro SPECT/CT na avaliação quantitativa da biodistribuição do radiofármaco DMSA-TEC marcado com ^{99m}Tc , comparando os resultados com o método invasivo. A pureza radioquímica das marcações realizadas para método não invasivo apresentou resultado em média de $90,43 \pm 1,59 \%$, atendendo ao critério de aceitação ($\geq 85\%$, USP). A quantificação da captação do radiofármaco nos órgãos de interesse (rins e fígado+baço) foi realizada a partir de imagens SPECT/CT, pré-processadas com o algoritmo iterativo OSEM. Os órgãos de interesse foram selecionados e o processamento das imagens foi realizado pelo software Pmod 4.0. Apesar do método não invasivo produzir resultados quantitativos de %A.I. nos rins que não atenderam ao critério farmacopeico, promoveu resultados reprodutíveis, sugerindo que o método possa ser aprimorado para aplicação na rotina de análise de lotes de radiofármacos, considerando a possibilidade de estabelecimento de correlação quantitativa com o método invasivo e a definição de critérios de aceitação próprios para o método não invasivo. A reprodutibilidade demonstrada pelo método não invasivo

encoraja sua aplicação para obtenção de resultados quantitativos em estudos relacionados ao desenvolvimento de novos radiofármacos.

Palavras-Chaves: Radiofármacos, Quantificação, Radiologia

ABSTRACT

Campos, F.C. **Estudo de biodistribuição de radiofármaco marcado com ^{99m}Tc pelo método invasivo e não invasivo utilizando o micro PET/SPECT/CT.** 2020. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

The European and American pharmacopoeias (USP) recommend that quality control studies of radiopharmaceuticals involving biological systems be performed by invasive methods. However, these methods consume considerable time, contributing to the worker's exposure to radiation. On the other hand, pre-clinical imaging allows a perspective of longitudinal studies, with the potential to provide quantitative measurements of radiotracer biodistribution and reduce the number of animals required per study, being more economical and more ethical than the traditional methods found in the literature. This work evaluated the potential of the micro SPECT / CT imaging method in the quantitative assessment of the biodistribution of the ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceutical DMSA-TEC, comparing the results with the invasive method. The radiochemical purity of the labeling kits employed in the study by the non-invasive method showed an average result of $90.43 \pm 1.59\%$, meeting the acceptance criterion ($\geq 85\%$, USP). Quantification of radiopharmaceutical uptake in the organs of interest (kidneys and liver+spleen) was performed using SPECT/CT images, pre-processed with the OSEM iterative algorithm. The organs of interest were selected and the image processing was performed using the Pmod 4.0 software. Although the non-invasive method produced quantitative results of % A.I. in kidneys that did not meet the pharmacopoeial criterion, it promoted reproducible results, suggesting that the method can be improved and standardized for application in the routine of batch analysis of technetium-99m radiopharmaceuticals, considering the possibility of establishing a quantitative correlation with the invasive method and the definition of specific acceptance criteria for the non-invasive method. The reproducibility demonstrated by the non-invasive method encourages its application to obtain quantitative results in studies related to the development of new radiopharmaceuticals.

Keywords: Radiopharmaceuticals, Quantification, Radiology

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	24
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	25
3.1. <i>Princípio da medicina nuclear</i>	25
3.2 <i>Radiofármacos</i>	26
3.3 <i>Características do ^{99m}Tc</i>	28
3.4 <i>Métodos de imagem usados na Medicina Nuclear</i>	29
3.4.1 Imagens de projeção planar	30
3.4.2 Câmera de cintilação Anger.....	31
3.4.3 Colimadores.....	32
3.4.4 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (Single-Photon Emission Computed Tomography - SPECT)	33
3.4.5 Tomografia por Emissão de Pósitrons (<i>Positron Emission Tomography</i> - PET)	35
3.4.6 Imagens Híbridas.....	37
3.5 <i>Albira: Micro PET/SPECT/CT</i>	37
3.6 <i>Quantificação de imagens SPECT pelo micro PET/SPECT/CT</i>	39
3.6.1 Reconstrução de Imagens	41
3.6.2 OSEM	42
3.7 <i>Fenômenos que interferem na quantificação da imagem</i>	44
3.7.1 Background.....	45
3.7.2 Atenuação de Fótons.....	45
3.7.3 Radiação Dispersa.....	46
3.7.4 Efeito de Volume Parcial (PVE)	47
3.7.5 Determinação do Fator de Calibração	48
4 MATERIAIS	51
4.1 <i>Infraestrutura</i>	51
4.2 <i>Reagentes e soluções</i>	51
4.3 <i>Equipamentos e materiais</i>	51
4.4 <i>Animais</i>	52
5 MÉTODOS	53
5.1 <i>Marcação do reagente liofilizado DMSA-TEC com tecnécio-99m</i>	53
5.1.1 Marcação do DMSA-TEC com ^{99m} Tc, conforme descrita na bula do produto:.....	54
5.2 <i>Marcação e Controle de Pureza Radioquímica</i>	55

5.3 <i>Biodistribuição pelo método invasivo</i>	58
5.4 <i>Biodistribuição pelo método não invasivo</i>	60
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.2 <i>Pureza Radioquímica</i>	63
6.3 <i>Avaliação da Biodistribuição pelo Método Invasivo</i>	64
6.4 <i>Avaliação da biodistribuição pelo método não invasivo</i>	67
6.5 <i>Avaliação quantitativa entre os métodos</i>	77
7 CONCLUSÃO	87
ANEXO A	88
8 REFERÊNCIAS	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cintilografia renal planar com DMSA-TEC marcado com ^{99m}Tc de uma cobaia usada no estudo.	31
Figura 2 - Descrição esquemática dos princípios e componentes básicos de uma câmera de cintilação Anger.	32
Figura 3 - Simulação do sistema SPECT com trajeto circular em vários ângulos ao redor do paciente.	34
Figura 4 - Ilustração do esquema de aquisição de imagens em sistema PET.	36
Figura 5 - Equipamento de imagem Albira e suas 4 unidades, A (Unidade de Preparação Animal), B (Unidade do PET, SPECT e CT), C (Unidade de sensores eletrônicos) e D (Unidade de controle).	39
Figura 6 - Dimensões e pontos de corte da Fita cromatográfica de papel Whatman 3MM empregada no controle de pureza radioquímica do DMSA-TEC radiomarcado com tecnécio-99m: cálculo de % de $^{99m}\text{TcO}_4$	56
Figura 7 - Dimensões e pontos de corte da Fita cromatográfica de TLC-SG (suporte aluminizado com fina camada de sílica gel) empregada no controle de pureza radioquímica do DMSA-TEC radiomarcado com tecnécio-99m: cálculo de % de $^{99m}\text{TcO}_2$	56
Figura 8 - % A.I. nos rins nos diferentes lotes de DMSA-TEC analisados pelo método invasivo.	66
Figura 9 - Relação de % A.I. para rins/fígado+baço ($\geq 6\%$) para os lotes de DMSA-TEC analisados pelo método invasivo.	67
Figura 10 - Imagem SPECT renal de rato Wistar após administração do radiofármaco DMSA-TEC radiomarcado com tecnécio-99m, com aplicação de filtro Gaussiano nos planos Axial, Coronal e sagital.	68
Figura 11 - Imagem SPECT renal de rato Wistar após administração do radiofármaco DMSA-TEC radiomarcado com tecnécio-99m, sem aplicação de filtro Gaussiano nos planos Axial, Coronal e sagital.	69
Figura 12 - Processamento da imagem da seringa de 5mL. Seleção dos VOI's para quantificação nos planos axiais, coronais e sagitais.	70
Figura 13 - Processamento da imagem planar em recipiente plano com filtro gaussiano de 3.0 e Threshold de 50%.	71
Figura 14 - Imagem SPECT com delimitação dos VOIs nos planos Sagital, Coronal e Axial.	72
Figura 15 - Imagem fundida entre os métodos de CT e SPECT com VOIs do fígado delimitados pelo CT.	73
Figura 16 - Imagem estática (planar) dos rins mostrando a delimitação dos VOIs para quantificação dos rins e bexiga.	75
Figura 17 - % A.I. nos rins de seis animais analisados pelo método SPECT abaixo do limite de aceitação estabelecido pela farmacopeia USP.	76
Figura 18 - Relação de % A.I. para rins/fígado+baço ($\geq 6\%$) para os lotes de DMSA-TEC analisados pelo método não invasivo.	77
Figura 19 - Estudo de normalidade dos rins para o método invasivo.	82

Figura 20 - Estudo de normalidade da razão rins/fígado+baço para o método invasivo	83
Figura 21 - Estudo de normalidade dos rins para o método não invasivo.	84
Figura 22 - Estudo de normalidade da razão rins/fígado+baço para o método não invasivo.	85

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Conteúdo do frasco liofilizado (DMSA-TEC).....	53
Tabela 2 - Fatores de retenção (Rf) das espécies radioquímicas envolvidas na marcação do kit de DMSA-TEC com tecnécio-99m, para os dois sistemas cromatográficos empregados.	57
Tabela 3 - Biodistribuição do radiofármaco succímer (^{99m} Tc) utilizando método invasivo.	59
Tabela 4 - Critérios de aceitação para o estudo de biodistribuição invasivo (USP).	59
Tabela 5 - Biodistribuição do radiofármaco succímer (^{99m} Tc) utilizando método não invasivo.	62
Tabela 6 - Porcentagem de Pureza Radioquímica da marcação de kit de DMSA-TEC com ^{99m} Tc empregado nos estudos de distribuição biológica não invasivos para o lote 002/19.....	63
Tabela 7 - Porcentagem de Pureza Radioquímica da marcação de kit de DMSA-TEC com ^{99m} Tc empregados nos estudos de distribuição biológica não invasivos para o lote 003/19.....	63
Tabela 8 - Porcentagem de Pureza Radioquímica da marcação de kit de DMSA-TEC com ^{99m} Tc empregados nos estudos de distribuição biológica não invasivos para o lote 004/19.....	64
Tabela 9 - Resultados dos estudos de biodistribuição de nove lotes de DMSA-TEC produzidos no IPEN no período de janeiro a setembro de 2018.....	65
Tabela 10 - Resultados obtidos da quantificação do DMSA-TEC lote 002/19 realizado pelo método de imagens estática.	73
Tabela 11 - Resultados obtidos da quantificação do DMSA-TEC lote 003/19 realizado pelo método de imagens estática.	74
Tabela 12 - Resultados obtidos da quantificação do DMSA-TEC lote 003/19 realizado pelo método de imagens SPECT.....	74
Tabela 13 - Resultados obtidos da quantificação do DMSA-TEC lote 004/19 realizado pelo método de imagens SPECT.....	75
Tabela 14 - Resultados dos critérios comparados entre o método invasivo e não invasivo.	79

LISTA DE SIGLAS

%AI - Porcentagem de atividade injetada

2D - Bidimensionais

3D – Tridimensionais

^{99m}Tc – Tecnécio 99 metaestável

^{99m}TcO₂ – Tecnécio coloidal

^{99m}TcO₄⁻ - Pertecnetato Livre

A – Atividade

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CB - Centro de Biotecnologia

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

CR – Centro de Radiofarmácia

CT – *Computer Tomography* (Tomografia Computadorizada)

DMSA-TEC – Ácido 2,3-dimercaptosuccínico

ECT - *Emission Computed Tomography* (tomografia computadorizada de emissão)

FC – Fator de Calibração

FOV - *Field Of View*

FWHM - *Full-Width at Half Maximum*

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

keV – Quilo eletrôn-volt

LDT – Laboratório de Dosimetria Termoluminescente

LIP - Laboratório de Imagens Pré-Clínicas

MBq/mL – Megabecquerel por Mililitro

mCi – MiliCurie

MLEM - *Maximum-Likelihood Expectation Maximization*

MRI – *Magnetic Resonance Image* (Imagem de Ressonância Magnética)

NaI(Tl) - Iodeto de Sódio Dopado com Tálcio

Nc – Número de Contagens

OSEM - *Ordered-Subsets Expectation Maximization*

PET – *Positron Emission Tomography* (Tomografia por Emissão de Póstron)

PMT - Tubos fotomultiplicadores

PSPMT - Position Sensitive Photomultiplier (Fotomultiplicadora Sensível a Posição)

PVE – *Partial Volume Effect*

RC - *Recovery Coefficient*

Rf – Fator de retenção

RL – Reagente Liofilizado

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

S – Sensibilidade

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SPECT - *Single Photon Emission Computed Tomography* (Tomografia computadorizada de emissão de fóton único)

TLD - *thermoluminescent dosimeter*

UNICAMP – Universidade de Campinas

USP - United States Pharmacopeia

VOI – *Volume Of Interest*

Voxel - Volume Element

W1MM – Whatman 1MM

W3MM – Whatman 3M

1 INTRODUÇÃO

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que utiliza materiais radioativos com fins diagnóstico, terapêutico ou de pesquisa, denominados radiofármacos. No diagnóstico, o radiofármaco apresenta afinidade por um determinado órgão de interesse para estudar sua fisiologia, metabolismo e/ou anatomia. A detecção da radiação emitida pelo radiofármaco permite diagnosticar precocemente muitas doenças, enquanto que as alterações anatômicas, muitas vezes, não se manifestam senão em estágios relativamente avançados, como no caso de diversos tipos de câncer [1].

Historicamente, pode-se dizer que a medicina nuclear teve seu início após a descoberta da radioatividade natural por Henri Becquerel, em 1896, e dos estudos de elementos naturais radioativos por Marie e Pierre Curie, em 1898. Entretanto, os fundamentos biológicos para a medicina nuclear foram estabelecidos entre 1910 e 1945. Em 1923, Georg de Hevesy foi o primeiro a desenvolver o princípio de traçador e aplicá-lo em um sistema biológico onde usou nitrato de chumbo marcado com o nuclídeo radioativo ^{210}Pb , mostrando sua absorção e seu movimento em plantas [2].

Em outro experimento, uma medida da velocidade sanguínea foi realizada em 1927 por Herrmann L. Blumgart e Soma Weiss, administrando-se uma solução de radônio em um braço e detectando o radionuclídeo no outro braço, utilizando-se uma câmara saturada com vapor de água, denominada de câmara de Wilson [3].

Em 1932, foi construído o primeiro ciclotron por Ernest O. Lawrence e M. Stanley Livingstone, proporcionando a produção de radionuclídeos artificiais, através do bombardeio de núcleos alvos por partículas positivas aceleradas. Mesmo com o grande avanço que foi a criação do ciclotron, a comunidade científica da época sentiu a necessidade de pesquisar a produção de outros radionuclídeos artificiais. Necessidade que até hoje chama a atenção e o interesse de vários pesquisadores em todo o mundo [4].

Em 1937, o elemento de número atômico 43 foi descoberto por Carlos Perrier e Emilio Segre com o uso do ciclotron. Quando o Molibdênio foi irradiado com dêuterons, observou-se uma radioatividade desconhecida e bastante forte. Ao analisar essa radioatividade, concluiu-se que poderia se tratar de um novo elemento. O novo elemento de número atômico 43 foi denominado tecnécio, que hoje é um dos isótopos mais utilizados na medicina nuclear [5].

