UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIA
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E NUCLARES

NATALIA CASSIA DO ESPIRITO SANTO NASCIMENTO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS NÃO CLÍNICOS DO RADIOFÁRMACO FLUOROMISONIDAZOL ($[^{18}F]$FMISO)

Recife
2018

NATALIA CASSIA DO ESPIRITO SANTO NASCIMENTO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS NÃO CLÍNICOS DO RADIOFÁRMACO FLUOROMISONIDAZOL ([^{18}F]FMISO)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Aplicações de Radioisótopos na Indústria e Medicina.

Orientador: Profº. Dr. Fernando Roberto de Andrade Lima.

Coorientador: Profº. Dr. Mércia Liane de Oliveira.

Recife

2018

Catalogação na fonte

Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

N244s Nascimento, Natalia Cassia do Espirito Santo.

Síntese, caracterização e ensaios não clínicos do radiofármaco fluoromisonidazol ([^{18}F]FMISO). / Natalia Cassia do Espirito Santo Nascimento. - Recife, 2018.

161 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Roberto de Andrade Lima.

Coorientadora: Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2018.

Inclui referências, anexos e apêndice.

1. Engenharia Nuclear. 2. PET/CT. 3. Hipóxia. 4. Citotoxicidade. 5. Genotoxicidade. 6. Biodistribuição. 7. Estudo de estabilidade. I. Lima, Fernando Roberto de Andrade, orientador. II. Oliveira, Mércia Liane de, coorientadora. III. Título.

UFPE

CDD 621.48 (22. ed.) BDEN/2018-33

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS NÃO CLÍNICOS DO RADIOFÁRMACO FLUOROMISONIDAZOL ([^{18}F]FMISO)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 31/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profº. Dr. Roberto Fernado de Andrade Lima (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profº. Dr. Edvane Borges da Silva (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profº. Dr. Ana Cristina Lima Leite (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profº. Dr. Fabiana Farias de Lima Guimarães (Examinador Externo)

Centro Regional de Ciências Nucleares

_____

Profº. Dr. Juliana Batista da Silva (Examinador Externo)

Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

À minha maior fonte de inspiração
e amor, minha Mãe. Essa conquista
não é só minha, mas nossa!

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, à Deus por ter abençoado todos os dias da minha vida, por me guiar, iluminar, me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À minha mãe, fonte inesgotável de amor, por todo esforço dedicado à minha formação pessoal e profissional. Que muitas vezes se doou e renunciou aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Sempre me motivou e mostrou o quanto era importante estudar, mesmo ela não tendo a mesma oportunidade no passado. Eu não seria absolutamente nada sem você!

À minha irmã Vanessa, pelo amor incondicional, carinho, incentivo e por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas.

À minha Vó Severina pelas cinco orações diárias com os joelhos no chão para que Deus estivesse sempre presente em minha vida.

À minha família, tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram a agir com respeito, simplicidade dignidade, honestidade e amor ao próximo. Graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias conquistadas e alegrias divididas. Amo vocês!

Ao meu Marido, Ricardinho, pelo carinho, cuidado, companheirismo, principalmente nas noites que ficava esperando-me acabar de estudar pra dormir, que finge ser plateia para eu ensaiar e que me tranquiliza dizendo: “calma, tu já sabes!”

Ao Dr. Fernando Roberto de Andrade Lima, pela oportunidade de tê-lo como orientador.

Agradeço muito a Dra. Mércia Liane de Oliveira. Resumi-la a minha Coorientadora é muito pouco e tenho certeza de que ela sente a importância que teve e tem para mim não só na condução do trabalho, mas também como conselheira e até nas horas em que parece que nada está dando certo e que preciso não só de um consolo, mas de um colo. Tenho muito orgulho de citá-la como responsável pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência.

Às Doutoras Juliana Batista, Fabiana Farias e Simone Brandão pelas preciosas discussões e sugestões sempre pertinentes no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco e ao Centro Regional de Ciências Nucleares, pelo apoio institucional e oportunidades oferecidas.

Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear por fornecer todas as ferramentas necessárias para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial para toda equipe de profissionais e alunos da UPPR, por todo apoio e amizade a mim concedida. Me senti acolhida como se fizesse parte da equipe. Não tenho palavras nem bolo de rolo para agradecer a todos vocês!

Aos meus amigos do CRCN, por terem tornado o dia-a-dia tão prazeroso! Foi extremamente enriquecedor conhecer e conviver com cada um de vocês. Agradeço pela companhia diária, pelos ombros amigo e pela amizade. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos!

À CNEN pelo suporte financeiro.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, doaram um pouco de si para que eu pudesse estar aqui feliz para a conclusão deste trabalho se tornar possível.

Porque eu sou do tamanho do que vejo, e não do tamanho da minha altura. E o que vejo são os meus sonhos (PESSOA; FERNANDO, 2006, p. 163).

RESUMO

A hipóxia tecidual é o maior fator patológico nas isquemias cardíacas, acidentes vasculares cerebrais, diabetes e tecidos cancerosos. Em casos de câncer, a presença de células hipóxicas parece acelerar a progressão maligna e o potencial metastático do tumor, conduzindo à resistência a radioterapia e a quimioterapia. A detecção de tecidos hipóxicos pode servir como indicador do desenvolvimento da patologia ou indicador prognóstico do controle da doença. Atualmente, uma metodologia promissora para detecção de hipóxia é a utilização de radiofármacos PET. A tomografia por emissão de pósitron (PET) é a técnica de imagem mais sensível para detecção de hipóxia. O [18F]FMISO é um marcador para avaliar de forma não invasiva a hipóxia em tumores por meio da técnica PET/CT. O objetivo deste trabalho é sintetizar o [18F]FMISO, estabelecer metodologias de controle de qualidade e ensaios não clínicos da sua formulação. A síntese foi realizada utilizando o módulo de [18F]FDG (fluorodesoxiglicose) que foi adaptado para o [18F]FMISO. Foram testados cinco protocolos de síntese.Testes de controle de qualidade foram realizados para avaliar o produto, as metodologias de análise utilizadas e os requisitos especificados para esse radiofármaco foram estabelecidos com base na sua monografia. O estudo de estabilidade do radiofármaco foi realizado considerando a máxima concentração radioativa do radiofármaco, o ensaio foi realizado nas condições de temperatura igual 40 ± 2 °C e umidade de 75 ± 5% UR. Foram realizados os ensaios não clínicos de citotoxicidade, genotoxicidade *in vitro* com células de PBMCs de humanos. Dos cinco protocolos de síntese testados, o protocolo 3, com temperatura de síntese de 130 °C e temperatura de marcação de 85 °C, apresentou maior rendimento (~40%) sendo eleito como o melhor protocolo a ser utilizado para síntese do [^{18}F] FMISO. Estudos de biodistribuição e imagens microPET foram realizados em animais sadios. A síntese e o controle de qualidade do [18F]FMISO foram desenvolvidos em acordo com as BPF de Radiofármacos e o prazo de validade é de 7 horas após a síntese. O [18F]FMISO foi obtido em conformidade com critérios físico-químicos e microbiológicos preestabelecidos. O [18F]FMISO não apresentou sinais de citotoxicidade e genotoxicidade em concentrações ideais para ser administradas em paciente

nem em concentrações 10 vezes maiores, provando a segurança da formulação produzida. Em camundongos sadios, estudos de biodistribuição e imagem indicaram elevada captação pelo fígado, intestinos e rins. Esses achados mostram que a eliminação deste radiofármaco não é exclusivamente pela via renal, mas também através do sistema hepato-biliar devido à sua maior lipofilicidade. Os dados obtidos estão de acordo com os estudos disponíveis na literatura e comprovam o seu perfil de distribuição. Os resultados obtidos para o [18F]FMISO encorajam o uso deste radiofármaco em estudos futuros para avaliação a eficácia do radiofármaco produzido na marcação de tumores hipóxicos em camundongos. Para o [^{18}F] FMISO tornar-se disponível nos serviços de medicina nuclear do Brasil é necessário que haja o pedido de registro do radiofármaco junto a ANVISA, como preconiza a RDC 64. Com esses resultados apresentados, é fundamental que ainda sejam feitos os estudos clínicos em humanos.

Palavras-chave: PET/CT. Hipóxia. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Biodistribuição. Estudo de estabilidade.