No período da Segunda Guerra Mundial, a produção de radionuclídeos para uso em medicina cresceu significativamente com o advento dos reatores nucleares, com produção em escala comercial a partir de 1946 [5].

Na década de 50 iniciou-se uma revolução na área de produção de imagens na medicina nuclear. Em 1951, Benedict Cassen inventou o “Scanner Cintilador Retilíneo” que fazia imagens rudimentares da tireoide e outros órgãos. Em 1952, Hal Anger desenvolveu a câmara de cintilação, um sistema mais complexo que o de Cassen e que proporcionava imagens de melhor qualidade [6].

A radiofarmácia tem grande importância em um serviço de Medicina Nuclear. Sem os radiofármacos, os procedimentos de radiodiagnóstico e terapia não poderiam ser realizados pela Medicina Nuclear [7]. Os radiofármacos possuem a propriedade altamente desejável de não alterar as funções orgânicas porque, em geral, não causam efeito farmacológico, apenas agem como traçadores [8].

Os radiofármacos precisam passar por uma série de testes e a produção de fármacos deve atender aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação (BPF), além de atender às especificações farmacopeicas [7,8].

Os estudos da farmacocinética e biodistribuição são importantes para avaliar o comportamento do radiofármaco *in vivo*. Os estudos da biodistribuição e concentração do radiofármaco em órgãos e sistemas são necessários para se obter um exame de qualidade, estudar o comportamento molecular e garantir que as doses absorvidas em órgãos circunvizinhos sejam tão baixas quanto razoavelmente exequíveis. [9][10].

A biodistribuição de radiofármacos pode ser efetuada por método invasivo, envolvendo o sacrifício de animais e medida da radioatividade dos órgãos e tecidos de interesse ou por métodos não invasivos, por meio de imagens cintilográficas [11].

Durante a maior parte do século passado, a pesquisa científica basicamente estava limitada a estudos *in vitro* de processos celulares e exames de processos *in vivo* em modelos animais adequados de doença. Nas últimas três décadas, particularmente na década passada, foram desenvolvidas novas técnicas que permitiram a aquisição de imagens em animais vivos. A monitoração de processos biológicos por método não invasivo contribui substancialmente para o desenvolvimento de novos fármacos [12].

A avaliação da distribuição biológica serve de suporte para o desenvolvimento de novos radiofármacos, especialmente em estudos comparativos, uma vez que reflete as alterações estruturais, introduzidas em uma estrutura molecular básica. Tais alterações estruturais promovidas na molécula de um composto podem ocasionar alterações nas características farmacocinéticas, mais especificamente, na taxa de absorção, no volume de distribuição, na taxa e tipo de metabolismo, na ligação às proteínas plasmáticas e ainda na taxa e tipo de eliminação [13].

Os estudos pré-clínicos pelo método não invasivo podem contar com o auxílio de equipamentos de imagens como, por exemplo, o micro PET/SPECT/CT que combina as técnicas de imagem de tomografia por emissão de pósitron (PET) ou tomografia por emissão de fóton único (SPECT) com a tomografia computadorizada (CT), para o uso em animais de pequeno porte [12]. As imagens cintilográficas demonstram a presença do radiofármaco em um determinado órgão e refletem sua morfologia e função. Por meio da cintilografia é possível delimitar a região de interesse e calcular a porcentagem de dose retida em órgão específico [14,15].

As técnicas de imagem representam importante ferramenta para estudos pré-clínicos realizados na fase de desenvolvimento de novos radiofármacos, reduzindo-se o número de animais de experimentação quando comparado com

métodos invasivos, que demandam o sacrifício de vários animais para cada tempo de biodistribuição estudado [16].

Considerando-se a produção rotineira de radiofármacos de uso consagrado, os ensaios realizados para liberação de lotes incluem, no caso da maioria dos radiofármacos de tecnécio-99m, a realização de ensaio de biodistribuição em animais de experimentação, conforme descritos nas monografias dos radiofármacos publicadas em compêndios oficiais como a Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Europeia, Farmacopeia Americana (USP), Farmacopeia Internacional, entre outros. Na ausência de uma especificação farmacopeica, o produtor do radiofármaco deverá desenvolver e validar metodologia apropriada [8,17].

As farmacopeias recomendam que estudos de controle de qualidade de radiofármacos envolvendo sistemas biológicos sejam realizados por métodos invasivos. O método invasivo possibilita quantificar a distribuição do radiofármaco em órgãos de interesse, normalmente expressa como porcentagem da atividade administrada no órgão ou como uma relação entre as porcentagens da atividade entre diferentes órgãos [17].

Entretanto, o método invasivo pode aumentar o risco de contaminação radioativa do operador e do laboratório além de consumir um tempo considerável, que pode variar dependendo do radiofármaco estudado, modelo animal e habilidade do operador no manuseio dos animais e das fontes radioativas. Estes fatores contribuem para a exposição do trabalhador à radiação.

Por outro lado, a imagem pré-clínica permite uma perspectiva de estudos longitudinais, sendo assim, possui potencial para fornecer medições quantitativas de biodistribuição de radiotraçadores. Além disto, o método de imagem reduz o número de animais necessários por estudo, reduzindo custos e sendo mais ético que os métodos invasivos encontrados na literatura e descrito nas farmacopeias [17,18].

Desta forma, avaliar o potencial de métodos de imagem não invasivos na avaliação quantitativa da biodistribuição de radiofármacos constitui-se em

interesse real para minimizar o sacrifício de animais de experimentação e reduzir o tempo e custo do estudo.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de aplicação do método não invasivo em ensaio de biodistribuição do radiofármaco DMSA marcado com ^{99m}Tc , empregando-se imagens geradas em micro SPECT/CT, como alternativa ao método invasivo empregado na avaliação dos parâmetros quantitativos de biodistribuição de um radiofármaco marcado com ^{99m}Tc , descrito em compêndio oficial (Farmacopeia Americana -USP).

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. *Princípio da medicina nuclear*

O conhecimento dos princípios básicos da física nuclear é fundamental para entender a atuação do radiofármaco no corpo humano e porque através deles é possível tratar algumas patologias e também formar imagens radiológicas para diagnosticar os mais diversos tipos de doenças. O radiofármaco é um medicamento composto por um elemento radioativo denominado de radionuclídeo ou radioisótopo e um material não radioativo chamado de carregador ou ligante [2].

Os radionuclídeos ou radioisótopos apresentam instabilidade nuclear e por isso emitem algum tipo de radiação. Esta instabilidade se dá pelo fato de o átomo ter excesso de partículas ou de energia no núcleo. No caso de excesso de energia, a radiação é emitida em forma de fótons de energia denominado de radiação gama (γ). No caso de excesso de partículas, dependendo do tipo de partícula que está em excesso e da configuração nuclear, o núcleo radioativo poderá emitir partículas beta (β^-), pósitrons (β^+) ou partículas alfa (α). Para uso em diagnóstico em medicina nuclear, utilizam-se radionuclídeos emissores de radiação gama (γ) ou emissores de pósitrons (β^+) pelo fato de o decaimento destes radionuclídeos resultarem em emissão de fótons de radiação eletromagnética que, devido ao comprimento de onda muito curto e frequência muito alta, torna esse tipo de radiação mais penetrante [2].

O carregador ou ligante trata-se de um composto químico que possui um mecanismo de ação e afinidade por um determinado órgão, função fisiológica ou fisiopatológica. A composição química do ligante e o conhecimento prévio do seu comportamento no organismo vivo podem auxiliar na avaliação da biodistribuição do composto. Entretanto, após a combinação do ligante com o radionuclídeo, um novo composto se forma e os estudos de biodistribuição em modelos animais contribuem para conhecer a farmacocinética e a biodistribuição do radiofármaco [19].

Normalmente, os ligantes ou carregadores dirigem o radionuclídeo a um órgão específico ou processo, onde o componente radionuclídico pode ser detectado. Os mecanismos que promovem a ligação do radiofármaco ao sítio alvo podem ser diversos, envolvendo desde uma simples perfusão sanguínea do composto pelos órgãos de interesse, até a ligação a receptores celulares específicos ou participação em uma via metabólica ou processo bioquímico. Esta particularidade dos radiofármacos distingue a técnica diagnóstica da medicina nuclear de outras técnicas como a ressonância magnética ou tomografia convencional que se limitam, na maioria das vezes, a obter imagens da estrutura anatômica, sem uma correlação funcional [19].

A medicina nuclear obtém imagens cintilográficas a partir da administração de radiofármacos no paciente e medindo externamente a radiação emitida pelo organismo do mesmo, ao contrário de outras técnicas radiológicas que medem a absorção da radiação que é emitida externamente por equipamentos radiológicos.

3.2 Radiofármacos

Os radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm radionuclídeos. Compreendem também os componentes não radioativos para marcação e os radionuclídeos, incluindo os componentes extraídos dos geradores de radionuclídeos [20].

Os radiofármacos são substâncias radioativas que possuem propriedades químicas e físicas que auxiliam para o radiodiagnóstico e tratamento de doenças [21].

Em medicina nuclear, cerca de 95% dos radiofármacos são utilizados para fins diagnósticos e apenas 5% para a terapia. Os radiofármacos terapêuticos podem causar danos nos tecidos por radiação. Como eles são administrados em humanos, devem ser submetidos a todos os ensaios de controle de qualidade exigidos para liberação de lotes, de acordo com as monografias publicadas em

compêndios oficiais (farmacopeias). Um radiofármaco pode ser um elemento radioativo, tal como ^{133}Xe , ou um composto marcado, tal como proteínas iodadas com ^{131}I e compostos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [22].

A escolha de um radionuclídeo para o desenvolvimento de um radiofármaco para aplicação em diagnóstico ou terapia em medicina nuclear depende principalmente das suas características físicas, o tipo de emissão nuclear, tempo de meia-vida e energia das partículas e/ou radiação eletromagnética emitida [22].

A energia do fóton gama emitido pelo radionuclídeo que entra na composição do radiofármaco para diagnóstico deve situar-se entre os 80-300 keV. Isto porque os raios gama com energia inferior a 80 keV são absorvidos pelos tecidos e não são detectados exteriormente. Por outro lado, quando a sua energia é superior a 300 keV a eficiência dos detectores dos equipamentos de aquisição de imagens cintilográficas é baixa, resultando em imagens de qualidade baixa [22].

O tempo de meia-vida física do radionuclídeo ($T_{1/2}$) deve ser compatível com a preparação do radiofármaco, administração ao paciente e realização da imagem [22].

Os radiofármacos utilizados em terapias empregam radionuclídeos que emitem partículas ionizantes (partículas α (alfa), β (beta) ou elétrons Auger) e sua aplicação é indicada para tratamento de tumores. A escolha do radionuclídeo, levando em consideração o tipo de partícula que ele emite, dependerá do tamanho do tumor, da distribuição intratumoral e farmacocinética do radiofármaco e da afinidade com o órgão alvo [23].

A emissão de partículas de alguns radionuclídeos pode vir acompanhada de emissões de fótons de radiação gama, entretanto, isso não contribui em nada para a eficácia da terapia e, pelo contrário, vai aumentar a dose de radiação para os tecidos saudáveis. Porém, sempre que a energia dos raios gama for adequada para a aquisição de imagens, pode-se constituir em vantagem, pois permite visualizar a distribuição *in vivo* do radiofármaco que está sendo utilizado na terapia [23].

3.3 Características do ^{99m}Tc

O tecnécio-99m (^{99m}Tc), é o elemento radioativo mais utilizado na medicina nuclear, devido suas propriedades químicas e nucleares. A disponibilidade de obtenção simples e segura por meio de gerador de radionuclídeo, numa forma pura e a sua afinidade por vários compostos químicos, comercializados na forma de reagentes liofilizados para pronta marcação, são fatores que contribuíram para a utilização do ^{99m}Tc como traçador [8].

O ^{99m}Tc é um emissor gama obtido no decaimento do molibdênio-99; este é um produto da fissão do urânio-235 em reatores nucleares: [8]

O molibdênio-99 é separado quimicamente dos outros produtos de fissão e decai em tecnécio metaestável [8,24].

O molibdênio-99 também pode ser obtido a partir da irradiação de molibdênio-98 com nêutrons térmicos no reator nuclear.

O $^{99}_{42}\text{Mo}$ tem meia vida de 66 horas e o gerador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc pode ser transportado desde o produtor até o hospital ou a clínica. No local da utilização, é feita a eluição do gerador para retirar o tecnécio metaestável ($^{99m}_{43}\text{Tc}$) que emite raios gama com 140 keV e decai com meia-vida física de 6 horas para o estado fundamental do tecnécio-99 [8,25]

Como a meia-vida do molibdênio-99 é 10 vezes maior que a do tecnécio-99m, esse pode ser estocado, sendo a extração química feita no momento da utilização. Assim, mesmo tendo meia-vida de apenas 6 horas, o ^{99m}Tc estará disponível para uso até cerca de seis horas após a eluição do gerador.

O tecnécio-99 possui meia-vida física de 211×10^3 anos e decai a rutênio-99 com emissão β^- ; a meia-vida dessa emissão é bastante longa, e, portanto, a atividade (emissões por unidade de tempo) é muito baixa, comparada a do isótopo metaestável [25].

Com relação a outros radionuclídeos gama emissores, o ^{99m}Tc apresenta a vantagem de ter o tempo de meia-vida curto, ausência de radiação corpuscular ou de alta energia, o que minimiza a dose de radiação absorvida pelo paciente [21].

3.4 Métodos de imagem usados na Medicina Nuclear

A imagem obtida na medicina nuclear chamada de cintilografia é formada a partir da radiação emitida pelo paciente ao ser administrado um dado radiofármaco. Essa radiação é captada por um detector e os dados são enviados para um computador onde é formada a imagem [26].

A maioria dos detectores de radiação usados em medicina nuclear são operados em um “modo de pulso”, ou seja, eles geram pulsos de carga elétrica ou corrente que são contados para determinar o número de eventos de radiação detectados. Além disso, a análise da amplitude de pulsos é possível através da sensibilidade energética dos detectores tais como, detectores de cintilação, detectores semicondutores e contadores proporcionais, para determinar a energia de cada evento de radiação detectado. A seleção de uma faixa de

energia estreita para contagem permite a discriminação contra eventos diferentes daqueles da energia de interesse, tais como radiação dispersa e radiação de fundo ou as múltiplas emissões de uma mistura de radionuclídeos [26].

A cintilografia, incluindo cintilografia plana, tomografia computadorizada de emissão de fóton único (*Single Photon Emission Computer Tomography* - SPECT) e tomografia por emissão de pósitrons (*Positron Emission Tomography* - PET), relata o princípio traçador, no qual uma pequena quantidade de um radiofármaco é introduzida no corpo para monitorar a função fisiológica do paciente [26].

Clinicamente, as imagens obtidas por meio dos radiofármacos são interpretadas visualmente para avaliar a função fisiológica de tecidos, órgãos e sistemas de órgãos, ou podem ser avaliadas quantitativamente para medir processos bioquímicos e fisiológicos importantes em pesquisas e aplicações clínicas. A medicina nuclear baseia-se em medições não invasivas realizadas com fontes de radiação internas e detectores, de uma forma que não permita que a medição de radionuclídeos seja isolada dos tecidos circundantes ou interferência da captação de radionuclídeos em regiões não alvo [27].