ABSTRACT

Tissue hypoxia is the major pathological factor in cardiac ischemia, stroke, diabetes and cancerous tissues. In cases of cancer, the presence of hypoxic cells seems to accelerate the malignant progression and metastatic potential of the tumor, leading to resistance to radiotherapy and chemotherapy. Detection of hypoxic tissues may serve as an indicator of disease development or prognostic indicator of disease control. Currently, a promising methodology for detecting hypoxia is the use of PET radiopharmaceuticals. Positron emission tomography (PET) is the most sensitive imaging technique for detecting hypoxia. The PET radiotracer [^{18}F]Fluoromisonidazole ([^{18}F]FMISO) is a nitroimidazole derivative labelled with fluorine-18 that selectively binds to hypoxic cells. It has been shown to be a suitable PET tracer for imaging hypoxia in tumors as well as in noncancerous tissues. Synthesis was performed using the [18F]FDG (fluorodeoxyglucose) module which was adapted for [18F] FMISO. Five synthesis protocols were tested. Quality control tests were performed to evaluate the product, the analysis methodologies used and the requirements specified for this radiopharmaceutical were established based on its monograph. The radiopharmaceutical stability study was performed considering the maximum radioactive concentration of the radiopharmaceutical using temperature equal to 40 ± 2 °C and humidity of 75 ± 5% RH. Non-clinical tests were performed cytotoxicity, in vitro genotoxicity tests with human PBMC cells. Of the five synthesis protocols tested, protocol 3, with a synthesis temperature of 130 °C and a labeling temperature of 85 °C, showed a higher yield (~ 40%) and was chosen as the best protocol to be used for [18F]FMISO. Biodistribution studies and microPET images were performed in healthy animals. The synthesis and quality control of [18F]FMISO were developed according to the GMP of Radiopharmaceuticals and the expiration date is 7 hours after the synthesis. [18F]FMISO was obtained in accordance with pre-established physical-chemical and microbiological criterion. [18F]FMISO showed no signs of cytotoxicity and genotoxicity at concentrations ideal for administration in a patient or in 10-fold higher concentrations, proving the safety of the formulation produced. In healthy mice, biodistribution and imaging studies indicated elevated uptake by the liver, intestines and kidneys. These results show that the elimination of this radiopharmaceutical is not exclusively through the renal route, but also through the hepato-biliary system due to its greater lipophilicity. The data obtained agree with the studies available in the literature and prove their distribution profile. The results obtained for [18F]FMISO encourage the use of this radiopharmaceutical in future studies to evaluate the efficacy of the radiopharmaceutical produced in the labeling of hypoxic tumors in mice. For [18F]FMISO to become available in the services of nuclear medicine in Brazil, it is necessary to request the registration of the radiopharmaceutical from ANVISA, recommends by RDC 64. With these results presented, it is fundamental that studies are still done clinical trials in humans.

Keywords: PET/CT. Hypoxia. Cytotoxicity. Genotoxicity. Biodistribution. Stability study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Metabolismo ceular de hipóxia intratumoral	25
Figura 2 –	Representação esquemática do crescimento tumoral e suas implicações na privação de oxigênio e nutrientes às células que constituem o tumor formando uma região em condições de hipóxia (região enegrecida)	27
Figura 3 –	Hipóxia de um tumor sólido mostrando a diminuição do aporte de oxigênio em relação a distância capilar	28
Figura 4 -	Esquema do equipamento híbrido de PET/CT	33
Figura 5 –	Um pósitron e um elétron aniquilam-se produzindo dois fótons 511 keV que viajam em direções opostas (A). O fóton de 511 keV registrado pelo detector circular de raios gama na câmara PET (B) e a imagem reconstruída(C)	35
Figura 6 –	Estrutura química da molécula de [18F] FDG	42
Figura 7 –	Radiofármcos para imagem de hipóxia	44
Figura 8 –	Estrutura química do [^{18}F] FMISO 1-(2-Nitro-imidazolil)-3-[^{18}F]fluoro-2-propanol ou 1H-1-(3-[^{18}F]fluoro-2-hidroxipropil)-2-nitroimidazol	45
Figura 9 –	Esquema representativo do mecanismo intracelular de compostos marcados com nitroimidazol	46
Figura 10 –	Reação química para síntese do [18F] FMISO	48
Figura 11 –	Esquema do Kit utilizado para síntese do [18F] FMISO.	64
Figura 12 –	Montagem do cassete para síntese do [18F] FMISO	64
Figura 13 –	Planilha informatizada com algumas variáveis envolvidas na síntese do [18F] FMISO	65
Figura 14 –	Síntese química do [18F] FMISO a partir do precursor NITTP	66
Figura 15 –	Determinação do pH do [18F]FMISO por meio de fitas teste e micropHmetro	69
Figura 16 –	Calibrador de dose Capintec®	70

Figura 17 -	Analisador Multicanal	70
Figura 18 -	Cromatógrafo a líquidos de alta eficiência e coluna C18	71
Figura 19 -	Cromatógrafo a gás Perkin Elmer Clarus® 580	72
Figura 20 -	Endosafe PTS	73
Figura 21 -	Meios de cultura líquidos	74
Figura 22 -	Filtro Millex-GS, marca Merck Millipore	75
Figura 23 -	Kit para avaliação de citotoxicidade ApoTox-Glo™ Triplex Assay, Promega	85
Figura 24 -	Biologia do ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade	86
Figura 25 -	Clivagem da Caspase 3/7 do substrato luminogênico contendo a sequência DEVD	86
Figura 26 -	Esquema para ensaio com ApoTox-Glo Triplex Assay	87
Figura 27 -	GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader, Promega	88
Figura 28 -	Esquema de incubação das culturas de PBMC tratadas com [^{18}F] FMISO	89
Figura 29 -	MicroPET da GE Healthcare® –Modelo LabPET4 do CDTN	92
Figura 30 -	Planilha de dados para monitoração da atividade do Flúor 18	94
Figura 31 -	Avaliação da determinação do padrão (FMISO)	102
Figura 32 -	Cromatograma da avaliaçãoda determinação do padrão FMISO na matriz em presenção dos contaminantes Desmetilimidazol e NITTP	102
Figura 33 -	Representação gráfica das áreas obtidas em função da concentração do FMISO	104
Figura 34 -	Ensaio para avaliação viabilidadade celular em função da variação das concentrações de [^{18}F] FMISO	114
Figura 36 -	Avaliação da taxa de apoptose pela ativação da caspase 3/7 variando as concentrações de [^{18}F] FMISO	116
Figura 37 -	Índice de apoptose das células das culturas teste tratadas com [^{18}F] FMISO (0.1x, 1x, 10x; concentrações que	116

	equivalem a 0.1, 1 e 10 vezes a concentração máxima administrada em pacientes por procedimentos clínicos), controle negativo e controles positivos que induz efeitos citotóxicos	
Figura 38 -	Ensaio do efeito citotóxico em função da variação das concentrações de [^{18}F] FMISO frente a cultura de células de PBMCs de humanos	117
Figura 39 -	Ensaio do efeito citotóxico nas células das culturas teste tratadas com [^{18}F] FMISO (0.1x, 1x, 10x; concentrações que equivalem a 0.1, 1 e 10 vezes a concentração máxima administrada em pacientes por procedimentos clínicos), controle negativo e controles positivos que induz efeitos citotóxicos	117
Figura 40 -	Frequência de micronúcleos em células PBMC humanas após 48 horas de cultivo nas diferentes concentrações do radiofármaco [18F]FMISO	121
Figura 41 -	Perfil de captação do [18F] FMISO por tempo em cada órgão e no sangue	123
Figura 42 -	Curva de cinética no sangue	124
Figura 43 -	Perfil de biodistribuição do [^{18}F] FMISO por imagens de microPET	125
Figura 44 -	Perfil da captação do [^{18}F] FMISO em camundongos Swiss sadios	126
Figura 45 -	Gráfico referente à comparação do perfil de biodistribuição [^{18}F] FMISO em camundongos sadios 120 minutos após injeção utilizando técnicas distintas	127
Figura 46 -	Imagem comparativa da captação do [^{18}F] FMISO dos estudos de Cheng, 2006 (A) e o perfil de captação do [^{18}F] FMISO produzido no CDTN/CNEN (B)	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais emissores de pósitrons e suas características físicas	36
Tabela 2 –	Moléculas radiomarcadas registradas na base de dados da National Institute of Health e utilizada na rotina clínica	41
Tabela 3 –	Classificação dos métodos analíticos, segundo sua finalidade	54
Tabela 4 –	Ensaios necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade	55
Tabela 5 –	Sumário das modalidades e condições para realização dos estudos de estabilidade	57
Tabela 6 –	Metodologias para ensaio de controle de qualidade do [18F] FMISO	68
Tabela 7 –	Soluções padrão de FMISO para avaliação da linearidade	77
Tabela 8 –	Alterações do gradiente da corrida do CLAE	81
Tabela 9 –	Cronograma usado para realização do estudo de estabilidade do [18F] FMISO, contendo os intervalos de tempo e as referidas análises conduzidas	83
Tabela 10 –	Especificações do radiofármaco [18F] FMISO conforme Farmacopeia Europeia 8º edição (Eur. Pharm., 2016)	84
Tabela 11 –	Protocolo utilizado para aquisição e reconstrução das imagens PET	93
Tabela 12 -	Resultados do controle de qualidade de [18F] FMISO da síntese padrão ABX	95
Tabela 13 –	Resultados do controle de qualidade de [18F] FMISO com temperatura de marcação igual a 85 °C	96
Tabela 14 -	Resultados do controle de qualidade de [18F] FMISO com temperatura de marcação igual a 130 °C.	96
Tabela 15 –	Resultados do controle de qualidade de [18F] FMISO da síntese com Ky em substituição do TBA	97
Tabela 16 -	Resultados do controle de qualidade de [18F] FMISO da síntese com 7 ml de etanol 5%	98