3.4.1 Imagens de projeção planar

As imagens de projeção planar são imagens reconstruídas em um único plano, possuindo apenas duas dimensões, altura e largura. É o tipo mais comum de imagem diagnóstica. Um bom exemplo de imagem planar é a radiografia. Assim como na radiologia convencional, a medicina nuclear também produz imagens planares. Para isso, a gama-câmara adquire a imagem em apenas um plano ou angulação única (Figura 1) [28].

As imagens em projeções planares são usadas rotineiramente pois oferecem a vantagem de aquisições rápidas em uma grande área a um custo relativamente baixo.

Figura 1 - Cintilografia renal planar com DMSA-TEC marcado com ^{99m}Tc de uma cobaia usada no estudo.

3.4.2 Câmera de cintilação Anger

Praticamente todas as câmeras de cintilação comerciais usadas para a geração de imagens de radiofármacos que emitem radiação gama baseiam-se no projeto original proposto por Anger na década de 50, que é considerado o trabalho de engenharia que alavancou as pesquisas de novos sistemas de imagens em medicina nuclear. Por este motivo, a câmera de cintilação, muitas vezes é chamada de “câmera Anger” ou “gama-câmera” [6].

A figura 2 ilustra os princípios e componentes básicos da câmera de cintilação Anger, que incorpora um grande cristal de cintilação de iodeto de sódio dopado com tálio (NaI (Tl)) que absorvem cerca de 90% da radiação gama incidente, principalmente pelo efeito fotoelétrico, e produzem um flash de luz

(com cerca de 5000 fótons/raios gama de cintilação, que incide sobre um conjunto de células fotoelétricas ou fotodiodos que detecta estes fótons, equipado com um colimador de orifício paralelo que limita o ângulo de aceitação e define a distribuição espacial da radiação gama vista pelo cristal cintilador. Por trás do cristal, um guia de luz é acoplado opticamente a uma série de tubos fotomultiplicadores (PMT's) sensíveis à luz, que convertem proporcionalmente a distribuição da luz de cintilação em sinais eletrônicos. As imagens obtidas por esse processo representam o acúmulo de eventos individuais registrados durante um estudo. Dependendo do tamanho da câmera de cintilação, órgãos inteiros como cérebro, coração e fígado podem ser visualizados [29].

Figura 2 - Descrição esquemática dos princípios e componentes básicos de uma câmera de cintilação Anger.

Fonte: Huguet, Y.Y.E., 2014

3.4.3 Colimadores

Para obter uma imagem com uma câmera de cintilação é necessário projetar raios gama da distribuição da fonte para o detector da câmera. Raios

gama não podem ser focados; assim, um princípio de “lente” semelhante ao usado na fotografia não pode ser aplicado. Portanto, os sistemas de imagens de raios gama mais práticos utilizam o princípio da colimação absorvente para a formação das imagens [29].

O colimador é a primeira parte da gama-câmara potencialmente encontrado pelo fóton ao sair do paciente. O objetivo do colimador é definir o campo de visão geométrico do cristal e a direção específica de entrada dos fótons para incidir no cristal. O colimador discrimina os fótons indesejados com base apenas na direção. O colimador não distingue fótons primários de difundidos ou mesmo de energias diferentes. O analisador de altura de pulso é que discrimina os fótons que chegam, isto é, os primários, os Compton-difundidos ou outros não desejáveis. O colimador é uma peça constituída de septos de chumbo e furos que permitem a passagem da radiação de um lado a outro de sua estrutura [2].

Um colimador de absorção projeta uma imagem da distribuição da fonte no detector, permitindo que apenas os raios gama que viajam ao longo do ângulo de aceitação cheguem ao detector. Os raios gama que não viajam na direção correta são absorvidos pelo colimador antes de chegarem ao detector. Basicamente, são usados quatro tipos de colimadores para a câmera de cintilação: *pinhole*, *parallel-hole*, *diverging*, and *converging* [30].

3.4.4 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (Single-Photon Emission Computed Tomography - SPECT)

Os sistemas SPECT mais comuns consistem em uma típica câmera de cintilação com um ou três cabeçotes de detecção NaI(Tl) montados em um *gantry*, um computador on-line para aquisição e processamento de dados e um sistema de exibição. A cabeça do detector gira em torno do paciente com pequenos incrementos de ângulos (3° - 10°) para os ângulos de 180° ou 360° . Os dados são armazenados em uma matriz 64×64 ou 128×128 no computador para posterior reconstrução dos planos de interesse [30].

Na coleta destes dados, podem ser adquiridas imagens nos planos sagital, axial e coronal. Um único cabeçote de gama-câmara, montada em um *gantry* giratório, é o suficiente para adquirir imagens tomográficas. A câmera de cintilação adquire imagens bidimensionais (2D) em intervalos de ângulos igualmente espaçados ao redor do paciente (Figura 3) [30].

Figura 3 - Simulação do sistema SPECT com trajeto circular em vários ângulos ao redor do paciente.

Fonte: SAHA, G.B, 2004.

Os dados coletados de projeções estáticas são necessários para reconstruir imagens no plano transversal. Um conjunto de múltiplos cortes de secção axial são produzidos para formar diversas imagens em diferentes regiões que estão cobertas pelo campo de visão (*Field Of View* - FOV) do detector da gama-câmara resultando em um conjunto de imagens bidimensionais contínuas que formam um volume de imagem tridimensional (3D) [22].

Com essa metodologia é possível melhorar tanto a qualidade da imagem como o potencial para a quantificação da distribuição de radioatividade *in vivo*.

O SPECT tornou-se uma importante ferramenta para a localização *in vivo* de radiofármacos em medicina nuclear e agora é utilizado rotineiramente com radiofármacos comercialmente disponíveis para responder questões clínicas importantes, incluindo as de cardiologia, neurologia, psiquiatria e oncologia, juntamente com os novos radiofármacos existentes [29].

3.4.5 Tomografia por Emissão de Pósitrons (*Positron Emission Tomography* - PET)

Os tomógrafos PET são projetadas para detectar fótons de 511 keV emitidos em ângulos opostos de 180° que são gerados a partir do evento de aniquilação de um pósitron e um elétron. Após a emissão do pósitron pelo núcleo, este viaja uma curta distância antes de coincidir com um elétron na matéria circundante. Dois fótons são detectados por detectores em coincidência, e os dados coletados por uma unidade de processamento de coincidência em vários ângulos ao redor do eixo do corpo do paciente, são usados para reconstruir a imagem da distribuição da atividade na fatia de interesse por um sistema de computador (Figura 4). Essa contagem de coincidências evita a necessidade de um colimador para definir o campo de visão (FOV) [30].

Figura 4 - Ilustração do esquema de aquisição de imagens em sistema PET.

Fonte: Ley, J. A., Estrada, G.S., 2013.

Os detectores são feitos principalmente de germanato de bismuto (BGO), iodeto de sódio dopado com Tálcio NaI (TI), oxitortosilicato de lutécio (LSO), oxitortosilicato de gadolínio (GSO) ou fluoreto de bário (BaF_2), dos quais o BGO são mais comumente usados [30].

Os sistemas PET utilizam vários detectores distribuídos em dois ou mais anéis circulares, hexagonais ou octogonais ao redor do paciente. Cada detector é conectado a um detector oposto em um circuito de coincidência. Assim, todas as contagens coincidentes de diferentes fatias em ângulos de 360° ao redor do paciente são adquiridas simultaneamente em uma matriz 64×64 , 128×128 ou superior em um computador. Os dados são então processados para reconstruir as imagens que representam a distribuição da atividade em cada fatia [22,30].

3.4.6 Imagens Híbridas

Atualmente, os métodos de imagem mais usados na medicina nuclear são os métodos SPECT e PET. Tanto o SPECT quanto o PET fornecem informações funcionais, usando radiofármacos projetados para medir parâmetros fisiológicos ou metabólicos, ou que se ligam ou interagem com alvos moleculares específicos na superfície celular ou dentro das células. Embora para alguns radiofármacos a anatomia regional seja óbvia (por exemplo, estudos de perfusão cardíaca), há muitos casos em que o estudo de medicina nuclear não fornece muito em termos de informações anatômicas. Mesmo nos casos em que há alguma informação anatômica, a resolução espacial da imagem é baixa em comparação com técnicas como Tomografia Computadorizada (*Computer Tomography* - CT) e Imagem por Ressonância Magnética (*Magnetic Resonance Image* - MRI), que podem fornecer imagens do corpo humano com uma resolução de 1 mm ou melhor [31].

Um sistema de imagens híbridas realiza a junção da informação de duas ou mais modalidades de imagem e fornece uma imagem com poder de interpretação melhor tanto do ponto de vista anatômico, quanto fisiológico e metabólico [2].

3.5 Albira: Micro PET/SPECT/CT

O equipamento Albira Micro PET/SPECT/CT desenvolvido e fabricado pela empresa Brunker combina as técnicas de imagem PET, SPECT e CT para o uso em animais de pequeno porte, para uma grande variedade de campos de aplicação em pesquisa pré-clínica. O projeto de uso modular permite a escolha de uma ou a combinação dessas modalidades [32].

Os subsistemas PET e SPECT são feitos de várias câmeras, cada uma com um cristal de cintilação e um fotomultiplicador sensível à posição (Position Sensitive Photomultiplier - PSPMT), que converte a luz emitida pelo cristal em pulsos de sinal. O CT é basicamente formado por uma fonte emissora de raios-

X e um detector bidimensional. Esses três dispositivos são montados em uma estrutura de alumínio e cobertos por uma carapaça blindada contra radiação para proteger o operador da exposição das fontes radioativas [32].

O equipamento Albira Micro PET/SPECT/CT, ilustrado na figura 5, possui quatro unidades:

- A) Unidade de preparação do animal: É onde está localizada a zona de acesso à maca, contém um sistema de movimento de translação, permitindo fácil acesso ao animal para realizar procedimentos de rotina, isto é, fornece anestesia ou uma injeção local do radiofármaco.
- B) Unidade do PET, SPECT e CT: Esta unidade contém os detectores e circuitos de formação de imagem e sua carapaça é blindada contra radiação gama e Raios-X.
- C) Unidade de sensores: A unidade contém os subsistemas de sensores e os componentes eletrônicos associados.
- D) Unidade de Controle: A unidade é constituída por dois computadores externos, onde um é utilizado pelo sistema de aquisição, controle da fonte de raios-X e os demais dispositivos do sistema e processamento dos dados. E o outro, para armazenamento dos dados produzidos.

A figura 5 ilustra um sistema de aquisição de imagens semelhante ao que é usado pelo IPEN [09,14].

Figura 5 - Equipamento de imagem Albira e suas 4 unidades, A (Unidade de Preparação Animal), B (Unidade do PET, SPECT e CT), C (Unidade de sensores eletrônicos) e D (Unidade de controle).

3.6 Quantificação de imagens SPECT pelo micro PET/SPECT/CT

O SPECT é baseado no princípio do traçador e na detecção externa de fontes de radiação internas. É capaz de medir a biodistribuição de concentrações mínimas ($<10^{-10}$ molares) de biomoléculas radiomarcadas *in vivo*, com resolução sub-milimétrica e quantificar os processos cinéticos moleculares dos quais participam. Como algumas outras técnicas de imagem, o SPECT foi desenvolvido originalmente para uso em seres humanos e foi posteriormente adaptado para a criação de imagens de pequenos animais de laboratório com alta resolução espacial para pesquisas básicas e translacionais. Suas capacidades exclusivas incluem (i) a capacidade de capturar imagens de ligantes endógenos, como peptídeos e anticorpos, devido à relativa facilidade de marcar essas moléculas com radionuclídeos emissores gama como o tecnécio ou iodo, (ii) a capacidade de medir processos cinéticos relativamente lentos (em comparação com a tomografia por emissão de pósitrons (PET), por exemplo) devido à meia-vida longa dos isótopos comumente usados e (iii) a capacidade

de sondar duas ou mais vias moleculares simultaneamente, detectando isótopos com diferentes energias de emissão [32].

A quantificação pode expandir as capacidades do SPECT e desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de medicamentos, na dosimetria de órgãos e na avaliação da resposta à terapia. O termo "quantificação" pode realmente ter um de vários significados, incluindo (i) semi-quantificação, onde as medidas relativas são comparadas com regiões livres de doença, (ii) quantificação fisiológica, como perfusão ou taxa metabólica de glicose, e (iii) quantificação absoluta, medida verdadeira da concentração de atividade em um volume de interesse [32].

Da mesma forma que é feito em serviços de medicina nuclear, o procedimento de quantificação de imagens no micro PET/SPECT/CT envolve os seguintes procedimentos:

- A. Detectar e localizar um órgão ou lesão;
- B. Determinar suas dimensões;
- C. Avaliar sua concentração relativa de atividade.

A avaliação das atividades relativas apresenta sérios inconvenientes devido aos fenômenos de atenuação de fótons, radiação dispersa e radiação de fundo. Esses efeitos produzem na imagem contraste reduzido, imprecisão na determinação da borda de órgãos ou lesões e aparecimento de regiões ativas falsas [33].

A qualidade das imagens está relacionada a fatores que podem ser agrupados de acordo com suas características: [34]

- **Físicos:** aqueles relacionados à estatística da radiação, atenuação, radiação dispersa e energia de radionuclídeo.
- **Técnicos:** estão relacionados à resolução espacial, temporal e energética do sistema, bem como ao ruído estatístico e ao efeito do volume parcial.
- **Fisiológicos:** devidos ao movimento do paciente ou amostra, voluntário ou involuntário.

A precisão quantitativa do SPECT é limitada pela atenuação do fóton e pelo efeito de dispersão quando os fótons interagem com os átomos [34].

3.6.1 Reconstrução de Imagens

As imagens provenientes da radiação emitida de radionuclídeos são obtidas em projeções bidimensionais (2D) de distribuições de fontes de radiação tridimensionais (3D). Imagens de estruturas de certa profundidade do paciente são obscurecidas por imagens de sobreposição de estruturas subjacentes. Uma solução é obter imagens de projeção de diferentes ângulos ao redor do corpo (por exemplo, vistas posteriores, anteriores, laterais e oblíquas). A pessoa que interpreta as imagens deve separar mentalmente as estruturas das diferentes visões para decidir a verdadeira natureza 3D da distribuição. Essa abordagem é apenas parcialmente bem-sucedida; é difícil aplicar as distribuições complexas com muitas estruturas sobrepostas. Além disso, órgãos profundos podem ter estruturas sobrepostas de todos os ângulos de projeções [24].

Uma abordagem alternativa é a tomografia. Imagens tomográficas são representações 2D de estruturas situadas dentro de um plano selecionado em um objeto 3D. As técnicas modernas de CT, PET, SPECT e tomografia por raios X, usam sistemas de detectores posicionados ou rotacionados em torno do objeto, de modo que diversas vistas angulares diferentes (também conhecidas como projeções) do objeto são obtidas. Algoritmos matemáticos são então usados para reconstruir imagens de planos selecionados dentro do objeto a partir desses dados de projeção [35].

O modelo matemático de reconstrução subjacente à tomografia foi publicado pela primeira vez por Johann Radon em 1917, mas não foi usado até as décadas de 1950 e 1960 onde teve sua aplicação prática em trabalhos de química e radioastronomia. O desenvolvimento da tomografia por raios X no início dos anos 70 iniciou a aplicação desses princípios para a reconstrução de imagens médicas. A reconstrução de imagens a partir de múltiplas projeções das emissões detectadas pelos radionuclídeos no corpo é conhecida como

tomografia computadorizada de emissão (*Emission Computed Tomography* - ECT) [2].

A tomografia por emissão consiste em detectar eventos ocorridos dentro de um objeto de estudo, ou seja, a radiação emitida pelo órgão do paciente ao ser administrado o radiofármaco, que tem afinidade pelo órgão a ser estudado, é detectada por um sistema de detectores externos [35].

Em 1977, foram propostos os métodos iterativos por Lalush e sua equipe, afim de solucionar problemas estatísticos envolvendo dados incompletos. O princípio básico de funcionamento dos algoritmos iterativos é minimizar, por meio de estimativas sucessivas, a diferença entre as projeções medidas e estimadas pelo algoritmo. Os algoritmos iterativos existentes se diferem, principalmente, na forma com que as projeções medidas e estimadas são comparadas, além do tipo de correções aplicadas à estimativa corrente. Tal processo pode ser iniciado por meio da criação de uma estimativa inicial com valor 0 ou 1, dependendo se a correção é realizada por meio de adição ou multiplicação, respectivamente [36].

Um dos algoritmos iterativos mais frequentemente utilizados é o *Maximum-Likelihood Expectation Maximization* (MLEM). Apesar do algoritmo MLEM ser estável para sinogramas com baixa densidade de contagens e robusto em artefatos, o ruído aumenta proporcionalmente ao número de iterações [36,37].

Devido à demora na reconstrução das imagens pelo algoritmo matemático MLEM, em 1994 foi proposto por Hudson e Larkin o método de reconstrução denominado *Ordered-Subsets Expectation Maximization* (OSEM) cujo objetivo principal é acelerar a convergência da reconstrução iterativa e diminuir o tempo de reconstrução pelo computador, através de processamento parcial de blocos de informação por cada iteração [37].

3.6.2 OSEM

O micro PET/SPECT/CT usado neste trabalho usa o algoritmo matemático OSEM. Nesse algoritmo os dados das projeções são agrupados em

subconjuntos e o número de subconjuntos é denominado de nível. Para cada subconjunto é aplicada uma projeção seguida de uma retroprojeção. Além disso, a imagem reconstruída de um determinado subconjunto servirá de imagem inicial para o processo do próximo subconjunto [36].

Para tomógrafos do tipo SPECT, a coleta dos dados é feita através de projeções em uma câmera numa determinada posição. Quando a câmera gira em torno do objeto em estudo temos uma nova projeção, ou seja, outro conjunto de dados. Assim, a modalidade SPECT tem naturalmente uma estrutura que viabiliza o uso do OSEM para a reconstrução de uma imagem tomográfica. No caso da modalidade de imagem PET, que coleta todos os dados simultaneamente, o OSEM pode ser mais bem aplicado ao fim de sua execução. Porém, isso não afeta a vantagem computacional de reduzir iterações do OSEM, pois o SPECT só é mais rápido porque calcula a reconstrução simultaneamente com a aquisição dos dados [35].

Resumindo, o princípio básico do OSEM consiste em dividir o conjunto total de projeções em subconjuntos menores. Cada subconjunto tem o mesmo número de projeções. Além disso, o número de subconjuntos que podem ser criados é múltiplo do número total de projeções. Por exemplo, se durante um estudo são adquiridas 64 projeções de um objeto (que representam 64 ângulos diferentes), elas podem ser divididas em subconjuntos, cada um contendo oito imagens. As 64 projeções podem, ainda, ser divididas em 16 subconjuntos, sendo que cada um conteria quatro imagens neste caso. Após a distribuição das projeções em subconjuntos, o algoritmo MLEM é aplicado a cada subconjunto de projeções, sendo uma fração da iteração. Quando todos os subconjuntos forem processados, tem-se uma iteração completa. O uso do método OSEM permite acelerar significativamente a reconstrução das imagens. No caso de se utilizar 16 subconjuntos, por exemplo, o processo de convergência da imagem seria acelerado por um fator de 16 se comparado com o MLEM, reduzindo consideravelmente o tempo computacional necessário para a reconstrução [36].

3.7 Fenômenos que interferem na quantificação da imagem

Vários sistemas de pesquisas pré-clínicas foram desenvolvidos nas últimas décadas e existem algumas publicações sobre a quantificação de imagens pré-clínicas pelo método SPECT. Vanhove e sua equipe (2019) propuseram um estudo que demonstra a viabilidade da quantificação em sistemas SPECT ao usar a correção de Atenuação de Fótons e correção de Atenuação Dispersa [33,38]. Em outro trabalho, Wu e colaboradores (2010) desenvolveram um método prático para atenuação de fótons independente da reconstrução iterativa [39].

O estudo de Vandeghinste e colaboradores (2014) demonstrou a viabilidade da quantificação absoluta *in vivo* alcançando um limite de erro inferior a 5%. Em seu estudo, a reconstrução da imagem incluiu correção de radiação dispersa e correção de atenuação de fótons baseada em CT na reconstrução de imagem. A correção de atenuação baseada em CT forneceu um mapa de atenuação mais preciso, mas com o custo de precisar de hardware adicional [40].

De acordo com alguns estudos, existem fatores de degradação física que podem ser compensados para melhorar a precisão quantitativa, tais como, atenuação de fótons e radiação dispersa, Efeito de Volume Parcial e imperfeições do sistema. Por exemplo, a atenuação dos fótons pode reduzir a concentração da atividade média em um volume de interesse em 25%. A radiação dispersa também pode diminuir a precisão quantitativa, entretanto, o erro é insignificante em objetos com o tamanho de pequenos animais [24].

Segundo Vanhouve e colaboradores (2009), a maioria dos estudos com animais é realizada sem correções para esses efeitos físicos. Mesmo na PET para pequenos animais, que é quantitativa em um ambiente clínico, muitos estudos ainda são realizados sem correção de atenuação. Embora a atenuação e a dispersão de fótons tenham um impacto menor nas imagens de pequenos animais, a magnitude desses efeitos físicos não é desprezível. Além disso, vários aspectos da imagem em pequenos animais fornecem boas razões para uma investigação detalhada da atenuação e dispersão [38].

Uma abordagem é medir o sistema resposta em uma grade de locais discretos no campo de visão (FOV). Essas medidas combinam resposta geométrica com efeitos mais complexos, como a variabilidade do detector e imperfeições do colimador. Embora fácil de medir em sistemas completamente estacionários, isso é mais difícil em sistemas rotativos devido a movimentos mecânicos imperfeitos. Uma abordagem diferente é incorporar diretamente os processos físicos que levam a esses efeitos (por exemplo, resposta do detector, diâmetro, sensibilidade limitados) na reconstrução da imagem [40].

3.7.1 Background

Para a quantificação de imagens, o background devido à atividade presente no ambiente pode interferir significativamente nos resultados da medida da quantificação. Um laboratório para estudos de biodistribuição é classificado como área controlada e possível de contaminação radioativa [41,42,43].

3.7.2 Atenuação de Fótons

É um parâmetro crítico que afeta a precisão dos dados adquiridos. Depende da energia do fóton, do material que circunda a área de interesse e da geometria que deve passar para ser detectada. A atenuação dos fótons gera defeitos nas imagens que podem levar a erros de diagnóstico, a causa desses defeitos é que, se a fonte está localizada superficialmente no corpo, uma alta densidade de fótons atinge o detector, enquanto que se estiver localizada internamente, menos fótons atingem o detector devido à absorção que sofrem quando passam pelos diferentes tipos de tecidos [34].

Embora a atenuação e a dispersão de fótons tenham um impacto menor na geração de imagens em pequenos animais, a magnitude desses efeitos

físicos não é desprezível [24, 40]. Uma forma de reduzir o efeito de atenuação de fótons é aplicando filtros gaussianos no pós-processamento da imagem [38].

Um filtro gaussiano é utilizado para borrar ou desfocar a imagem na qual ele é aplicado com o objetivo de reduzir os ruídos presentes na imagem. O resultado desta operação é a suavização da imagem, lembrando a visualização da mesma através de uma tela translúcida ou como se tivesse sendo vista através de uma lente fora de foco. A suavização gaussiana é largamente utilizada no estágio de pré-processamento da imagem a fim de enaltecer a estrutura da imagem em diferentes escalas [44].

3.7.3 Radiação Dispersa

É chamada de radiação dispersa a interação da radiação produzida pelo efeito Compton no interior do paciente. No efeito Compton, o fóton é espalhado por um elétron de baixa energia de ligação, que recebe somente parte de sua energia, continuando sua sobrevivência dentro do material em outra direção e com menor energia. Como a transferência de energia depende da direção do elétron emergente e esta é aleatória, de um fóton de energia fixa podem resultar elétrons com energia variável, com valores de zero até um valor máximo [45].

Os fótons dispersos causam uma diminuição no contraste à medida que se dissipam nas regiões não brancas, diminuindo a nitidez nas bordas das regiões de interesse. Alguns dos fótons dispersos de baixa energia são absorvidos pelo colimador que é colocado no sistema SPECT antes de atingir o detector. Outros fótons são discriminados pela janela de energia, que define a faixa de energia que os fótons devem ter para serem coletados pelo sistema [34].

3.7.4 Efeito de Volume Parcial (PVE)

A precisão da SPECT para medir concentrações de radioatividade num determinado órgão de interesse é dificultada pela baixa capacidade de resolução do próprio sistema de imagem. É possível quantificar com precisão e exatidão uma imagem de uma fonte com uma concentração de atividade desde que esta possua dimensões iguais ou superiores ao dobro do tamanho da resolução espacial do sistema em termos da sua largura total à meia altura (FWHM, do inglês, *full-width at half maximum*). Embora as contagens totais da fonte de pequenas dimensões sejam preservadas na imagem, o que acontece, na realidade, é que estão “espalhadas” por um volume superior ao volume real da fonte, não refletindo a concentração real de atividade, mas apenas a quantidade. Este fenômeno é designado por efeito de volume parcial (PVE, do inglês, *Partial Volume Effect*) [46].

O PVE pode ser definido como a perda de informação que ocorre quando um objeto ocupa parcialmente um volume definido pela resolução da instrumentação utilizada [46].

Além da limitação da resolução espacial intrínseca dos sistemas SPECT, que normalmente é de 3-5 mm para o ^{99m}Tc , a resolução espacial da imagem é também altamente dependente do desenho e da geometria do colimador. Para um colimador de buracos paralelos e uma fonte de ^{99m}Tc a uma distância típica do colimador, a resolução da imagem geralmente varia entre 7-15 mm FWHM (*Full-Width at Half Maximum*) [46].

Os métodos de correção do PVE podem ser divididos em dois grupos: aqueles que necessitam de informação adicional das estruturas da imagem de outra modalidade, como por exemplo, CT ou RMN, e aqueles que funcionam unicamente com as imagens de emissão através da determinação dos coeficientes de recuperação (RC, do inglês, *Recovery Coefficient*) [45,46]. O RC tem o objetivo de corrigir os valores de captação do radiofármaco que são influenciados por fatores como PVE [48].

Como descrito por Sá (2010) a determinação do coeficiente de recuperação ou fator é realizado usando-se um simulador com forma e dimensões conhecidas, contendo estruturas de interesse onde são inseridas atividades pré-determinadas, processando-se a quantificação. A avaliação dos valores reais de atividade inseridos no simulador pelos valores obtidos na imagem final leva a determinação dos coeficientes. O cálculo do RC é simplificado na equação 1 [47].

$$RC = \frac{AC_c - C_{BG}}{Ac_c - AC_{C_{BG}}} \quad (1)$$

Onde:

RC= Coeficiente de Recuperação

AC_c = Atividade medida no simulador

C_{BG} = Atividade medida no BG

Ac_c = Atividade conhecida na estrutura

AC_{C_{BG}} = Atividade conhecida no BG

3.7.5 Determinação do Fator de Calibração

O fator de calibração pode ser definido como a razão entre a concentração da atividade e o valor do voxel nas imagens reconstruídas do SPECT [39]. O valor de cada voxel das imagens SPECT reconstruídas, e com as devidas correções, não é dado em concentração de atividade por volume (MBq/mL) como seria desejável.

Contudo, deve ser proporcional ao número de decaimentos que ocorre em cada voxel durante a aquisição das imagens. Torna-se necessário determinar um fator de calibração que efetue a conversão, com o menor erro possível, do

valor do voxel no SPECT na concentração de atividade equivalente. A determinação deste fator é extremamente importante no processo de quantificação absoluta uma vez que relaciona o número de contagens detectadas nas imagens com o valor de concentração da atividade [46].

O FC corresponde ao valor da sensibilidade da gama-câmara e é determinado experimentalmente através de medidas de concentração de atividade conhecida, do radioisótopo em estudo, previamente medida em um calibrador de doses devidamente calibrado (equação 2).

$$\mathbf{FC} = \frac{NC}{(Ax\Delta t)} \quad (2)$$

Onde:

FC= Sensibilidade ou Fator de Calibração

NC= Número de contagens obtidas no volume de interesse

A = Atividade da amostra mediada em um calibrador

Δt = Tempo de aquisição de imagem.

A medição pode ser feita de duas maneiras, a mais simples consiste na aquisição planar de uma fonte pontual ou através de uma fonte numa placa de Petri de forma a determinar a sensibilidade da gama-câmara. Tal calibração, embora seja fácil de implementar, é aconselhável apenas se os dados do SPECT são reconstruídos com alta precisão, incluindo a correção para a dispersão e a atenuação. O outro método de medição é a aquisição tomográfica de uma fonte com geometria mais próxima em termos dos fenômenos de atenuação e dispersão de um paciente, como por exemplo um objeto simulador cilíndrico com uma atividade uniforme [46].

Segundo Frey e colaboradores (2012), o uso de calibração com objeto simulador, com medidas de sensibilidade mais frequentes, é provavelmente a melhor abordagem. Nota-se que o grau no qual as imagens SPECT deste objeto simulador são uniformes é uma medida indireta da eficácia da compensação dos efeitos de degradação da imagem. Além disso, a determinação dos fatores de

calibração baseados em objeto simulador não é um substituto para a correção de dispersão e de atenuação; sem estes, o fator de calibração irá depender do tamanho do paciente e será espacialmente variável, sendo esta uma das dificuldades do processo de quantificação caso o sistema não esteja bem corrigido e calibrado há uma mudança do fator de calibração ao longo do tempo [34].

Sendo assim, a atividade em um determinado VOI (*Volume Of Interest*), será igual à soma dos valores dos voxels, ou seja, à soma das contagens detectadas no VOI dividida pelo fator de calibração (FC) do detector em função do tempo de aquisição da imagem (equação 3).