Tabela 17 –	Modificações realizadas nos protocolos de síntese	99
Tabela 18 -	Resultados obtidos para amostras de FMISO 10 ppm	100
Tabela 19 –	Resultados obtidos para padrão de FMISO em presença de desmetilimidazol e NITTP (10 ppm)	100
Tabela 20 -	Resultados obtidos para amostras de NITTP em presença de desmetilimidazol e FMISO (10 ppm)	101
Tabela 21 –	Resultados obtidos para amostras de desmetilimidazol na presença de NITTP e FMISO (10 ppm)	101
Tabela 22 -	Resultados da avaliação da linearidade para [18F] FMISO: Dados originais	103
Tabela 23 –	Resultados da avaliação da repetibilidade para o padrão de FMISO	105
Tabela 24 -	Avaliação da precisão intermediária pra FMISO dia 2/ Analista 2	106
Tabela 25 –	Avaliação da precisão intermediária pra FMISO dia 3/ Analista 3	106
Tabela 26 -	Resultados do teste de recuperação para determinação da exatidão	108
Tabela 27 -	Tratamento de dados recuperados	108
Tabela 28 -	Resultados global da análise do parâmetro de robustez para o FMISO devido à variação de fluxo	109
Tabela 29 -	Concentração da fase móvel	109
Tabela 30 -	Resultados global da análise do parâmetro de robustez para o FMISO devido à variação de gradiente	110
Tabela 31 -	Resultados dos ensaios para três lotes de 18FMISO produzidos em diferentes intervalos de tempo para estudo de estabililidade	111
Tabela 32 -	Frequência de micronúcleos em células de PBMC após 48h de cultivo celular com o radiofármaco [18F] FMISO em diferentes concentrações	120
Tabela 33 -	Biodistribuição de [18F] FMISO em camundongos sadios em função do tempo	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABX	*Advanced Biochemical Compounds*
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apaf1	Fator de ativação de apoptose 1
aq	Aquoso
ATP	Adenosina trifosfato
BPF	Boas Práticas de Fabricação
Ca^{2+}	Íon de Cálcio
CCD	Cromatografia de camada delgada
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CRCN	Centro Regional de Ciências Nucleares
CT	Tomografia computadorizada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMA	*European Medicines Agency*
EP	Farmacopeia Europeia
EU	Unidade de Endotoxina
FDA	*Food and Drug Administration*
[^{18}F]FDG	Fluordesoxiglicose
[^{18}F]FMISO	Fluoromisonidazol
FOV	*field of view*
HIF-1	Fator de indução da hipóxia 1
Ky	Kriptofix
LAIA	Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais
LOR	*Line of Response*
MBq	Mega Bequerel
MeV	Mega elétron-volt
MLEM	*Maximum Likelihood Expectation Maximization*
mmHg	Milímetro de mercúrio
mSv	Mili sievert
NaF	Fluoreto de sódio
NITTP	3-(2-Nitroimidazol-1-il)-2-O-tetrahidropiranil-1-O-toluenosulfonilpropanediol
NO_2	Grupo nitro
O_2	Oxigênio
PBMC	Célula Mononuclear de Sangue Periférico
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PET/CT	Tomografia por emissão de pósitrons/Tomografia computadorizada
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROI	Região de interesse
SUS	Sistema Único de Saúde
SUV	*Standard Uptake Value*

$T_{1/2}$	Tempo de meia vida
TBA	Tetrabutilamônio
TOF	*time of flight*
TSB	Caldo Triptona de Soja
USP	Farmacopeia Americana

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	20
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	24
2.1	Hipóxia	24
2.2	Hipóxia tumoral	26
2.3	Métodos de detecção de hipóxia	30
2.4	Tomografia por emissão de pósitron (PET).....	33
2.5	Marcação de moléculas com 18F.....	37
2.6	Radiofármacos.....	39
2.7	Características e síntese do fluoromisonidasol ([18F]FMISO).....	44
2.8	Controle de qualidade de rdiofármacos marcados com flúor 18.....	49
2.9	Validação de metodologias analíticas	52
2.10	Estudos de estabilidade.....	55
2.11	Legislação e registro para radiofármacos PET.....	58
2.12	Ensaios não clínicos para radiofármaco PET.....	59
2.12.1	Ensaios *in vitro*: citotoxicidade e genotoxicidade	60
2.12.2	Ensaios com animais: Estudos de biodistribuição *ex vivo* e por imagem PET.....	61
3	**METODOLOGIA**	63
3.1	Síntese do [18F] FMISO	63
3.2	Controle da qualidade do [18F] FMISO.....	67
3.2.1	Características físicas.....	68
3.2.2	Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH).....	69
3.2.3	Identidade e Pureza Radionuclídica	69
3.2.4	Pureza radioquímica e química.....	71
3.2.5	Solventes residuais	72
3.2.6	Determinação de Tetrabutilamônio (TBA) ou Kryptofix (Ky).....	73
3.2.7	Ensaio de endotoxina bacteriana	73

3.2.8 Ensaio de esterilidade 74
3.2.9 Teste de membrana filtrante 75
3.3 Validação da metodologia para análise da pureza química e radioquímica do [18F]FMISO..... 75
3.4 Ensaios de estabilidade do [18F] FMISO 81
3.5 Ensaios *in vitro, ex vivo* e *in vivo* 84
3.5.1 Estudos *in vitro*: citotoxicidade e genotoxicidade 84
3.5.2 Estudos *in vivo*: Biodistribuição e imagens PET..... 89
4 RESULTADOS 94
4.1 Síntese e controle de qualidade do [18F] FMISO..... 94
4.2 Validação da metodologia para análise da pureza química e radioquímica 99
4.3 Estudos de estabilidade do [18F] FMISO 110
4.4 Ensaios *in vitro, ex vivo* e *in vivo* 114
4.4.1 Estudos in vitro: citotoxicidade e genotoxicidade 114
4.4.2 Estudos e e in vivo: Biodistribuição e imagens PET..... 122
5 CONCLUSÃO 129
REFERÊNCIAS 130
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA 145
ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA 150
APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS 151

1 INTRODUÇÃO

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), o câncer é a segunda causa de morte em todo o mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015 (WHO, 2018). Sendo assim, é natural que os esforços para encontrar formas mais eficazes de enfrentar a doença sejam grandes. As frentes mais importantes nessa batalha são o aprimoramento do diagnóstico, novas modalidades de tratamento e medidas preventivas aplicáveis à população (BOGLIOLLO, 2011).

No câncer, as células se proliferam mais rapidamente do que os vasos sanguíneos, tornando o ambiente hostil devido à diminuição da irrigação e consequente deficiência de oxigênio. Tumores sólidos possuem, geralmente, um centro necrótico resultante da insuficiência vascular, bem como várias camadas de células hipóxicas adjacentes à região necrótica. Os tumores hipóxicos que apresentam uma grande heterogeneidade vascular possuem graus de agressividade mais elevados que os tumores ricamente vascularizados (LOPCI *et al*., 2014).

A hipóxia em tumores sólidos parece acelerar a progressão maligna e o potencial metastático do tumor primário conduzindo à resistência à radioterapia e quimioterapia (LEE *et al*., 2007; LOPCI *et al*., 2014). Esses tumores estão sendo caracterizados como um problema de saúde pública em todo o mundo devido à alta morbidade e mortalidade dos pacientes. Dada às específicas características, uma variedade de técnicas para detectar e quantificar oxigênio nos tecidos tem sido desenvolvida ao longo dos anos. No entanto, todas as metodologias existentes possuem limitações, não sendo suficientemente sensíveis ou confiáveis para uso clínico (LEE *et al*., 2007).

Sendo assim, surge a necessidade de uma metodologia que torne possível quantificar e caracterizar a hipóxia tumoral, de modo que haja uma adequação às estratégias terapêuticas, determinando a forma e o tipo de terapia mais apropriados para aquele tumor. Uma metodologia promissora é por meio do uso de radiofármacos específicos, sendo um método não invasivo e que pode mapear diferentes alterações fisiológicas associadas à hipóxia (NANDY *et al*., 2010).

A tomografia por emissão de pósitron (PET) é uma tecnologia utilizada na medicina nuclear que permite a visualização da interação entre moléculas marcadas com um radionuclídeo e alvos biológicos. É uma técnica de imagem funcional não invasiva com excelente resolução, alta sensibilidade, apresentando uma vantagem importante de proporcionar informações quantitativas de processos fisiológicos, bioquímicos e farmacológicos em indivíduos vivos utilizando concentrações picomolares de radiofármaco (HANDLEY *et al*., 2011).

Atualmente, o [^{18}F] FDG (18F-Fluordesoxiglicose) é o radiofármaco PET mais utilizado para diagnósticos de câncer, uma vez que células tumorais possuírem altas taxas de metabolismo glicolítico. Entretanto, células de tumores sólidos, onde a hipóxia é comum, verifica-se a captação diminuída deste radiofármaco, visto que a diminuição nas concentrações de oxigênio influencia no metabolismo celular. Assim, devido às limitações do [^{18}F] FDG, é importante o desenvolvimento de um radiofármaco específico para a detecção e quantificação de áreas de hipóxia tumoral (HANDLEY *et al*., 2011).

O [^{18}F] FMISO (18F-Fluoromisonidazol) é um marcador *in vivo* para avaliar de forma não invasiva a hipóxia em malignidades humanas e em pacientes com isquemia miocárdica. Ele desempenha um papel importante na predição do estado de oxigenação em tumores durante a radioterapia (DU *et al.*, 2012; TANG *et al*., 2005) e possibilita a obtenção de imagens cinéticas por meio da técnica PET/CT (*Positron Emission Tomography/Computed Tomography)* (RASEY *et al*., 1996). Este radiofármaco tem sido utilizado em estudos clínicos e não-clínicos fornecendo imagens para localização e quantificação da hipóxia tecidual, revelando em nível molecular *in vivo* com alta sensibilidade e especificidade (TONG *et al*., 2016).