Nas contagens detectadas pelo sistema deve-se efetuar a correção de decaimento da fonte [46].

$$\mathbf{A} = \frac{\Sigma_{(Nc)}}{(FC \times \Delta t)} \quad (3)$$

Onde:

A = Atividade

Nc = Número de contagens obtidas no volume de interesse

FC = Fator de Calibração ou Sensibilidade

Δt = Tempo de aquisição de imagem.

4 MATERIAIS

4.1 Infraestrutura

Este trabalho foi realizado nos laboratórios das dependências do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-USP), em especial os laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia, no Laboratório de Dosimetria Termoluminescente (LDT), no laboratório de Cultivo Celular e no Biotério do Centro de Biotecnologia (CB). Houve colaboração do Laboratório de Imagens Pré-Clínicas (LIP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Esses laboratórios forneceram toda a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, células e animais e aquisição de imagens, respectivamente.

4.2 Reagentes e soluções

- Acetona ultrapura (Merck, Alemanha).
- Cloreto de sódio (Merck, Alemanha).
- Ketamina (Vetbrands, Brasil).
- Xilazina (Syntec, Brasil).
- Reagente liofilizado para marcação com tecnécio-99m: DMSA-TEC; IPEN, Brasil.
- Eluato do gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – GERADOR IPEN-TEC; IPEN, Brasil.

4.3 Equipamentos e materiais

Os principais equipamentos e materiais usados neste trabalho foram os seguintes:

- Ativímetro CRMTM - 35R (Capintec, EUA);

- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) - D5002 cobra II (Packard - Canberra, EUA);
- Equipamento para tomografia (microPET/SPECT/CT) com o software próprio Pmod (MicroPET Albira, Bruker BioSpin Corp, Alemanha) do Laboratório de imagens pré-clínicas-UNICAMP;
- Contador Geiger Mueller RadEye G©;
- Leitoras de dosímetros de CaSO₄:Dy; (Harshaw 5500).
- Dosímetro TLD tipo (CaSO₄:Dy).
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas;
- Papel cromatográfico Whatman nº 3 MM (Whatman, Reino Unido);
- Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- Suporte cromatográfico de sílica gel 60 em placa de alumina (TLC-SG) (Merck, Alemanha);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, balões volumétricos e provetas, cubas cromatográficas.

4.4 Animais

Todos os experimentos deste trabalho foram realizados seguindo as normas e as condutas ditadas pela SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório). Desta forma, os estudos *in vivo* foram primeiramente submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN, para avaliação e aprovação, cujo o número da aprovação é 193/17 (Anexo A).

O presente estudo foi desenvolvido em ratos *Wistar* adultos, provenientes do Biotério do IPEN.

Até o momento do início dos experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do IPEN, em condições adequadas de luminosidade (sendo o período 12h claro/12h escuro), temperatura e umidade. A alimentação desses foi provida de ração padrão balanceada para roedores e água *ad libitum* durante todo o estudo.

5 MÉTODOS

5.1 Marcação do reagente liofilizado DMSA-TEC com tecnécio-99m

Para este estudo foi selecionado o reagente liofilizado produzido e comercializado pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN, a saber, DMSA-TEC.

- **DMSA-TEC** – (succímer) - reagente liofilizado para marcação com solução injetável de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) produzindo o radiofármaco succímer (^{99m}Tc).

O radiofármaco preparado a partir do DMSA-TEC é destinado para cintilografia renal, para detecção de anormalidades do parênquima renal diagnóstico de pielonefrite aguda, entre outras patologias renais.

Cada frasco liofilizado de DMSA-TEC contém:

Tabela 1 - Conteúdo do frasco liofilizado (DMSA-TEC).

Composição	Quantidade
succímer	1,0 mg
Cloreto estano di-hidratado	0,44 mg
Ácido ascórbico	0,70 mg
Inositol	0,05 mg

Cada frasco foi reconstituído conforme instruções de preparo descritas na bula do produto, e resumidas a seguir, utilizando-se solução injetável de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc), livre de oxidantes e/ou aditivos, permitindo a obtenção de uma solução estéril límpida e incolor para administração intravenosa.

5.1.1 Marcação do DMSA-TEC com ^{99m}Tc , conforme descrita na bula do produto:

Devem ser respeitadas precauções usuais relacionadas à esterilidade e radioproteção.

- I. Colocar o frasco do reagente liofilizado em uma blindagem de chumbo. Aguardar que atinja a temperatura ambiente (15 a 30° C).
- II. Diluir a solução injetável de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) utilizando solução de cloreto de sódio 0,9% estéril, sem adição de conservantes.
- III. Adicionar 2-3 mL de solução injetável de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) com atividade máxima de 3700 MBq (100 mCi) ao frasco do reagente liofilizado. Evitar a entrada de ar no frasco e eliminar as bolhas de ar da seringa antes da adição de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc). O frasco liofilizado é fechado a vácuo e a solução injetável de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) deverá fluir naturalmente para dentro do frasco. Caso contrário, indicará a presença de ar dentro do frasco, e o mesmo deverá ser inutilizado. Agitar até completa dissolução.
- IV. Após adição da solução injetável de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc), deixar o frasco em posição vertical em temperatura ambiente por 30 minutos.
- V. A solução final, límpida e incolor apresenta pH de 2,0 – 4,0, e pode ser utilizada até 4 horas após a marcação se conservada em temperatura ambiente (15 a 30° C), e mantendo-se o lacre do frasco. Evitar a entrada de ar ao retirar as doses do frasco de marcação. Identificar o frasco com etiqueta indicando material radioativo, retirar amostra para controle de qualidade e manter ao abrigo da luz.
- VI. Realizar o controle de pureza radioquímica da marcação (vide controle de qualidade).

5.2 Marcação e Controle de Pureza Radioquímica

As marcações do kit de DMSA-TEC com tecnécio-99m, para realização dos estudos de biodistribuição pelo método não invasivo, foram realizadas no Laboratório de Imagens Pré-clínicas da Unicamp e as leituras dos segmentos das fitas cromatográficas do controle de pureza radioquímica foram realizadas nos laboratórios de controle de qualidade do Centro de Radiofarmácia do IPEN.

As marcações foram realizadas com a atividade de 740 MBq em 2,0 mL de solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc), eluída do gerador IPEN-TEC.

Transcorrido o tempo de reação de 30 minutos à temperatura ambiente, uma amostra foi retirada do frasco de marcação para realizar o controle de qualidade de pureza radioquímica.

O controle de qualidade de pureza radioquímica da marcação foi realizado empregando-se os sistemas cromatográficos e instruções descritos a seguir:

Suporte: Fita de papel Whatman 3 MM de 1,0 cm de largura x 9,0 cm de comprimento (para a cromatografia em papel) e fita de sílica gel em alumina (TLC-SG) de 1,5 cm de largura x 12,5 cm de comprimento (para a cromatografia em camada delgada).

Solvente: Acetona p.a. para a fita de papel Whatman 3 MM e solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % para a fita de TLC-SG.

Ponto de aplicação: A amostra foi aplicada a 1,0 cm da base da fita de papel Whatman 3 MM e a 1,5 cm da base da fita de TLC-SG.

Corte após a cromatografia: As fitas de papel Whatman 3 MM foram cortadas em dois fragmentos, por meio do corte a 5,0 cm da base para a fita, conforme ilustrado na Figura 6 a seguir, dando origem a dois fragmentos – o primeiro, que contém o ponto de aplicação (R_f 0,0) e o segundo que contém a frente de solvente (R_f 1,0). As fitas de TLC-SG foram cortadas em segmentos de 1 cm, a partir do ponto de aplicação da amostra, conforme ilustrado na Figura 7 a seguir.

Figura 6 - Dimensões e pontos de corte da Fita cromatográfica de papel Whatman 3MM empregada no controle de pureza radioquímica do DMSA-TEC radiomarcado com tecnécio-99m: cálculo de % de $^{99m}\text{TcO}_4$.

Figura 7 - Dimensões e pontos de corte da Fita cromatográfica de TLC-SG (suporte aluminizado com fina camada de sílica gel) empregada no controle de pureza radioquímica do DMSA-TEC radiomarcado com tecnécio-99m: cálculo de % de $^{99m}\text{TcO}_2$.

O fator de retenção do succímer (^{99m}Tc) e das possíveis impurezas da reação de marcação são apresentados na tabela 2 a seguir:

Tabela 2 - Fatores de retenção (R_f) das espécies radioquímicas envolvidas na marcação do kit de DMSA-TEC com tecnécio-99m, para os dois sistemas cromatográficos empregados.

Espécie Radioquímica	R_f	
	Papel Whatman 3MM/ Acetona p.a.	TLC-SG/ NaCl 0,9%
succímer (^{99m}Tc)	0,0	1,0
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1,0	1,0
$^{99m}\text{TcO}_2$	0,0	0,0

Após a corrida cromatográfica, as fitas foram secas, cortadas e cada segmento foi colocado em tubos para leitura da radioatividade em contador gama tipo poço (Packard - Canberra, EUA).

A seguir, a pureza radioquímica das marcações foi determinada da seguinte forma:

- Calculou-se a porcentagem da contagem do segundo fragmento (R_f 1,0) em relação ao total na fita para o sistema de cromatografia em papel (% $^{99m}\text{TcO}_4^-$).
- Calculou-se a porcentagem da contagem no primeiro fragmento (R_f 0,0) em relação ao total na fita no sistema de cromatografia em camada delgada (% $^{99m}\text{TcO}_2$).
- Calculou-se: $100 - (\% ^{99m}\text{TcO}_4^- + \% ^{99m}\text{TcO}_2)$. Essa porcentagem é a pureza radioquímica da marcação.

De acordo com o critério de aceitação para este ensaio, considera-se adequado para utilização clínica o radiofármaco com pureza radioquímica $\geq 85\%$.

Para calcular as porcentagens de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ as contagens dos seguimentos das fitas cromatográficas foram agrupadas para cálculo de acordo com as equações 4 e 5.

$$\%Tco_2 = \frac{n1}{\sum_{n1}^{n10} n} \times 100 \quad (4)$$

$$\%Tco_4 = \frac{n2}{\sum_{n1}^{n2} n} \times 100 \quad (5)$$

5.3 Biodistribuição pelo método invasivo

Os resultados do controle de distribuição biológica dos lotes de DMSA-TEC produzidos no IPEN no período de janeiro a setembro de 2018, totalizando 9 lotes, foram analisados estatisticamente. O ensaio de distribuição biológica foi realizado por método invasivo, descrito em procedimento interno do Centro de Radiofarmácia do IPEN, com base na monografia do radiofármaco succímer (^{99m}Tc) da Farmacopeia Americana (USP - *United States Pharmacopeia*) [17].

De forma geral, no controle de distribuição biológica por método invasivo a atividade preconizada do radiofármaco de ^{99m}Tc foi administrada por via intravenosa a três animais e após intervalo de tempo estabelecido em procedimento os animais foram sacrificados, e os órgãos de interesse foram retirados. A radioatividade de cada órgão foi avaliada com o auxílio de um contador gama tipo poço.

O método invasivo de biodistribuição utilizado para o produto DMSA-TEC radiomarcado com ^{99m}Tc - succímer (^{99m}Tc) - está resumido na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3 - Biodistribuição do radiofármaco succímer (^{99m}Tc) utilizando método invasivo.

RADIOFÁRMACO: DMSA-TEC RADIOMARCADO	
Animal utilizado	Rato Wistar
Número de animais	03 por lote de radiofármaco
Atividade administrada	3,7-92,5 MBq / 0,2-0,25 mL
Tempo após administração	60 minutos
Órgãos retirados	Rins, fígado e baço

Os cálculos para quantificação da distribuição do radiofármaco foram realizados conforme descritos na equação 6 a seguir.

$$\%A. I. = \frac{\text{Atividade no Órgão}}{\text{Padrão Real}} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

%A.I.= Porcentagem de atividade injetada;

Atividade no órgão= Leitura da atividade do órgão da cobaia detectadas no contador gama tipo poço e ou no ativímetro;

Padrão Real = Leitura da atividade do padrão de referência da atividade administrada nos ratos subtraindo as perdas da seringa e possíveis injetomas.

Os critérios de aceitação dos ensaios são apresentados na Tabela 4. Para o succímer (^{99m}Tc) utiliza-se o critério estabelecido pela Farmacopeia Americana (USP) [17].

Tabela 4 - Critérios de aceitação para o estudo de biodistribuição invasivo (USP).

PRODUTO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	REFERÊNCIA
DMSA-TEC succímer (^{99m}Tc)	%A.I. Rins ≥ 40	USP
	Razão Rins/ fígado + baço ≥ 6	

5.4 Biodistribuição pelo método não invasivo

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver metodologia para aquisição de imagens do radiofármaco succímer (^{99m}Tc) no equipamento micro PET/SPECT/CT do IPEN e avaliar a possibilidade de quantificar os órgãos de interesse, à semelhança do que é realizado no estudo de biodistribuição pelo método invasivo.

Entretanto, o micro PET/SPECT/CT do IPEN apresentou problemas técnicos e falhas nos seus controles de qualidade tornando impossível a validação da pesquisa. Devido a tais circunstâncias, foi utilizado o micro PET/SPECT/CT do Laboratório LIP-Unicamp, o qual possui equipe devidamente treinada e equipamento calibrado, seguindo as recomendações do fabricante e recomendações adequadas ao uso do equipamento.

Para estabelecer um protocolo de aquisição de imagem para atender aos requisitos do trabalho, foi feita a leitura do manual do equipamento para entender todos os parâmetros e funções do equipamento, desde o hardware ao software e revisão bibliográfica de estudos semelhantes, para estabelecer o protocolo de imagens volumétricas (Imagens tomográficas SPECT/CT) [01,12,16,18,23,24,28,32,33,34,35,37,38,39,40,46,47,48].

O protocolo para realização do estudo de biodistribuição pelo método não invasivo compreendeu as seguintes etapas:

- Primeiramente foi necessário determinar o fator de calibração do equipamento ou sensibilidade do equipamento micro SPECT/CT, tanto para imagens planares como para imagens SPECT.
- Para o fator de calibração para imagem SPECT foi usada uma seringa de 5 mL com solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) como objeto simulador e com a atividade conhecida de 37 MBq (1 mCi). Foi realizada uma imagem desta seringa com o tempo de 15 minutos, utilizando FOV de 120 mm;
- Para o fator de calibração para imagem planar foi usado um recipiente planar contendo 5 mL de solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) como objeto simulador e com a atividade conhecida de 37 MBq (1 mCi). Foi

realizada uma imagem deste recipiente com o tempo de 10 minutos, utilizando FOV de 120 mm.

- Para obter o fator de Calibração foi dividido o CPM pela atividade multiplicada pelo tempo de exame conforme indicado na equação 2;
- O animal foi sedado com 0,1 mL/100g do peso do animal com o anestésico uretana pela via intraperitoneal, sendo o período de reação do anestésico de cerca de 6 minutos;
- Foi administrada a atividade de 37 MBq (1 mCi) de radiofármaco na veia peniana do rato, com o volume de 0,2 mL de radiofármaco e aguardou-se o tempo de biodistribuição de 45 minutos;
- Em seguida, o animal foi posicionado na mesa do equipamento micro PET/SPECT/CT em decúbito dorsal usando o FOV (*Field Of View*) de 120 mm² com a região dos rins centralizada no centro dos detectores gama;
- As imagens SPECT foram adquiridas em torno do animal com 64 projeções;
- Foram realizadas imagens tomográficas pelo método do CT para servir como parâmetro de delimitação e seleção do VOI (*Volume Of Interest*), para reduzir o efeito de volume parcial e delimitação do VOI do fígado e baço;
- As imagens foram pré-processadas usando o algoritmo iterativo OSEM com 3 iterações;
- Foram selecionados os VOI's dos órgãos de interesse, adicionado um filtro gaussiano de 3,0 mm para suavizar a imagem e corrigir a atenuação dos fótons;
- As imagens foram processadas para o cálculo da %A.I. nos órgãos de interesse pelo software Pmod 4.0;
- Em seguida os valores dos VOI's foram coletados e quantificados conforme as equações 3 e 6.

Todos os parâmetros do estudo foram avaliados, desde a definição da atividade administrada, parâmetros de aquisição e de processamento das imagens.

Da mesma forma que no método invasivo, os estudos de biodistribuição pelo método de imagem foram realizados utilizando-se 03 animais para cada lote. Foram utilizados 03 lotes diferentes do radiofármaco. O radiofármaco foi preparado no momento da utilização, empregando-se o mesmo procedimento descrito para o estudo invasivo. No estudo não invasivo, considerou-se a quantificação dos mesmos órgãos estabelecidos no estudo invasivo e os mesmos critérios de aceitação descritos na farmacopeia USP.

A Tabela 5 descreve as condições do estudo de biodistribuição do radiofármaco succímer (^{99m}Tc) utilizando método não invasivo.

Tabela 5 - Biodistribuição do radiofármaco succímer (^{99m}Tc) utilizando método não invasivo.

RADIOFÁRMACO: DMSA-TEC RADIOMARCADO	
Animal utilizado	Rato Wistar
Número de animais	03 animais para cada lote de radiofármaco
Atividade administrada	37 MBq / 0,2 mL
Tempo após administração para início das imagens	45 minutos
Órgãos selecionados para quantificação	Rins, fígado+baço

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2 Pureza Radioquímica

Para determinação das porcentagens de pureza radioquímica das marcações de kits de DMSA-TEC com ^{99m}Tc realizaram-se ensaios em triplicata e os resultados dos estudos são apresentados na Tabela 6,7 e 8.

Tabela 6 - Porcentagem de Pureza Radioquímica da marcação de kit de DMSA-TEC com ^{99m}Tc empregado nos estudos de distribuição biológica não invasivos para o lote 002/19.

DMSA-TEC LOTE 002/19 – PUREZA RADIOQUÍMICA DA MARCAÇÃO	
TCO ₂	9,24 %
TCO ₄	0,72 %
PUREZA RADIOQUÍMICA	90,05 %

Tabela 7 - Porcentagem de Pureza Radioquímica da marcação de kit de DMSA-TEC com ^{99m}Tc empregados nos estudos de distribuição biológica não invasivos para o lote 003/19.

DMSA-TEC LOTE 003/19 – PUREZA RADIOQUÍMICA DA MARCAÇÃO	
TCO ₂	7,76 %
TCO ₄	0,07 %
PUREZA RADIOQUÍMICA	92,17 %

Tabela 8 - Porcentagem de Pureza Radioquímica da marcação de kit de DMSA-TEC com ^{99m}Tc empregados nos estudos de distribuição biológica não invasivos para o lote 004/19.

DMSA-TEC LOTE 004/19 – PUREZA RADIOQUÍMICA DA MARCAÇÃO	
TCO₂	9,73 %
TCO₄	1,20 %
PUREZA RADIOQUÍMICA	89,06 %

As porcentagens de pureza radioquímica foram obtidas subtraindo-se de 100% a somatória das porcentagens das médias das impurezas radioquímicas ($^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4$), conforme descrito nas equações 1 e 2. Todos os controles de qualidade de pureza radioquímica apresentaram resultados acima do critério de aceitação da farmacopeia (USP), que especifica valor $\geq 85\%$, *demonstrando* a eficiência da marcação do DMSA-TEC produzido pela radiofarmácia do IPEN. A confirmação do atendimento ao critério de pureza radioquímica das marcações foi imprescindível para a interpretação dos resultados do estudo de biodistribuição pelo método invasivo.

6.3 Avaliação da Biodistribuição pelo Método Invasivo

Dentre os controles de qualidade para liberação dos lotes de DMSA-TEC produzidos no IPEN, são realizados controles de qualidade de pureza radioquímica e a biodistribuição *in vivo* do radiofármaco possibilitando avaliar a estabilidade *in vivo* do radiofármaco.

Tais testes fazem parte da rotina de controle de qualidade do Centro de Radiofarmácia do IPEN. Neste estudo foi realizado um levantamento dos resultados de biodistribuição *in vivo* obtidos na análise dos lotes de DMSA-TEC, produzidos no período de janeiro a setembro de 2018. Os resultados de todos os lotes avaliados atenderam aos critérios estabelecidos pela farmacopeia USP como mostra a tabela 9 a seguir.

Este levantamento foi realizado para possibilitar conhecer o valor médio da %A.I. do DMSA-TEC radiomarcado nos órgãos selecionados de interesse,

quando se emprega o método invasivo, bem como avaliar a variabilidade em função dos lotes produzidos, empregando-se os ratos Wistar do biotério do IPEN.

Tabela 9 - Resultados dos estudos de biodistribuição de nove lotes de DMSA-TEC produzidos no IPEN no período de janeiro a setembro de 2018

Lote	Porcentagem da Atividade Administrada do radiofármaco (% A.I.)				
	RINS	FÍGADO	BAÇO	CARCAÇA	Rins/ fígado + baço
Lote 001/18	48,9 ± 1,0	4,5 ± 0,6	0,1 ± 0,1	21,2 ± 1,2	10,6
Lote 002/18	46,9 ± 1,4	4,3 ± 0,8	0,2 ± 0,1	28,9 ± 2,8	10,5
Lote 003/18	45,7 ± 0,4	4,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1	29,3 ± 2,3	10,1
Lote 004/18	46,2 ± 3,8	4,1 ± 0,2	0,2 ± 0,1	25,3 ± 2,0	10,8
Lote 005/18	44,8 ± 11,8	5,8 ± 0,9	0,5 ± 0,2	43,7 ± 7,7	7,2
Lote 006/18	43,8 ± 1,5	3,2 ± 0,3	0,1 ± 0,1	34,3 ± 2,3	13,2
Lote 007/18	42,7 ± 0,4	3,4 ± 0,3	0,2 ± 0,1	36,2 ± 3,0	11,8
Lote 008/18	42,9 ± 0,8	3,5 ± 0,3	0,1 ± 0,1	33,5 ± 2,3	11,8
Lote 009/18	43,1 ± 2,9	5,5 ± 1,0	0,1 ± 0,1	36,1 ± 3,8	7,7
Valores médios ± Desvio padrão	45,0 ± 2,7	4,3 ± 0,5	0,2 ± 0,1	32,0 ± 3,0	10,4 ± 1,9

A contagem da atividade da carcaça não está prevista no procedimento da Farmacopeia USP. Entretanto, é realizado no IPEN como forma de controle adicional, sendo útil para casos de ocorrência de injetoma (acúmulo de radiofármaco no ponto de aplicação por extravasamento da veia empregada para administração) ou mesmo para avaliar se o resultado de um dos animais deve ser descartado. No critério de aceitação farmacopeico, pelo menos dois dos três animais ensaiados devem apresentar resultados conforme especificação.

Os ensaios empregando organismos vivos não são passíveis de validação e apresentam certa variabilidade que pode ser atribuída a diferenças fisiológicas

e anatômicas individuais, apesar de serem empregados animais da mesma linhagem e raça, adultos, com idade e peso aproximados. Daí o critério de aceitação considerar a possibilidade de que o resultado de um animal dentre três possa ser descartado. Outros fatores que podem levar a desvios nos resultados experimentais envolvem problemas com a administração do radiofármaco, como o extravasamento do mesmo da veia no momento da injeção, resultando em acúmulo local do radiofármaco.

A figura 8 mostra a flutuação dos resultados de % A.I. nos rins para os diferentes lotes, e a figura 9 ilustra a flutuação para a relação rins/fígado+baço, demonstrando que todos os resultados atenderam aos critérios de aceitação, apesar dos desvios observados.

Figura 8 - % A.I. nos rins nos diferentes lotes de DMSA-TEC analisados pelo método invasivo.

A partir da análise de dispersão dos resultados obtidos de %A.I. nos rins pelo método invasivo na figura 8, observa-se que a maioria dos pontos estão dentro dos limites mínimo e máximo de controle em relação ao valor médio individual, sendo que apenas 1 ponto apresentou valor maior do que 3 desvios padrão a partir do valor médio, podendo estar relacionado à variação individual

comum, esperada para processos biológicos. A análise demonstra a reprodutibilidade do método.

Figura 9 - Relação de % A.I. para rins/fígado+baço ($\geq 6\%$) para os lotes de DMSA-TEC analisados pelo método invasivo.

Na Figura 9, observa-se que para a relação rins/fígado+baço todos os pontos estão dentro dos limites mínimo e máximo de controle com relação ao valor médio individual, considerando-se 3 desvios padrão a partir do valor médio. Importante ressaltar que todos os resultados estão dentro dos limites de especificação.

6.4 Avaliação da biodistribuição pelo método não invasivo

Todos os fenômenos que interferem na quantificação da imagem, tais como, background, atenuação de fótons, radiação dispersa, PVE e definição de FC foram considerados para a quantificação das imagens.

O background da sala do micro SPECT/PET/CT do IPEN foi avaliado com dosímetros TLD e apresentou taxas de doses ambiental média de oito medidas de $0,33 \pm 0,10 \mu\text{Sv/h}$ e para a sala de biodistribuição $0,31 \pm 0,10 \mu\text{Sv/h}$.

Os estudos de imagem foram realizados no LIP/Unicamp e as medidas do background foram realizadas usando um detector GM RadEye G© e apresentou as seguintes taxas de dose: Para a sala do micro PET/SPECT/CT $0,15 \pm 0,10 \mu\text{Sv/h}$ e para sala de marcação de radiofármacos $0,15 \pm 0,10 \mu\text{Sv/h}$.

Para a correção da radiação dispersa e atenuação de fótons foi usado um filtro gaussiano de 3,0 mm e selecionado os VOI com Threshold de 50% para o isocontorno.

As figuras 10 e 11 tratam-se da mesma imagem SPECT, processada de uma cobaia usada no estudo de biodistribuição com o radiofármaco DMSA-TEC marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, sendo que, na figura 10, foi aplicado o filtro gaussiano e a figura 11 está sem a aplicação do filtro Gaussiano [44].

Figura 10 - Imagem SPECT renal de rato Wistar após administração do radiofármaco DMSA-TEC radiomarcado com tecnécio-99m, com aplicação de filtro Gaussiano nos planos Axial, Coronal e sagital.

Figura 11 - Imagem SPECT renal de rato Wistar após administração do radiofármaco DMSA-TEC radiomarcado com tecnécio-99m, sem aplicação de filtro Gaussiano nos planos Axial, Coronal e sagital.

Para quantificar as imagens, primeiro foi necessário calcular a sensibilidade do detector SPECT para determinar o fator de calibração e com isso conseguir quantificar as imagens (equação 2).

Para obter a sensibilidade do sistema SPECT com imagem tomográfica foi usada uma seringa de 5 mL com solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) como objeto simulador e com a atividade conhecida de 37 MBq (1 mCi). Foi realizada uma imagem desta seringa com o tempo de 15 minutos, utilizando FOV de 120 mm. A imagem foi processada selecionando os VOI (*Volume of Interest*) e quantificada, obtendo o FC= 1287,1 cpm/mCi (Figura 12).

Figura 12 - Processamento da imagem da seringa de 5mL. Seleção dos VOI's para quantificação nos planos axiais, coronais e sagitais.

Para obter a sensibilidade do sistema SPECT com imagem planar foi usado um recipiente planar contendo 5 mL de solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) como objeto simulador e com a atividade conhecida de 37 MBq (1 mCi). Foi realizada uma imagem deste recipiente com o tempo de 10 minutos, utilizando FOV de 120 mm. A imagem foi processada selecionando o VOI e quantificada, obtendo o FC= 6501,2 cpm/mCi (Figura 13).

Figura 13 - Processamento da imagem planar em recipiente plano com filtro gaussiano de 3.0 e Threshold de 50%.

A quantificação das imagens tomográficas se dá pelo produto do número de voxel multiplicado pelo valor médio das contagens captadas pelo detector do equipamento em um dado intervalo de tempo e para imagens planares a quantificação é o produto do número de pixels multiplicado pelo valor médio das contagens captadas pelo detector do equipamento em um dado intervalo de tempo. Entretanto, a modalidade de imagens planares não mostram valores volumétricos o que impossibilitou a quantificação da razão rins/fígado+baço e a correção do PVE utilizando o CT.

Para quantificar a atividade no órgão de interesse empregou-se as equações 3 e 6.

A quantificação dos órgãos de interesse foi feita de forma semelhante ao que foi feito ao quantificar os objetos simuladores, entretanto, foram selecionados os VOIs delimitando os órgãos de interesse e as regiões onde ocorreram possíveis injetomas, para calcular a perda de material radioativo. Foi usada a equação (3) para chegar na quantidade de atividade retida no órgão e após isso foi usada a equação (6) para calcular a % A.I. nos órgãos de interesse.

Após estudo dos protocolos de imagem Planar e SPECT, foi selecionada a modalidade SPECT para quantificar a % A.I. nos rins e o planejamento de delimitação dos VOIs foi realizado nos planos sagital, coronal e axial do animal conforme ilustrado na figura 14, pois não foi possível distinguir a bexiga de possíveis injetomas pela modalidade de imagem planar.

Figura 14 - Imagem SPECT com delimitação dos VOIs nos planos Sagital, Coronal e Axial.

Para a quantificação do fígado+baço foram utilizados os recursos do CT para delimitar os VOIs, pois o radiofármaco obtido a partir da marcação do DMSA-TEC com ^{99m}Tc apresenta, em média, $4,3 \pm 0,5$ % de %A.I. no fígado e cerca de 0,2% no baço, conforme determinado pelo método invasivo. Devido a imagem SPECT para estudos renais ter baixa %A.I. no fígado, não foi possível ter um número de eventos suficiente para formar uma imagem com boa

resolução espacial e com detalhamento anatômico. Com os VOIs selecionados pelo método de CT (figura 15), foi possível quantificar o fígado juntamente com o baço obtendo o valor %A.I. nestes órgãos juntos.

Figura 15 - Imagem fundida entre os métodos de CT e SPECT com VOIs do fígado delimitados pelo CT.

Os resultados das quantificações dos órgãos de interesse em cada lote de DMSA-TEC radiomarcado analisado, encontram-se nas tabelas 10,11,12 e 13.