No Brasil, o mercado regulamentado de radiofármacos é relativamente novo, especialmente para os agentes de radiodiagnóstico emissores de pósitrons. Na prática, apenas em 2006 foi promulgada a Emenda Constitucional 49 excluindo do monopólio da união a produção, comercialização e utilização de radioisótopos de meia-vida curta, para uso médico, agrícola e industrial (PLANALTO, 2006). A regulamentação sanitária foi definitivamente lançada com a promulgação das RDC 63 e RDC 64 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2009 (ANVISA, 2009a, 2009b).

O [^{18}F]FMISO ainda não é produzido comercialmente e, para que esse fármaco torne-se disponível para uso médico, é necessário que sua fabricação atenda aos requisitos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em acordo às resoluções RDC 64/2009 e RDC 63/2010, que estabelecem os requisitos de boas práticas de fabricação (BPF) e para o registro de radiofármacos no Brasil. Para isso é essencial elaborar e executar um protocolo de validação do processo produtivo e do controle de qualidade, documentando a capacidade de reproduzir todos os procedimentos com a finalidade e segurança requeridos pela ANVISA (BRASIL, 2009; BRASIL, 2010).

Cumpre ressaltar que, embora o [^{18}F] FMISO seja apresentado como medicamento inovador no Brasil, ele é usado em rotinas radiodiagnósticas fora do país pelo menos desde 1984, quando foi, conforme dados apresentados pelo *Micad Research Team* (2005), proposto como agente para radiodiagnóstico de tumores onde ocorra deficiência de oxigênio.

Nesse contexto, a disponibilização do [^{18}F] FMISO surge como uma solução promissora como agente marcador de hipóxia e permitiria melhorar a oferta destes produtos no mercado nacional, levando à incorporação de outros radiofármacos no SUS. A partir disso, tecnologias disponíveis e utilizadas no mundo poderiam ser incorporadas no nosso sistema de saúde, o que poderá proporcionar à população novas opções para diagnóstico e estadiamento do câncer.

Com o intuito de fornecer mais dados sobre a segurança e eficácia do produto para que este seja disponibilizado como um marcador de hipóxia, o objetivo deste trabalho foi sintetizar o [^{18}F] FMISO, estabelecer metodologias de controle de qualidade e ensaios não clínicos da sua formulação, o que permitirá gerar conhecimento a cerca do produto produzido.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Sintetizar o [^{18}F] FMISO a partir da adaptação do módulo automático para [^{18}F] FDG Tracerlab $MX_{FDG.}$
- ✓ Desenvolver metodologias para realização dos testes de controle de qualidade físico-químico e microbiológico do [^{18}F] FMISO;

- ✓ Validar a metodologia para avaliação da pureza química e radioquímica do [^{18}F] FMISO utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

- ✓ Realizar estudo de estabilidade a fim de determinar o prazo de validade do medicamento;

- ✓ Realizar estudos não clínicos do [^{18}F] FMISO a fim de avaliar seu perfil de segurança por meio de ensaios de avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade.

- ✓ Avaliar o perfil de biodistribuição do [^{18}F] FMISO em camundongos sadios;

- ✓ Realizar estudos de imagem microPET com [^{18}F] FMISO em camundongos sadios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipóxia

A hipóxia é uma condição patológica que se desenvolve nos tecidos vivos quando o fornecimento de oxigênio (O_2) não é suficiente para suprimir as necessidades metabólicas das células, tecidos e órgãos. Pode ocorrer por diminuição do aporte sanguíneo (isquemia) ou por diminuição da taxa de transporte de oxigênio pelo sangue, decorrente da anemia ou ar rarefeito (KUMAR, 2007). Caracteriza-se pela presença de valores de pressão parcial de oxigênio (pO_2) inferiores a 10 mmHg, enquanto nos tecidos normais, se encontram valores de pO_2 de 24-66 mmHg. A disponibilidade reduzida de O_2 afeta as funções biológicas dos órgãos, tecidos ou células, sendo responsável por mudanças fisiológicas, na região do corpo, onde se encontra localizada (LAPA *et al*, 2015).

Vários fatores são reconhecidos como causas de hipóxia, como:

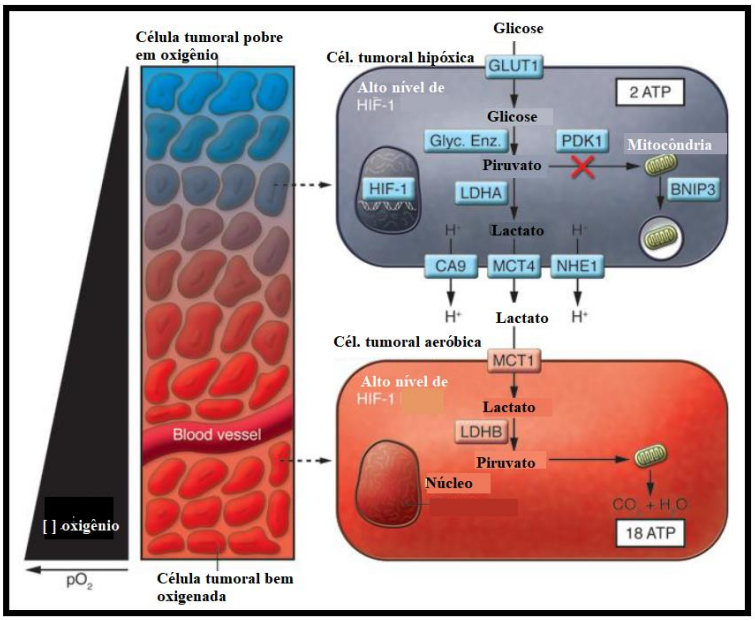
1) Baixa pressão parcial de O_2 no sangue arterial, devido a doenças pulmonares ou alta altitude (hipóxia hipoxêmica), por exemplo;
2) Capacidade reduzida do sangue transportar O_2 como resultado da anemia (hipóxia anêmica), da formação de metahemoglobina ou da intoxicação por monóxido de carbono;
3) Redução generalizada ou local da perfusão tecidual (hipóxia circulatória ou sistêmica); e
4) Incapacidade das células de usar O_2 devido à intoxicação, como no caso de envenenamento por cianeto, por exemplo (hipóxia histotóxica ou citotóxica).

Em termos bioquímicos, a hipóxia é definida como a redução do transporte de elétrons limitado pelo O_2. Nas situações de hipóxia, o piruvato formado ao final da glicólise não é oxidado para a formação da forma química da acetil-CoA para que, assim, seja dada sequência ao processo de respiração celular (Ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa). Consequentemente, a etapa da fosforilação oxidativa, na qual há a produção de ATP (adenosina trifosfato), deixa de ocorrer e o processo de formação de ATP passa a depender exclusivamente da respiração anaeróbica (fermentação). Isso está associado aos altos níveis

de consumo de glicose característica dos tecidos tumorais e é necessária para manter o suprimento de precussores das vias anabólicas (lipídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos etc) quanto dos níveis celulares da produção de ATP dentro do ambiente de estresse. Nesta segunda rota, a enzima lactato desidrogenase reduz o piruvato à lactato (Figura 1) fornecendo uma quantidade bem inferior de ATP se comparado à fosforilação oxidativa (NELSON *et al.*, 2014; KNOWLES & HARRIS, 2001).

Os tumores são caracterizados por gradientes dos níveis de O_2, baseado na distância entre as células tumorais e os vasos sanguíneos. No esquema, células tumorais ao redor do vaso sanguíneo estão bem oxigenadas, enquanto células tumorais mais distantes do vaso estão pouco oxigenadas e expressam altos níveis do fator induzido pela hipóxia (HIF-1). HIF-1induz a expressão de proteínas que aumentam a captação de glicose; conversão de glicose a piruvato; geração de lactato e H+; e efluxo desta molécula para fora da célula. Dois moles de lactato são produzidos para cada mol de glicose consumida pela célula hipóxica. O aumento no metabolismo glicolítico está associado com a distribuição reduzida do substrato para a mitocôndria (através da PDK1) e reduzida a massa mitocondrial (KUMAR, 2007). O esquema representativo do modelo de hipóxia intratumoral está representado na Figura 1.

Figura 1 – Metabolismo celular em condições de hipóxia intratumoral.



Fonte: KUMAR, 2007.

O acúmulo de ácido lático, concomitante à diminuição de ATP disponível, acarreta diversas alterações intracelulares que podem resultar em morte celular. Essas alterações consistem no aumento dos níveis intracelular do cálcio (Ca^{2+}), que leva à tumefação celular, depleção das reservas de glicogênio com acúmulo de ácido lático e consequente diminuição do pH, redução da síntese de proteínas, e perda da contratilidade. Nesta fase, os danos celulares são reversíveis com o restauro do aporte de oxigênio, no entanto, sua persistência pode resultar na morte celular, seja por apoptose ou por necrose (KUMAR, 2007; NELSON *et al*., 2014).

Fisiopatologicamente, a hipóxia é definida como uma disponibilidade de oxigênio reduzida e/ou a diminuição das pressões parciais abaixo dos limites críticos, resultando no fornecimento insuficiente desse gás aos órgãos, tecidos e células. A prevalência de áreas hipóxicas é uma característica de tumores sólidos e das respectivas metástases e tem sido descrito em uma ampla gama de malignidades humanas, incluindo câncer de pulmão, de mama, colo do útero, cabeça e pescoço, próstata, sarcomas e melanomas (CHENG *et al*., 2016; KILIAN, *et al*., 2016).

2.2 Hipóxia tumoral

O oxigênio (O_2) é um elemento químico essencial no metabolismo e na cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias das células vivas. Qualquer desequilíbrio nos níveis normais de O_2 nos tecidos provoca modificações no metabolismo celular conduzindo a alterações fisiopatológicas (BOGLIOLO, 2011).