Tabela 10 - Resultados obtidos da quantificação do DMSA-TEC lote 002/19 realizado pelo método de imagens estática.

DMSA-TEC Lote 002/19	%A.I.			
	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Média ± desvio padrão
Rins	25,83	32,82	26,29	28,31 ± 3,91
Bexiga+injetoma	3,66	1,85	1,98x10 ⁻⁴	1,84 ± 1,83

Tabela 11 - Resultados obtidos da quantificação do DMSA-TEC lote 003/19 realizado pelo método de imagens estática.

DMSA-TEC Lote 003/19	%A.I.			
	Rato 1*	Rato 2	Rato 3	Média ± desvio padrão
Rins	16,88	27,26	28,85	28,06 ± 1,13
Bexiga+injetoma	33,34	6,64	4,52	5,58 ± 1,50

Tabela 12 - Resultados obtidos da quantificação do DMSA-TEC lote 003/19 realizado pelo método de imagens SPECT.

DMSA-TEC Lote 003/19	%A.I.			
	Rato 1*	Rato 2	Rato 3	Média ± desvio padrão
Rins	13,81	27,00	24,97	25,99 ± 1,44
Fígado	3,15	3,47	2,85	3,16 ± 0,43
Rins/fígado+baço	4,39	7,79	8,75	8,27 ± 0,68

* Neste animal houve grande captação na bexiga (Figura 16), o que indica que o radiofármaco possa ter sido injetado via uretra da cobaia. Portanto o resultado do estudo do rato 1 não foi considerado para o cálculo estatístico.

Figura 16 - Imagem estática (planar) dos rins mostrando a delimitação dos VOIs para quantificação dos rins e bexiga.

Tabela 13 - Resultados obtidos da quantificação do DMSA-TEC lote 004/19 realizado pelo método de imagens SPECT.

DMSA-TEC Lote 004/19	%A.I.			
	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Média ± desvio padrão
Rins	22,91	22,84	19,99	21,92 ± 1,67
Fígado	3,15	3,15	3,13	3,14 ± 0,01
Rins/fígado+baço	7,28	7,26	6,36	6,97 ± 0,53

A variabilidade dos resultados pelo método não invasivo, assim como no método invasivo, pode ser atribuída a diferenças fisiológicas e anatômicas individuais, apesar de serem empregados animais da mesma linhagem e raça, adultos, com

idade e peso aproximados. Além dos fatores que interferem na quantificação da imagem descritos anteriormente, outros fatores como problemas na administração do radiofármaco podem ocasionar flutuação nos resultados.

A figura 17 mostra a flutuação dos resultados de % A.I. nos rins para os animais estudados pelo método SPECT, e o limite de aceitação estabelecido pela farmacopeia USP para o método invasivo, enquanto a figura 18 ilustra a flutuação para a relação rins/fígado+baço, e o limite de aceitação estabelecido pela farmacopeia USP para o método invasivo.

Figura 17 - % A.I. nos rins de seis animais analisados pelo método SPECT abaixo do limite de aceitação estabelecido pela farmacopeia USP.

A partir da análise de dispersão dos resultados obtidos de %A.I. nos rins pelo método não invasivo (figura 17), observa-se que todos os pontos estão abaixo do limite mínimo e máximo de controle com relação ao valor médio individual, considerando 3 desvios padrão da média, inclusive o dado correspondente ao rato 1, que apresentou maior desvio, possivelmente relacionado ao problema de injetoma previamente descrito, demonstrando a reprodutibilidade do método. Importante ressaltar, entretanto, que no caso do método não invasivo, os valores de %A.I. nos rins não atenderam ao critério de especificação farmacopeico, ficando abaixo do mesmo.

Figura 18 - Relação de % A.I. para rins/fígado+baço ($\geq 6\%$) para os lotes de DMSA-TEC analisados pelo método não invasivo.

Na Figura 18, observa-se que para a relação rins/fígado+baço todos os pontos estão dentro dos limites mínimo e máximo de controle com relação ao valor médio individual, considerando-se 3 desvios padrão a partir do valor médio. Importante ressaltar que todos os resultados estão dentro dos limites de especificação para a relação rins/fígado+baço para o método não invasivo, exceto o lote 003/19 Rato 1 que apresentou resultado fora da especificação (mínimo 6 %).

O estudo estatístico levou em consideração seis animais, dos lotes DMSA-TEC lote 003/19 e DMSA-TEC lote 004/19, com imagens adquiridas pelo método SPECT. O primeiro estudo, realizado com o lote DMSA-TEC 002/19, foi feito com a modalidade de imagens planares e não possibilitou resultados volumétricos para quantificação da razão rins/fígado+baço.

6.5 Avaliação quantitativa entre os métodos

A avaliação da biodistribuição pelo método invasivo usou os critérios de aceitação estabelecidos na farmacopeia americana (USP) descritos neste trabalho e o levantamento realizado de lotes de DMSA-TEC analisados por este método demonstrou que o produto atendeu ao critério de aceitação estabelecido, em todos os lotes.

Os resultados das quantificações pelo método invasivo para obter a %A.I. nos rins foram analisados e determinou-se o valor médio de $45,02 \pm 2,70\%$ para os rins e $10,4 \pm 1,9\%$ para a razão rins/fígado+baço. A atividade empregada nos ensaios foi na faixa de $11,1 - 22,2$ MBq ($0,3 - 0,6$ mCi). A pureza radioquímica também atendeu ao critério de aceitação para os nove lotes, sendo o valor médio de pureza radioquímica de $90,7 \pm 2,23\%$. O ensaio de biodistribuição de cada lote do DMSA-TEC em modelo invasivo durou em média 3 horas. Estes resultados estão de acordo com os critérios de aceitação da farmacopeia americana, a saber, %A.I. rins $\geq 40\%$ A.I. para rins/fígado+baço $\geq 6\%$ e o limite de aceitação para a pureza radioquímica de $\geq 85\%$.

Nos primeiros experimentos pelo método não invasivo, foram adquiridas imagens estáticas planares para quantificação. Entretanto, apesar de tal protocolo possibilitar, em teoria, a quantificação, o mesmo não fornece informações volumétricas. Deste modo, optou-se pela aquisição de imagens pelo método SPECT.

Os resultados das quantificações para obter a %A.I. nos rins pelo método não invasivo foram analisados e resultaram no valor médio de $23,54 \pm 2,62\%$. Para a razão rins/fígado+baço, o valor médio foi de $7,49 \pm 0,87\%$. Cada ensaio de biodistribuição pelo método não invasivo durou em média 2,25 horas. A atividade empregada no ensaio foi na faixa de $29,6 - 37$ MBq ($0,8 - 1$ mCi), e a média dos três estudos de pureza radioquímica foi de $90,43 \pm 1,59\%$.

A tabela 14 apresenta resumidamente os resultados dos critérios analisados na comparação entre método invasivo e não invasivo.

Tabela 14 - Resultados dos critérios comparados entre o método invasivo e não invasivo.

Avaliação quantitativa entre os métodos		
<i>Critérios</i>	Invasivo	Não Invasivo
<i>%A.I rins</i>	45,02 ± 2,70%	23,54 ± 2,62%
<i>%A.I rins/fígado+baço</i>	10,4 ± 1,9%	7,49 ± 0,87%
<i>Atividade</i>	11,1 – 22,2 MBq (0,3 – 0,6 mCi)	29,6 - 37 MBq (0,8 – 1 mCi)
<i>Pureza radioquímica</i>	90,7 ± 2,23%	90,43 ± 1,59%
<i>Tempo</i>	3h	2h15min.

Os resultados de pureza radioquímica atenderam ao critério de aceitação ($\geq 85\%$), validando os resultados do ensaio de biodistribuição, quanto à qualidade do radiofármaco empregado no estudo. Entretanto, os resultados de biodistribuição obtidos pelo método não invasivo não atenderam ao critério da farmacopeia de referência para a %A.I. nos rins, pois a %A.I. obtida no estudo foi menor que 40%. Entretanto, quando se considera a razão rins/fígado+baço, o critério de aceitação foi atendido para todos os animais avaliados, com exceção do rato 1 do DMSA-TEC lote 003/19, para o qual observou-se acúmulo do radiofármaco na bexiga, provavelmente relacionado à erro na administração, motivo pelo qual os resultados deste animal não foram considerados para o cálculo do valor médio.

Como se sabe, o radiofármaco succímer (^{99m}Tc) é utilizado para avaliação da morfologia e patologias renais, devido à intensa e persistente captação do mesmo no tecido renal. Entretanto, para obtenção de uma imagem adequada, além da elevada captação renal, espera-se ainda que o radiofármaco não se acumule significativamente em órgãos adjacentes como o fígado e baço, sendo que uma captação elevada nestes órgãos representaria um desvio da biodistribuição esperada do radiofármaco, provavelmente causada por instabilidade radioquímica do mesmo. Por este motivo, a avaliação da razão rins/fígado+baço é tão importante quanto a própria avaliação da captação renal no estudo de biodistribuição.

O fato da razão rins/fígado+baço, no estudo de biodistribuição pelo método não invasivo, alcançar valores que atendem ao critério de aceitação indica, por si só, que o método não invasivo apresenta potencial para avaliar a qualidade do radiofármaco no sistema biológico, já que tal relação representa a predominância da captação renal frente à captação nos órgãos adjacentes.

A princípio, os mesmos critérios de aceitação foram considerados para a quantificação de imagens pelo método não invasivo pois não existem critérios descritos em literatura para avaliação de biodistribuição por método de imagens. Entretanto, a comparação dos resultados, em termos percentuais, não é adequada por se tratarem de técnicas diferentes, que envolvem a utilização de sistemas de detecção diferentes e, além disso, o número de amostras empregados também foram diferentes.

Deste modo, para o método invasivo o coeficiente de variação foi de 4,68% nos rins e 18,46% para a razão rins/fígado+baço, enquanto que para o método não invasivo, o coeficiente de variação foi de 11,13% nos rins e de 11,67 % para a razão rins/fígado+baço.

O coeficiente de correlação linear foi igual a 0 (zero), dado pela expressão representada pela equação 7, mostrando que não existe correlação linear entre os métodos:

$$r^2 = \frac{[n.(\sum x_i.y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)]^2}{[n.(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2][n.(\sum y_i^2) - (\sum y_i)^2]} \quad (7)$$

Onde:

X_i= Medidas Invasivo

Y_i= Medidas não invasiva

Em que:

$r^2 = 1 \rightarrow$ Correlação Linear Positiva e Perfeita (Correlação forte)

$r^2 = -1 \rightarrow$ Correlação Linear Negativa e Perfeita (Correlação moderada)

$r^2 = 0 \rightarrow$ Inexistência de Correlação Linear (Correlação Fraca)

A análise das distribuições pelo método Pearson demonstrou que os métodos de quantificação não possuem uma correlação linear, mas há reprodutibilidade do método não invasivo, ou seja, levando-se em consideração cinco animais, o método apresentou-se reprodutível [50].

Tal reprodutibilidade encoraja a utilização do método de quantificação por imagem em estudos de biodistribuição para desenvolvimento de novos radiofármacos, especialmente quando se deseja comparar a captação de produtos diferentes em um determinado órgão. Nos estudos de investigação, a utilização do método não invasivo poderá representar a utilização de um número reduzido de animais, quando comparado com o método invasivo, uma vez que a captação nos órgãos de um determinado animal poderá ser quantificada em diferentes tempos após a administração do radiofármaco.

No presente estudo, a avaliação comparativa da reprodutibilidade dos dois métodos foi priorizada levando em consideração os limites estabelecidos pela farmacopeia USP para rins e razão rins/fígado+baço, conforme mostrado nos gráficos de dispersão figuras 09 e 18.

O estudo de normalidade de Anderson Darling (1954) foi usado para analisar a distribuição normal das amostras dos métodos invasivos e não invasivos com o auxílio do programa Minitab Statistical Software. Os valores e gráficos fornecidos encontram-se nas figuras 19 e 20.

Figura 19 - Estudo de normalidade dos rins para o método invasivo.

De acordo com a análise descritiva dos dados na figura 19, forma-se uma distribuição com valor médio de aproximadamente 45 %. Conforme o gráfico, a distribuição dos quartis demonstra o seguinte padrão de distribuição:

- 25% dos resultados na região entre o valor mínimo encontrado na distribuição e o 1º quartil: 42,7 – 43 %;
- 50% dos resultados na região entre o 1º quartil e o 3º quartil: 43 – 46,5 %;
- 25% dos resultados na região entre o 3º quartil e o valor máximo encontrado na distribuição: 46,5 – 48,9 %.

De acordo com o padrão de distribuição apresentado acima, pode-se verificar que os resultados se distribuem distantes do valor mínimo da especificação (mínimo 40 %), atendendo ao critério de aceitação farmacopeico.

Figura 20 - Estudo de normalidade da razão rins/fígado+baço para o método invasivo

De acordo com a análise descritiva dos dados, na figura 20, forma-se uma distribuição com valor médio de aproximadamente 10,4 %. Conforme o gráfico, a distribuição dos quartis demonstra o seguinte padrão de distribuição:

- 25% dos resultados na região entre o valor mínimo encontrado na distribuição e o 1º quartil: 7,2 – 8,9 %;
- 50% dos resultados na região entre o 1º quartil e o 3º quartil: 8,9 – 11,8 %;
- 25% dos resultados na região entre o 3º quartil e o valor máximo encontrado na distribuição: 11,8 – 13,2 %.

De acordo com o padrão de distribuição apresentado, pode-se verificar que os resultados se distribuem distantes do valor mínimo da especificação (mínimo 6 %).

Figura 21 - Estudo de normalidade dos rins para o método não invasivo.

De acordo com a análise descritiva dos dados na Figura 21, forma-se uma distribuição com valor médio de aproximadamente 21,9 %. Conforme o gráfico acima, a distribuição dos quartis demonstra o seguinte padrão de distribuição:

- 25% dos resultados na região entre o valor mínimo encontrado na distribuição e o 1º quartil: 13,8 – 18,4 %;
- 50% dos resultados na região entre o 1º quartil e o 3º quartil: 18,4 – 25,5 %;
- 25% dos resultados na região entre o 3º quartil e o valor máximo encontrado na distribuição: 25,5 – 27 %.

De acordo com o padrão de distribuição apresentado acima, pode-se verificar que os resultados se distribuem abaixo do valor mínimo da especificação (mínimo 40 %).

Figura 22 - Estudo de normalidade da razão rins/fígado+baço para o método não invasivo.

De acordo com a análise descritiva dos dados na Figura 22, forma-se uma distribuição com valor médio de aproximadamente 7 %. Conforme o gráfico acima, a distribuição dos quartis demonstra o seguinte padrão de distribuição:

- 25% dos resultados na região entre o valor mínimo encontrado na distribuição e o 1º quartil: 4,4 – 5,9 %;
- 50% dos resultados na região entre o 1º quartil e o 3º quartil: 5,9 – 8 %;
- 25% dos resultados na região entre o 3º quartil e o valor máximo encontrado na distribuição: 8 – 8,8 %.

De acordo com o padrão de distribuição apresentado acima, pode-se verificar que a maioria dos resultados se distribuem distantes do valor mínimo da especificação (mínimo 6 %).