A deficiência em oxigênio é um estresse central do microambiente tumoral que surge como consequência da expansão dos tumores sólidos pela proliferação exacerbada das células cancerosas e baixo suprimento vascular. Nos tumores, as zonas hipóxicas são resultantes, inicialmente, de isquemias provocadas pela irrigação ineficiente ou insuficiente de microvasos que atendem ao tecido tumoral, devido à diminuição no fornecimento de oxigênio às células. Desta forma, células localizadas mais no centro dos tumores dependem exclusivamente da via anaeróbica de produção de ATP e assim consomem mais glicose do que células de tecidos sadios, tendo como produto final o ácido lático. Determinadas

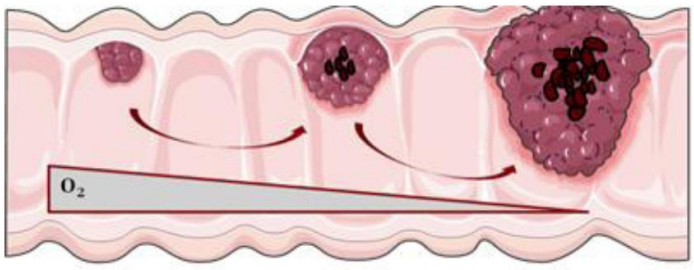
células tumorais também aumentam a produção de enzimas glicolíticas, que podem estimular a via glicolítica (AVNI *et al*. 2011).

Diversas causas produzem obstrução vascular que leva à redução do fluxo sanguíneo (oligoemia, com hipóxia) ou a sua parada (isquemia, com anóxia); dependendo da intensidade e da duração do fenômeno e da suscetibilidade à privação de oxigênio e nutrientes, as células degeneram ou morrem (BOGLIOLO, 2011). Nos tumores, a isquemia ocorre em função do crescimento rápido da massa tumoral e pela diminuição ou obstrução dos vasos sanguíneos que o irrigam interiormente (SAR *et al*., 2009; HANDLEY *et al*., 2001).

Ao contrário do que popularmente é pensado, a estrutura de um tumor não é, apenas, um aglomerado de células em constante proliferação. As células neoplásicas compreendem menos da metade do volume total do tumor. Os vasos sanguíneos que o entrelaçam ocupam no máximo 10% do volume tumoral. O espaço restante é preenchido por matriz rica em colágeno que envolve as células neoplásicas e pode separá-las da vascularização, expondo-as gradualmente a uma menor quantidade de oxigênio (BOGLIOLO, 2011; SAR *et al*., 2009).

De acordo com Thomlinson e Gray (1955), nos tumores sólidos, durante a proliferação celular, as novas células formadas empurram as existentes para a periferia, expondo-as gradualmente a uma menor quantidade de nutrientes e oxigênio de acordo com o representado na Figura 2 (THOMLINSON& GRAY, 1955).

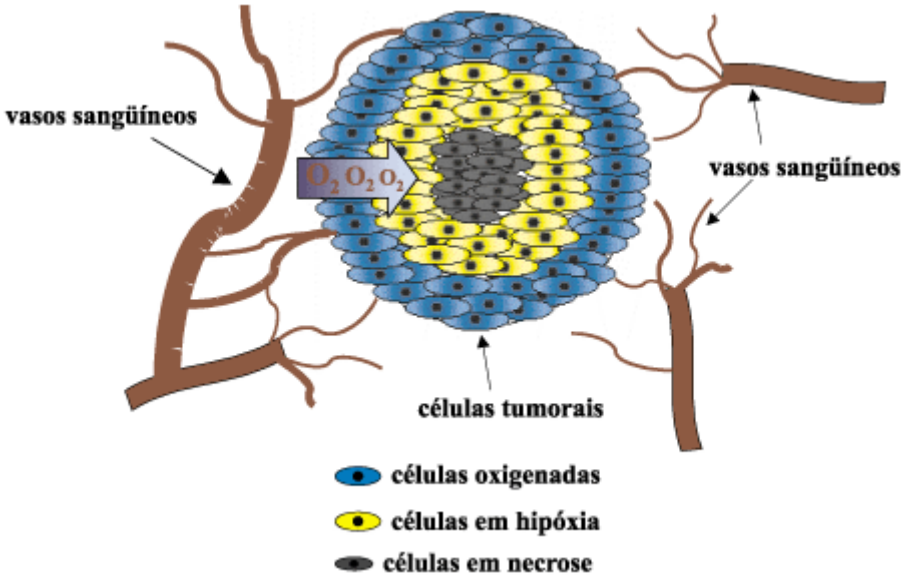
Figura 2 - Representação esquemática do crescimento tumoral e suas implicações na privação de oxigênio e nutrientes às células que constituem o tumor formando uma região em condições de hipóxia (região enegrecida).



Fonte: Bogliollo, 2011.

O abastecimento sanguíneo do tumor é realizado por meio da vascularização existente na região. Durante seu crescimento, alguns dos vasos sanguíneos pré-existentes são obstruídos ou comprimidos. Posteriormente, pequenos vasos sanguíneos começam a surgir (neovascularização) e estes se ramificam excessivamente, se tornam tortuosos e seguem em direções imprevisíveis. Consequentemente, algumas áreas do tumor são bem irrigadas, enquanto outras têm pouca ou nenhuma vascularização, o que faz com que o aporte de oxigênio e nutrientes para algumas regiões do tumor seja muito menos eficiente do que nos tecidos normais. As células localizadas próximas aos vasos sanguíneos (periferia do tumor) são células bem oxigenadas. As células localizadas no centro do tumor e, portanto, distantes da vascularização, são células anóxicas e necróticas. Finalmente, as células existentes entre estas duas regiões são conhecidas como células em hipóxia, pois estão localizadas em uma região de baixa concentração de oxigênio (Figura 3) (VAUPEL, 2004; OLIVEIRA, 2002).

Figura 3 - Hipóxia de um tumor sólido mostrando a diminuição do aporte de oxigênio em relação a distância capilar.



Fonte: Oliveira, 2002.

Para todos os organismos que precisam de oxigênio (O_2), as alterações da sua pressão parcial representam um estímulo fisiológico importante. As pressões parciais intracelulares de oxigênio são mantidas num intervalo muito estreito de valores, no sentido

de minimizar o risco de dano oxidativo por excesso de oxigênio (hiperóxia) ou o risco de falência metabólica por insuficiência de oxigênio (hipóxia) (HATANO *et al.*, 2012; RAJENDRA, *et al.*, 2004). Contudo, algumas alterações no aporte de oxigênio nos tecidos são compatíveis com a vida, como as que são observadas durante um exercício exagerado ou na exposição a altas altitudes (HÄGG & WENNSTRÖM, 2005).

A diminuição no nível de oxigênio possui um forte impacto em nível de biologia da célula tumoral. Em particular, a baixa concentração de oxigênio dos tecidos tumorais coopera para a progressão do tumor, o que faz a resposta da célula tumoral à hipóxia ser de extrema importância para a compreensão da recidiva e prognóstico tumoral (LEE *et al.*, 2007). Nos tecidos cancerosos, a diminuição da concentração de oxigênio pode provocar a parada do ciclo celular, apoptose, diminuição do metabolismo anaeróbio, alteração na remodelação dos tecidos, alterações na eventual adaptação ao estresse, angiogênese tumoral, diferenciação celular e necrose (PAPANDREOU *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a hipóxia pode induzir alterações proteômicas que permitem que as células tumorais se adaptem facilmente e sejam capazes de superar a privação de oxigênio e de nutrientes, sobrevivendo ao ambiente hostil. Esta adaptação é acompanhada de angiogênese, aumento da glicólise e inibição de apoptose (VAUPEL, 2004). Ao contrário das células normais, as células tumorais superam a dependência de fatores de crescimento por meio da aquisição de alterações genéticas que modificam funcionalmente as vias de sinalização dependentes de receptores, influenciando e/ou permitindo a entrada e o metabolismo de nutrientes que promovem a sobrevivência celular e sustentam e/ou estimulam o crescimento celular (AXELSON *et al.*, 2005; VANDER HEIDEN *et al.*, 2009).

Geneticamente, quando as células tumorais se tornam hipóxicas há uma alteração na expressão gênica. Esse fenômeno possui um papel vital na regulação da angiogênese, invasão do sistema imune, instabilidade genética, metástase e invasão, metabolismo, resistência ao tratamento e manutenção de células tronco. A alteração oncogênica das células aumenta sua susceptibilidade à apoptose que foi induzida pela hipóxia. O nível de p53 em células aumenta sob condições de hipóxia, induzindo apoptose pela via que envolve Apaf-1 (*Apoptotic protease activating fator 1*) e caspase-9 como efetores *downstream*.

Contudo, o fenômeno da hipóxia também inicia outras vias de apoptose que são independentes da p53 envolvendo HIF-1, genes da família BCL-2 e outros genes ainda

desconhecido. Alterações induzidas na proteômica pela hipóxia induzem a parada do ciclo celular, diferenciação, apoptose e necrose e podem explicar recorrências tardias, micro metástases e crescimento retardado das grandes massas tumorais (TOYONAGA *et al*., 2017).

As células cancerosas se adaptam ao microambiente hipóxico, principalmente, por meio da ativação dos HIFs (WONG, 2012). Esses fatores são responsáveis por regular a expressão dos genes que mediam as respostas adaptativas. Toda a cascata transcricional do HIF-1 está envolvida em um processo inflamatório, já que, com o aumento da massa sólida do tumor acontece uma diminuição no aporte de oxigênio e dos nutrientes às células levando-as à necrose, que por sua vez libera mediadores pró-inflamatórios (MAMLOUK & WIELOCKX, 2012; ROHWER et al. 2012).

A hipóxia é um dos fatores mais importantes para expressão da malignidade dos tumores, influenciando vários aspectos da biologia tumoral, inclusive suas respostas à terapia: radioresistência e quimioresistência sendo associada a um pior prognóstico (TOYONAGA *et al*., 2017). Saber quais são as características morfológicas das lesões tumorais não é suficiente. É, também, importante conhecer e perceber o que se passa no microambiente tumoral. A detecção de tecidos viáveis, mas hipóxicos, pode servir como indicador prodômico do desenvolvimento da doença (como por exemplo, diabetes) ou um indicador prognóstico do controle da doença (como no acidente vascular cerebral) (LAPA *et al.*, 2015; WIEBE *et al.*, 2002). Desta forma, a detecção e quantificação dos níveis de oxigênio em tumores tornam-se fundamentais, pois têm implicações nas respostas terapêuticas, determinando o modo e tipo de terapia mais adequados, como o uso de radiação e/ou agentes quimioterápicos (TANG *et al*., 2005).

2.3 Métodos de detecção de hipóxia

Uma variedade de técnicas para detectar e quantificar oxigênio nos tecidos tem sido desenvolvida ao longo dos anos. No entanto, ainda não existem metodologias validadas suficientemente sensíveis ou confiáveis para uso clínico (LEE *et al*, 2007). Até meados da década de 1980, a única forma de se medir ou determinar regiões de hipóxia em tumores era por meio de métodos invasivos, que traziam resultados tardios não sendo assim,

correspondentes fiéis no momento do tratamento (TRÉDAN *et al*, 2007; NANDY *et al*, 2010; HANDLEY *et al*, 2011).

O uso de eletrodos sensíveis a oxigênio (sondas de Eppendorf) tem sido considerado o método padrão para medição da pressão parcial de oxigênio nos tumores. Contudo, há uma variação nas medições da pressão parcial e os resultados são dependentes de variáveis, como o laboratório onde se realiza o exame. Além disso, a técnica não consegue medir a oxigenação em determinadas microrregiões, entre outras desvantagens. Os eletrodos de Eppendorf constituem uma técnica de medição extracelular e, caso se pretenda informação intracelular, outros métodos terão que ser utilizados (SHETTY et al., 2012; ABRANTES *et al.*, 2009).

As técnicas imuno-histoquímicas constituem um método que consegue distinguir o grau de hipóxia, tal como a fração de células tumorais neste estado. Contudo, a técnica é limitada quanto à identificação das células hipóxicas, além de ser uma técnica invasiva. Como alternativa, surge a coloração imuno-histoquímica, que é uma técnica intracelular com resolução espacial. Neste método é usada coloração de marcadores de hipóxia endógenos (produtos de genes) e exógenos (químicos, fármacos), que têm a vantagem de fornecer informação da distribuição espacial da hipóxia nos tumores a um nível microrregional. Em comparação à sonda de Eppendorf, esta técnica fornece informação essencial do ambiente intracelular a um nível individual, enquanto à sonda de Eppendorf dá informação relativamente a um volume de 500 células (ABRANTES *et al.*, 2009).

Os métodos referidos acima são de caráter informativo, porém invasivos, assim como o método de análise dos danos no DNA (eletroforese do DNA extraído por biópsia). Idealmente, o método para detecção da hipóxia deve ser rápido, não invasivo, econômico, capaz de determinar a extensão da área hipóxica com boa resolução espacial e temporal e sem efeitos secundários. Até o momento, não foi desenvolvida uma técnica que atendesse a todos os requisitos, uma vez que todos os métodos desenvolvidos necessitam de equipamento especializado, apresentam caráter invasivo, são dependentes de biópsia e podem apresentar-se deficientes devido à heterogeneidade e à distribuição da hipóxia no tumor (TRÉDAN *et al*, 2007; NANDY *et al*, 2010; HANDLEY *et al*, 2011).

Hoje em dia, é possível obter este tipo de informações por meio do uso de várias técnicas de imaginologia médica funcional. Nestas técnicas recorre-se a biomarcadores que permitem identificar e mapear diferentes comportamentos funcionais. A partir desse

conhecimento poderão ser delineadas estratégias terapêuticas personalizadas e mais adequadas à situação clínica de cada doente (LAPA *et al.*, 2015).

A Medicina Nuclear, por meio do uso de moléculas marcadas envolvidas nas vias intracelulares influenciadas pela hipóxia ou com impacto em outras vias metabólicas, pode fornecer informações sobre a concentração de oxigênio *in vivo* no tumor (BRITZ-CUNNINGHAM & ADELSTEIN, 2003; GAGEL *et al*., 2006; HOLLAND *et al.*, 2009). A PET/CT com radiofármacos marcadores de hipóxia apresenta-se como uma alternativa aos métodos invasivos que implicam a punção com eletrodos polarográficos para identificação de locais de hipóxia tumoral. É um método imaginológico não invasivo que tem ainda, como vantagem, permitir a distinção entre a hipóxia associada às células tumorais viáveis da hipóxia associada à necrose. Esta é uma informação importante que não é possível obter por meio dos sistemas de eletrodos polarográficos (LAPA *et al.*, 2015).

Vários radiotraçadores como, o [^{18}F]FMISO, [^{18}F]FAZA, [^{124}I]IAZA, [^{64}Cu]ATSM, [^{68}Ga]DOTA-NI, entre outros, vem sendo desenvolvidos e outros estão em fase de desenvolvimento com o objetivo de serem utilizados na avaliação não invasiva do microambiente tumoral, em particular da hipóxia, característica dos tumores sólidos e considerada um fator determinante na resistência ao tratamento e progressão da doença (SHETTY et al., 2012; KUMAR *et al*., 2002; KROHN *et al*., 2008; IMAM, 2010).

Atualmente, uma metodologia promissora para detecção de hipóxia é por meio do uso de radiofármacos específicos, utilizando a tomografia por emissão de pósitrons (PET). É a técnica de imagem mais sensível para detecção de hipóxia e apresenta características satisfatórias para seu uso como (SHETTY et al., 2012; DU *et al*, 2012):

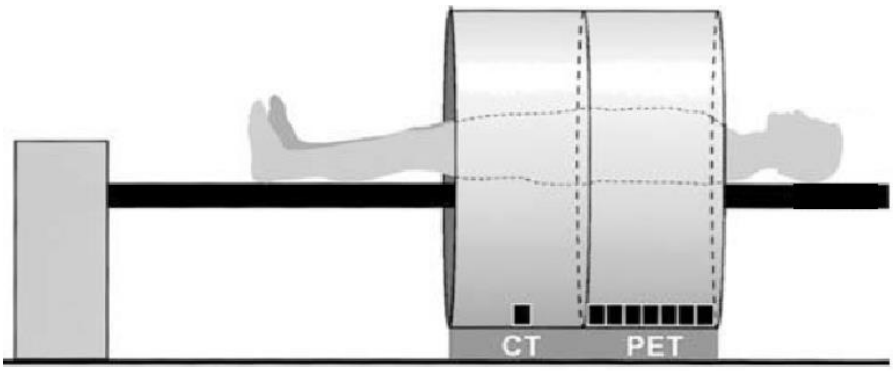
- É um método não invasivo;
- Fornece informações sobre a heterogeneidade do tumor;
- É possível fazer medições repetidas;
- É possível mapear diferentes alterações fisiológicas associadas à hipóxia;
- Possui fácil acesso a região de interesse; e
- Possibilita a quantificação da concentração do radiofármaco no órgão ou região de interesse.

2.4 Tomografia por Emissão de Pósitron (PET)

A PET é uma modalidade de imagem funcional desenvolvida na década de 1970 e desde então se tornou indispensável nas avaliações das funções biológicas em nível molecular. Essa tecnologia é utilizada na medicina nuclear e permite a visualização da interação entre moléculas marcadas com um radionuclídeo, traçadores e alvos biológicos. É uma técnica de imagem funcional não invasiva com excelente resolução, alta sensibilidade e tem a vantagem importante de proporcionar informações quantitativas de processos fisiológicos, bioquímicos e farmacológicos em indivíduos vivos utilizando concentrações picomolares de radiofármaco (SONNI, *et al*., 2018; LI; CONTI, 2010).

Após o uso inicial apenas como PET, o primeiro scanner híbrido PET acoplado à um tomógrafo computadorizado (PET/CT) foi introduzido e utilizado clinicamente em 2000. Os scanners PET/CT híbridos (Figura 4) associam a informação molecular da PET à informação tomodensitométrica da CT. Sua importante capacidade de fornecer mapas de atenuação de tecidos para correção das imagens de PET, melhora significativamente a precisão diagnóstica. O PET/CT híbrido permite, no mesmo exame, a obtenção de imagens com informação anátomo-molecular (SONNI, *et al*., 2018).

Figura 4 - Esquema do equipamento híbrido de PET/CT.



Fonte: SAHA, 2010.