Um fator que se mostrou desfavorável ao método de imagem foi a determinação da %A.I. no fígado e, consequentemente, a razão rins/

fígado+baço, considerando-se a dificuldade para produzir imagem pelo método SPECT da área correspondente ao fígado e baço, em função da baixa captação destes órgãos frente à captação dos rins. Além disso, a delimitação dos VO/s pelo CT não possuiu detalhamento anatômico suficiente para diferenciar o fígado do baço. Como a região do fígado e baço estão muito próximas isso dificultou a quantificação destes órgãos isoladamente. Entretanto, foi possível quantificar os dois órgãos concomitantemente. Como o critério de aceitação farmacopeico considera a relação entre a %A.I. nos rins e a somatória da %A.I. no fígado e baço, a determinação da %A.I. no fígado e baço conjuntamente não se constituiu em um problema para este produto em particular.

O método não invasivo demonstrou mais facilidade ao fazer a quantificação, uma vez que não depende da habilidade para dissecação dos órgãos dos animais. Outro fator que pode ser considerado sobre o método invasivo, é que ao dissecar as cobaias pode ocorrer contaminação dos órgãos de interesse devido ao material radioativo que está presente na corrente sanguínea do animal. Por este motivo, os órgãos devem ser lavados após a retirada, de modo a eliminar o sangue residual. Deste modo, a manipulação dos animais envolvida no procedimento invasivo gera rejeitos radioativos líquidos e sólidos, além da própria carcaça dos animais, que deverão ser gerenciados apropriadamente. No método invasivo, apenas a carcaça do animal constitui o resíduo radioativo a ser considerado ao final do ensaio.

Enquanto o método invasivo requer habilidade do operador para o procedimento de retirada dos órgãos, o método não invasivo requer outro nível de capacitação profissional, que envolve o conhecimento específico para aquisição e processamento de imagens.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou o potencial do método não invasivo de obtenção de imagens SPECT para quantificação da captação do radiofármaco succímer (^{99m}Tc) em órgãos de interesse, de forma comparativa ao método invasivo empregado no controle de qualidade de lotes de produção do produto DMSA-TEC.

Apesar do método não invasivo produzir resultados quantitativos de %A.I. nos rins que não atenderam ao critério farmacopeico estabelecido para o método invasivo, promoveu resultados reprodutíveis, sugerindo que o método possa ser aprimorado e padronizado para aplicação na rotina de análise de lotes de radiofármacos de ^{99m}Tc , considerando a possibilidade de estabelecimento de correlação quantitativa com o método invasivo e a definição de critérios de aceitação próprios para o método não invasivo. Além disso, o critério farmacopeico foi atendido para a razão entre órgãos, mostrando que se os resultados não podem ser comparados do ponto de vista dos valores percentuais obtidos, são correlacionáveis quando se considera a relação entre órgãos.

Uma das hipóteses que justifica o valor superestimado da quantificação realizada pelo método invasivo, pode estar relacionado ao procedimento de dissecação da cobaia e retirada dos órgãos. Nesse procedimento há uma contaminação superficial dos órgãos devido ao contato com o sangue radioativo da cobaia.

A reprodutibilidade demonstrada pelo método não invasivo encoraja sua aplicação para obtenção de resultados quantitativos em estudos relacionados ao desenvolvimento de novos radiofármacos.

Sugestões para estudos futuros é aumentar o número de experimentos e usar a mesma cobaia para fazer a comparação entre os dois métodos, avaliar a resolução espacial, eficiência energética dos detectores e calibração dos sistemas de detecção para o método invasivo e para o método não invasivo.

ANEXO A

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Estudo de biodistribuição de radiofármacos marcados com ^{99m}Tc pelo método invasivo e não invasivo utilizando o micro PET/SPECT/CT”, registrada com o nº 193/17 sob a responsabilidade de Elaine Bortoleti de Araújo - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), em **23/05/2017**.

Finalidade: Pesquisa Científica ou Ensino	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto/2017 a Agosto/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	39
Peso/Idade	Swiss: 15M - 20 a 40 g - 12 a 24 semanas Wistar: 24M - 200 a 250 g - 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério do IPEN-CNEN/SP

São Paulo, 23 de maio de 2017.

Patrick Jack Spencer
Vice-coordenador da CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO IPEN

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP

Telefones: (011) 3133-9696 – Fax (011) 3133-9709

E-mail: ceuaipen@ipen.br

8 REFERÊNCIAS

- [1] ROBILOTTA, C.C. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Rev Panam Salud Publica**. Washignton. v. 2, n. 3, p. 134-142, 2006.
- [2] CHERRY, SIMON R.; SORENSON, JAMES A.; PHELPS, M. E. **Physics in nuclear medicine**. 4rd ed. Philadelphia: Sanders, 2012.
- [3] BLUMGART, H.L.; WEISS, S. Studies on the velocity of blood flow. **J Clin Invest. Michigan**, v. 1 n. 2, p. 15-31, 1927.
- [4] COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. **NN-3.01**: Diretrizes básicas de proteção radiológica. Rio de Janeiro, 2014.
- [5] LAWRENCE, E.O.; LIVINGSTONE, M.S. The production of high-speed light ions without the use of high voltage. **Phys Rev**. New York. v.1, p. 19-30, 1932.
- [6] KENNA, B. T. The search for technetium in nature. **Journal of Chemical Education**, Washigton, v. 39, n. 9, p. 436-442, 1962.
- [7] THOMAS, A. M.K.; BANERJEE, A. K. **The history of Radiology**. 1 ed. Oxford: Oxford University Press, 2013.
- [8] MATHER, S.J. Innovation in radiopharmacy: progress and constraints? **Eur. J. Nucl. Med.**, v.28, n.4, p.405-407, 2001.
- [9] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, Brasília: ANVISA, v.2, p. 374, 2010.
- [10] CAMARGO, A.C. **Otimização dos procedimentos de preparação, marcação e controle de qualidade do glucarato-99mtc para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio**. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo, SP, 2007.
- [11] ARAÚJO E.B. **Conjuntos de reativos liofilizados de compostos diaminoditiólicos para marcação com tecnécio-99m. Estudo farmacocinético e elaboração de modelos compartimentalizados dos respectivos complexos**. 1995. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo, SP, 1995.

- [12] SHOUPING, Z.; JIE, T.; GUORUI, Y.; CHENGHU, Q.; JINCHAO, F. Cone BeamMicro-CT System for Small Animal Imaging and Performance Evaluation. **International Journal of Biomedical Imaging**, V. 2009, p.9, Article ID 960573, 2009.
- [13] CAMILA, Z.M. **Estudo da produção do radiofármaco FLT- 18F em sistema automatizado _contribuição para validação do processo**. 2013. 132 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo, SP, 2013.
- [14] DANIELE, M.S. **Avaliação dos níveis de radiação ambiental no laboratório de tomografia por emissão de pósitrons acoplada a tomografia computadorizada, microPET/CT**. 2016. 85p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo, SP, 2016.
- [15] NATIONAL ELECTRICAL MANUFACTURERS ASSOCIATION. **Performance Measurements of Small Animal Positron Emission Tomographs**. NEMA Standards Publication NU 4-2008: Virginia, USA, 2008.
- [16] ALMEIDA, V.E.; SILVA, N.G.; FREIRE, A.C.F.; MONTEIRO, E.G.; BENEDETTI, S.; MURAMOTO, E.; FUKUMORI, N.T.O.; MATSUDA, M.M.N.; VASCONCELLOS, M.B.A. Método cintilográfico não invasivo para estudo de biodistribuição de radiofármacos. **Revista Brasileira de Física Médica**. v. 4, n 3, p. 53-56, 2011.
- [17] UNITED STATES PHARMACOPOEIA (**USP**). 39nd ed. Rockville, 2009.
- [18] DENIS-BACELAR, A.M.; CRONIN, S.E.; PIEVE, C.; PAUL, R.L.; ECCLES, S.A.; SPINKS, T.J.; HALL, A.; SOSABOWSKI, J.K.; MAREK, G.K.; FLUX, G.D. Pre-clinical quantitative imaging and mouse-specific dosimetry for ¹¹¹In-labelled radiotracers. **EJNMMI Research**. 2016.
- [19] ARAUJO, E. B.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M.T.; MENAGATTI, J. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. **Rev.Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 1 p. 1-12, 2008.
- [20] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC 263/2019**, Brasília: ANVISA, 2019.

- [21] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **ARCAL XV Produccion y control de Radiofarmacos: Manual de Buenas Practicas Radiofarmaceuticas**. Viena, 1998.
- [22] SAHA, G.B.; **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 5nd ed. Springer-Verlag; New York. 2004.
- [23] WADE, K; LINDA, A.J.; EUGENE, J.F. MicroPET/SPECT/CT Imaging of Small Animal Models of Disease. **The American Journal of pathology**, v. 182, n. 2, p. 319-324, 2013.
- [24] GERDEKOOHI, S.K.; VOSOUGHI, N., TANHA, K.; ASSADI, M. GHAFARIAN, P.; RAHMIM, A.; AY, M.R. Implementation of absolute quantification in small-animal SPECT imaging: Phantom and animal studies. **J Appl Clin Med Phys**. v.18, n. 4, p. 215–223, 2017.
- [25] CARVALHO, R.P.; OLIVEIRA, S.M.V. **APLICAÇÕES DA ENERGIA NUCLEAR NA SAÚDE**. São Paulo: ebook, 2017. Disponível em: <<http://www.cnen.gov.br/images/cnen/documentos/educativo/aplicacoes-energia-nuclear-na-saude.pdf>> Acesso em: 25 maio 2019.
- [26] CARVALHO, G.L.C. **Estudo da viabilidade da marcação com tecnécio-99m do anticorpo antimosina íntegro e seu fragmento: desenvolvimento de radiofármaco para avaliação cardíaca**. 2007.106f. (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo, SP, 2007.
- [27] OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.2, p. 151-165, 2006.
- [28] Zaid, H. **Quantitative Analysis in Nuclear Medicine Imaging**. Geneva, New York, 2006.
- [29] NOBREGA, A. I. **Tecnologia Radiológica e Diagnóstico por Imagem**. Vol 4. São Paulo: Difusão, 2006.
- [30] CASTRO J. A.; DIMENSTEIN, R. **Guia Prático em Medicina Nuclear**. São Paulo, 2002.
- [31] POWSNER, R.A.; **Essential Nuclear Medicine Physics**. 2 ed. Massachusetts. 2006.

- [32] BRUNKER CORPORATION. “**Brunker Albira Imaging System User Manual**, IB5438511 Rev. C12/12; 2012.
- [33] MEIKLE, S.R.; KENCH, P.; KASSIOU, M. BANATI, R.B. Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. **Phys Med Biol** v.50, p. 45-61, 2005.
- [34] **ARAGÓN, L.G.C.** Biocinética y Dosimetría de una Formulación Híbrida de ^{99m}Tc -BN y ^{99m}Tc -RGD₂ a partir de Imágenes Ópticas en un Modelo Murino. 2015. 106 p. Dissertação (Maestria en ciencias con especialidad en física médica) Universidad autónoma del estado de México, Toluca, EM, 2015.
- [35] FREY, E., HUMM, J., LJUNGBERG, M. Accuracy and Precision of Radioactivity Quantification in Nuclear Medicine Images. **Seminars in Nuclear Medicine**. V. 42: p. 208-218. 2012.
- [36] BARROS, P.P.; METELLO, L.F.; CAMOZZATO, TATIANE S.C.; VIEIRA, D.M.S. Optimization of OSEM parameters in myocardial perfusion imaging reconstruction as a function of body mass index: a clinical approach. **Radiol Bras**. v. 48, n. 5, p. 305-313. 2015.
- [37] ARAÚJO, J.G.V. **Reconstrução tomográfica de imagens SPECT a partir de poucos dados utilizando variação total**. 2017.86p. (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências de Computação e Matemática Computacional) - Instituto de Ciências Matemáticas e Computação - USP, São Paulo, SP.
- [38] VANHOVE, C.; DEFRISE, M.; BOSSUYT, A. LAHOUTTE, T. Improved quantification in single-pinhole and multiple-pinhole SPECT using micro-CT information. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. V. 36, n. 7, p. 1049–1063. 2009.
- [39] WU, C.; VAN, H. F.; VASTENHOUW, B D. R.A.; PAANS, A.M.; BEEKMAN, F.J. Absolute quantitative total-body small-animal SPECT with focusing pinholes. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. V. 37, n. 11, p. 2127–2135. 2010.
- [40] VANDEGHINSTE, B.; VAN, H.R.; VANHOVE, C.; DE VOS, F.; VANDENBERGHE, S.; STAELENS, S. Use of a ray-based

- reconstruction algorithm to accurately quantify preclinical microspect images. **Mol Imaging**. v. 13 p. 7290–2014. 2014
- [41] UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION (UNSCEAR); UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP): **Radiação: efeitos e fontes, Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente**. Vienna, Austria 2016.
- [42] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Radiation Biology: a handbook for teachers and students**. n 42, Vienna, 2016.
- [43] CAMPOS, R.F.; **Avaliação da contribuição da contaminação de superfícies do quarto terapêutico na medida da taxa de exposição de pacientes de radioiodoterapia**. 2015. p.33. TCC (Pós-Graduação em Proteção Radiológica e Segurança de Fontes Radioativas) – Instituto de Radioproteção e Dosimetria – CNEN. Rio de Janeiro, 2015.
- [44] JESUS, E.O.; JUNIOR, R.C. A Utilização de Filtros Gaussianos na Análise de Imagens Digitais. In: Proceeding Series of the Brazilian Society of Applied and Computational Mathematics, V. 3, n. 1, 2014. **XXXV CNMAC**. Natal-RN Brasil. 2015.
- [45] FIGUEIREDO, D.R.R. **Avaliação da viabilidade miocárdica pós-enfarte:gated-spect versus gated-pet**. 2013.85p. (Mestrado em Medicina Nuclear Área de Especialização em Tomografia por Emissão de Positrões). Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2013.
- [46] CHAVES, S.A.D. **Quantificação absoluta em SPECT cerebral**. 2014. p.103. (Mestrado em Física médica) – Departamento de Física e Astronomia - Universidade do Porto. Cidade do Porto.
- [47] SÁ, V.L. **Controle de qualidade de imagem em tomografia por emissão de pósitrons**. 2010. p.171. Tese (Doutorado) – Programa de Engenharia Nuclear, UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro. 2010.
- [48] OLIVEIRA, C.M.; SÁ, L.V.; SANTANA, P.C.; MAMEDE, M.; SILVA, T.A. Obtention and application of recovery coefficients in SUV values to quality controls in PET equipments. In: *Nuclear Energy for National Projects*, VI. 3, n.1, 2017. **INAC 2017**. Belo Horizonte-MG. 2017.

- [49]TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, M. A. R.
R. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos** - 10ª revisão - Rio de Janeiro - IRD/CNEN. 344p, 2014.
- [50] Torman VBL, Coster R, Riboldi J. Normality of variables: diagnosis methods and comparison of some nonparametric tests by simulation. **Rev HCPA**. 2012; V32:227-34.

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

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