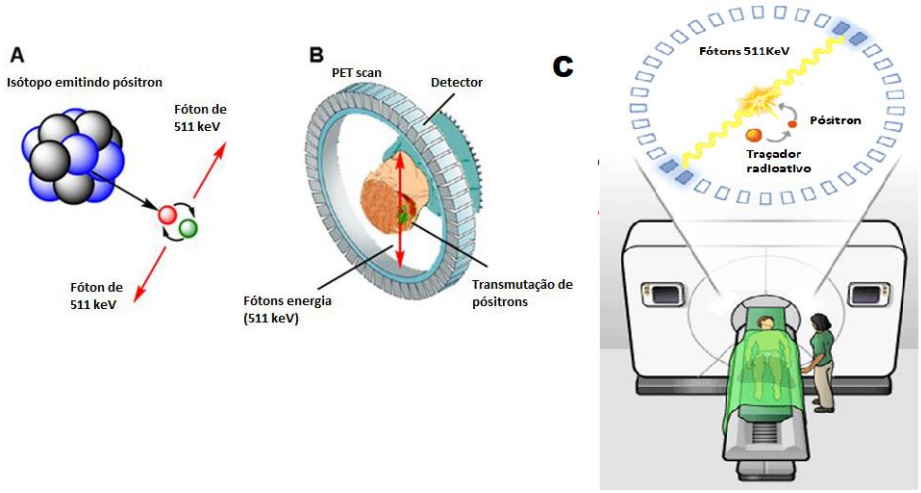
Nas últimas décadas, a PET tem emergido como um poderoso método de diagnóstico clínico para mapeamento de processos patológicos *in vivo*, permitindo, assim, a investigação em tempo real de uma doença e, consequentemente, o estudo de uma terapia,

antes que as alterações anatômicas sejam visíveis. Os progressos dessa tecnologia são múltiplos, quer na componente PET (*hardware*, *software*, métodos de reconstrução, tecnologia *time of flight* – TOF), quer na componente CT e, também, no desenvolvimento de métodos de compensação e correção de movimentos respiratórios e cardíacos. Atualmente, a PET pode ser aplicada para as seguintes finalidades (SLOMKA et al., 2016; WENICK; ARSVOLD, 2004):

- Identificação de doenças malignas;
- Identificação de sítios tumorais para planejamento de biópsia ou cirurgia;
- Avaliação da resposta do tumor à quimioterapia e radioterapia;
- Detecção precoce de uma patologia;
- Avaliação das vias moleculares como atividade metabólica, fornecimento de oxigênio, síntese de DNA e proteínas, proliferação celular, ligação de receptores e expressão gênica;
- Avaliação da funcionalidade dos tecidos e alterações estruturais; e
- Delineamento de novas drogas e estudo da farmacodinâmica e farmacocinética.

A principal característica da PET é que os fármacos utilizados são marcados com radionuclídeos emissores de pósitrons e ao serem injetados no paciente decaem emitindo partículas de carga positiva (pósitron, β^+) que, depois que viajar numa distância muito curta no tecido circundante, irão colidir com elétrons presentes no meio dando origem a eventos de aniquilação (LI; CONTI, 2010). O fenômeno de aniquilação resulta em dois fótons de alta energia, 511 keV, em direções diametralmente opostas (180° ± 0,3°) (SAHA, 2010), conforme representado na Figura 5, sendo a energia dos fótons resultantes da aniquilação equivalente às massas de repouso do elétron e do pósitron.

Figura 5 - Um pósitron e um elétron aniquilam-se produzindo dois fótons 511 keV que viajam em direções opostas (A). O fóton de 511 keV registrado pelo detector circular de raios gama na câmara PET (B) e a imagem sendo reconstruída (C).



Fonte: Adaptada, LI; CONTI, 2010.

O deslocamento em sentidos opostos dos fótons provenientes da aniquilação dos pósitrons permite que, quando estes são detectados, seja definida uma linha na qual ocorreu a referida aniquilação, chamada linha de resposta (*line of response* – LOR). O equipamento PET está programado para identificar os pares de fótons detectados simultaneamente, por detectores diametralmente opostos. Este mecanismo de aquisição baseado na detecção coincidente assume que os pares de fótons provêm da mesma aniquilação, pelo que a linha traçada por estes permite localizar as moléculas do radiofármaco no interior do paciente (DUET et al., 2007).

A distância percorrida pelo pósitron na matéria, antes da aniquilação, é diferente para cada radionuclídeo e é dependente da energia do pósitron. A energia do pósitron afeta a qualidade da imagem, quanto maior a energia, maior será a perda da resolução espacial (SAHA, 2010; LI; CONTI, 2010; KOWALKI; FALENS, 2004). Na Tabela 1 estão listados os radionuclídeos PET mais utilizados com suas energias e características mais importantes.

Tabela 1 - Principais emissores de pósitrons e suas características físicas

Radionuclídeo	Meia-vida ($T_{1/2}$)	Modo de decaimento (%)	Energia do fóton gama (keV)	Abundância (%)	Principal método de produção
^{14}C	20,4 min	β^+ (100)	511	200	^{10}B (d, n) ^{11}C ^{14}N (p, α) ^{11}C
^{13}N	10 min	β^+ (100)	511	200	^{12}C (d, n) ^{13}N ^{16}O (p, α) ^{13}N ^{13}C (p, n) ^{13}N
^{15}O	2 min	β^+ (100)	511	200	^{14}N (d, n) ^{15}O ^{15}N (p, n) ^{15}O
^{18}F	110 min	β^+ (97)	511	194	^{18}O (p, n) ^{18}F
^{62}Zn	9,3 h	β^+ (8) CE (92)	41 550	25 56	^{63}Cu (p, 2n) ^{62}Zn
^{62}Cu	9,7 min	β^+ (97) CE (3)	511	194	Gerador ^{62}Zn -^{62}Cu
^{68}Ga	68 min	β^+ (89) CE (11)	511	178	Gerador ^{68}Ge -^{68}Ga ^{68}Zn (p, n)^{68}Ga
^{68}Ge	270,8 d	CE (100)	-	-	^{66}Zn (α, 2n) ^{68}Ge
^{82}Rb	75 s	β^+ (85) CE (5)	511 777	190 13,4	$^{98}Mo \rightarrow ^{82}Sr \rightarrow ^{82}Rb$

Fonte: SAHA, 2010.

Um grande número de eventos de aniquilação é detectado por uma matriz de detectores de cintilação, separados por 180°, que transmitem um sinal coincidente quando são atingidos simultaneamente. A energia do fóton que é absorvida pelos detectores é reemitida como luz visível e detectada por tubos fotomultiplicadores. O sinal de luz é convertido em corrente elétrica, que é proporcional à energia incidente. Os eventos registrados são reconstruídos em imagem tridimensional reproduzindo a distribuição

espacial da fonte radioativa no indivíduo estudado por meio da utilização de hardwares e softwares para aquisição de dados, reconstrução de imagens e manipulação (LI; CONTI, 2010).

Os emissores de pósitrons de meia vida curta, como ^{11}C, ^{13}N e ^{15}O são os marcadores mais utilizados, já que esses elementos são constituintes de biomoléculas e sua incorporação em moléculas farmacêuticas permitiria manter as mesmas propriedades físico-químicas e bioquímicas do composto "não radiomarcado", evitando assim, modificações indesejáveis no comportamento da droga (SAHA, 2010). Porém, a utilização de radiofármacos que possuam esses radionuclídeos na formulação é limitada a locais próximos onde são produzidos, por possuírem o tempo de meia vida muito curto (20, 9 e 2 minutos) para distribuição e comercialização. Entre os radionuclídeos disponíveis para procedimentos de marcação, o flúor-18 é uma alternativa para tornar a aplicação de radiofármacos mais acessível abrangendo pacientes de locais mais distantes, devido ao seu tempo de meia vida ser mais longo que os demais e por causa da sua ampla disponibillidade e a possibilidade da sua síntese automatizada (VALLABHAJOSULA, 2017).

2.5 Marcação de moléculas com ^{18}F

Nos últimos anos, muitos traçadores PET foram propostos e avaliados em estudos não-clínicos e clínicos, permitindo caracterizar a biologia do tumor mais apropriadamente para o manejo clínico do paciente com câncer. Várias publicações revisaram exaustivamente as vantagens e limitações de muitos radiofármacos PET (VALLABHAJOSULA *et al.*, 2011; DUNPHY *et al.*, 2009; LOPCI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2009).

Atualmente, o radionuclídeo mais utilizado para marcar moléculas utilizado na PET/CT é o fluor-18. Seu tempo de meia vida é relativamente longo (109,8 minutos), se comparado aos demais radionuclídeos PET (^{64}Cu (12 horas) e ^{124}I (4 dias)). Isso permite um tempo maior de síntese química de marcação de moléculas, além desse tempo de meia vida mais longo permitir investigações de processos biológicos com duração maior que 100 minutos sejam realizadas. O ^{18}F apresenta baixa energia de pósitrons (β máximo de 0,635 MeV) com curto alcance nos tecidos, o que gera imagens com maior resolução. Ele pode ser sintetizado com alta atividade específica, produzido em grandes quantidades em

cíclotron e apresenta síntese com alto rendimento na marcação dos traçadores (VALLABHAJOSULA, 2017; JACOBSON e CHEN, 2010; ELL, 2006).

Apesar do ^{18}F não ser constituinte do organismo vivo, ele é capaz de incorporar as moléculas orgânicas como um substituinte para o hidrogênio, hidroxila ou algum outro grupo funcional. Mais uma vantagem do ^{18}F na marcação de moléculas biológicas é o bloqueio das vias metabólicas. A molécula radiomarcada funciona no organismo como uma molécula normal até certo ponto de sua via metabólica, onde as reações de metabolização são interrompidas e ficam acumuladas no organismo, permitindo uma melhor detecção pela PET (KÄMÄRÄINEN, 2007).

A produção do ^{18}F é feita a partir dos isótopos ^{20}Ne ou ^{18}O, podendo ser formulado em duas formas químicas: na forma de $^{18}F_2$, estando positivamente carregado (eletrofílico), ou na forma $^{18}F^-$, rico em elétrons (nucleofílico). Dessa forma, a marcação das moléculas biológicas com ^{18}F pode ocorrer tanto por reação eletrofílica quanto por reação nucleofílica (JACOBSON e CHEN, 2010; KÄMÄRÄINEN, 2007).

Nas reações eletrofílicas, o $[^{18}F]F_2$ que é muito reativo, será ligado a um reagente rico em elétrons, como, por exemplo, os alquenos. Para melhorar o controle da reação, pode ser adicionado um moderador, que irá controlar a alta reatividade do $[^{18}F]F_2$.

Nos casos das reações nucleofílicas, uma molécula precursora reage com $^{18}F^-$ para produzir um composto radiomarcado. O $^{18}F^-$ é produzido a partir do bombardeamento da água enriquecida, sendo obtido em solução aquosa. No entanto, o fluoreto na sua forma aquosa é pouco reativo e requer algumas manipulações simples, mas importantes. $[^{18}F]\ F^-$ (aq) deve ser dissolvido em um solvente orgânico e transferido para uma forma quimicamente mais reativa para obter tempos de reação mais razoáveis e melhores rendimentos de síntese. Geralmente, são adicionados ao $^{18}F^-$ um contra-íon, na forma de carbonato de potássio, e o aminopoliéter (Kriptofix 222 ou TBA-HCO_3), antes do processo de secagem. As reações de marcação são realizadas com a adição de um solvente orgânico aprótico dipolar à solução, tais como dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrila ou N,N-dimetilformamida (DMF). As radiofluorações nucleofílicas são utilizadas em reações de substituição alifática e aromática (JACOBSON e CHEN, 2010; KÄMÄRÄINEN, 2007).

2.6 Radiofármacos

Os radiofármacos são substâncias formadas pela junção de um ou mais átomos radioativos e um substrato como propriedades bioquímicas (que irá determinar a distribuição e o comportamento fisiológico do radiofármaco). Não possuem ação farmacológica e, dependendo da sua forma farmacêutica, tipo de radiação emitida, e valor da sua radioatividade, têm como finalidade diagnosticar patologias e disfunções do organismo e/ou também serem aplicados nas terapias de doenças, por exemplo, em tumores radiossensíveis (ANVISA, 2015; SAHA, 2010; BRYAN, 2009).

Esses traçadores podem ser formados apenas por um único radionuclídeo (^{133}Xe) ou por um íon ($^{125}I^-$). Pode ser um pequeno composto orgânico ou inorgânico ([^{18}F]fluordesoxiglicose e [^{99m}Tc]$(CNR)_6^+$), ou ainda biomoléculas complexas (proteínas radiomarcadas) (BRYAN, 2009).

Os radiofármacos devem possuir afinidade por determinados órgãos ou tecidos tumorais de interesse. É grande a busca por radiofármacos com baixa captação em órgãos não alvo, pois a captação nesses órgãos atrapalha o diagnóstico mascarando possíveis detalhes, além de submeter, desnecessariamente, partes do corpo à exposição à radiação. O radiofármaco deve ainda apresentar rápida eliminação daquilo que não foi captado, de modo a aumentar o contraste da imagem e reduzir a dose de radiação absorvida pelo paciente (DECRISTOFORO, 2012). Um radiofármaco deve ser de fácil produção, custo razoável e facilmente acessível aos serviços de medicina nuclear.

A utilização de radiofármacos na medicina nuclear faz com que as técnicas de imagem sejam extremamente vantajosas frente a outras modalidades diagnósticas como a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a ultrassonografia, baseadas nas alterações estruturais dos órgãos e tecidos. Os procedimentos de medicina nuclear permitem o mapeamento da função fisiológica e da atividade metabólica, permitindo diagnosticar precocemente muitas doenças, além de possibilitar avaliações e estudos de um mesmo órgão ou sistema em seus aspectos tanto macroscópicos quanto moleculares (ROBILLOTA, 2006).

A PET/CT tem já indicações bem estabelecidas no estudo de diversos tipos de tumores. No entanto, outras indicações, baseadas na utilização de radiofármacos traçadores de comportamentos moleculares, continuam a ser exploradas. Novas abordagens considerando o conceito Teranóstico (utilização mista, direcionada para diagnóstico/terapêutica) estão sendo desenvolvidas, tendo como base a utilização de radiofármacos dirigidos especificamente para receptores tumorais alvo (DIMITRAKOPOULOU-STRAUSS, 2015). Também a própria interpretação da imagem molecular se encontra em processo de evolução, valorizando-se, cada vez mais, a importância da extração de parâmetros quantitativos da imagem médica. A avaliação radiômica assume que as imagens médicas não são apenas representações visuais, mas que também podem disponibilizar importantes dados quantitativos com interesse diagnóstico e valor prognóstico (HATT *et al*., 2016).

Nos últimos anos o interesse pela imaginologia molecular tem aumentado, principalmente em oncologia, assistindo-se ao desenvolvimento de múltiplos radiofármacos PET (RICE *et al*., 2011). Encontram-se registradas na base de dados da NIH (*National Institutes of Health* – USA) cerca de 800 moléculas radiomarcadas para fins imaginológicos, referidas como tendo aplicação clínica (ou potencial aplicação), muitas delas correspondendo a radiofármacos PET (VALLABHAJOSULA *et al*, 2011.). Alguns são já utilizados por rotina (Tabela 2) e muitos outros estão em processo de desenvolvimento para aplicação clínica.

Tabela 2 – Moléculas radiomarcadas registradas na base de dados da *National Institute of Health* e utilizada na rotina clínica.

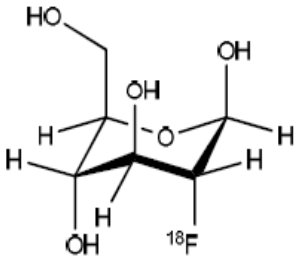
Molécula	Radiofármaco PET	Aplicação clínica
Fluoreto de sódio	[^{18}F]NaF	Traçador de atividades osteoblásticas
Desoxiglicose	[^{18}F]FDG	Traçador de atividade glicolítica
Acetato Dopamina Metionina	[^{11}C]Acetato [^{18}F]FDOPA [^{11}C]Metionina	Traçador de síntese proteica
Misonidazol Azomicina arabinosido	[^{18}F]FMISO [^{18}F]FAZA	Marcadores de hipóxia
Timidina Colina Colina	[^{18}F]Timidina [^{18}F]Colina [^{11}C]Colina	Marcadores de proliferação celular
Octapeptídeo Estradiol	[^{68}Ga]DOTA(TOC/NOC/TATE) [^{18}F]FES	Marcadores de alvos tumorais específicos

No Brasil, a produção e comercialização de radiofármacos, durante muitos anos foram monopólio da União, mas devido ao grande avanço da medicina nuclear, o uso de radiofármacos de meia vida muito curta e dificuldade na logística de envio do produto para as clínicas e hospitais mais distantes dos centros produtores, foi necessário, em 2006, flexibilizar a produção e comercialização de radioisótopos de meia-vida curta (igual ou

inferior a duas horas) para iniciativa privada criar novas unidades produtoras de radiofármacos no país (FERREIRA *et al*., 2011).

Dos vários radiofármacos PET usados na medicina nuclear a [^{18}F] fluordesoxiglicose ([^{18}F] FDG) (Figura 6) é o radiofármaco mais utilizado (correspondendo a cerca de 90% dos estudos PET/CT realizados) e tem muitas aplicações clínicas, como na oncologia, cardiologia e neurologia (COENEN *et al*., 2010). Entretanto, o [^{18}F] FDG não é um radiofármaco específico para avaliação da malignidade, já que diferentes processos bioquímicos envolvem a utilização de glicose (por exemplo, células inflamatórias e macrófagos acumulam maiores quantidades de FDG do que as células tumorais). Muitos radiofármacos PET estão sendo estudados e validados para o uso no diagnóstico clínico. Alguns aminoácidos como a [^{11}C] metionina e [^{18}F] fluoretiltirosina têm grande potencial para imagens de tumores cerebrais e no planejamento exato da radioterapia (LANGEN *et al.*, 2006; SINGHAL *et al.*, 2008; GROSSU, 2010). Radiofármacos análogos da colina como a [^{11}C] colina e a [^{18}F] fluormetilcolina são amplamente utilizados nas imagens de câncer de próstata (GROSSU, 2010).

Figura 6 – Estrutura química da molécula de [^{18}F] FDG.



Desde a introdução da [^{18}F] FDG vários outros radiofármacos PET vêm sendo desenvolvidos. A introdução progressiva de novos radiofármacos PET, permitindo a caracterização molecular da entidade oncológica de cada doente, contribui para o desenvolvimento de uma medicina mais personalizada e com melhores resultados individuais (COENEN *et al*., 2010).

Nos casos dos tumores sólidos, por exemplo, são muitas vezes, associados à deficiência no fornecimento de oxigênio, resultando na condição de hipóxia. Isto representa

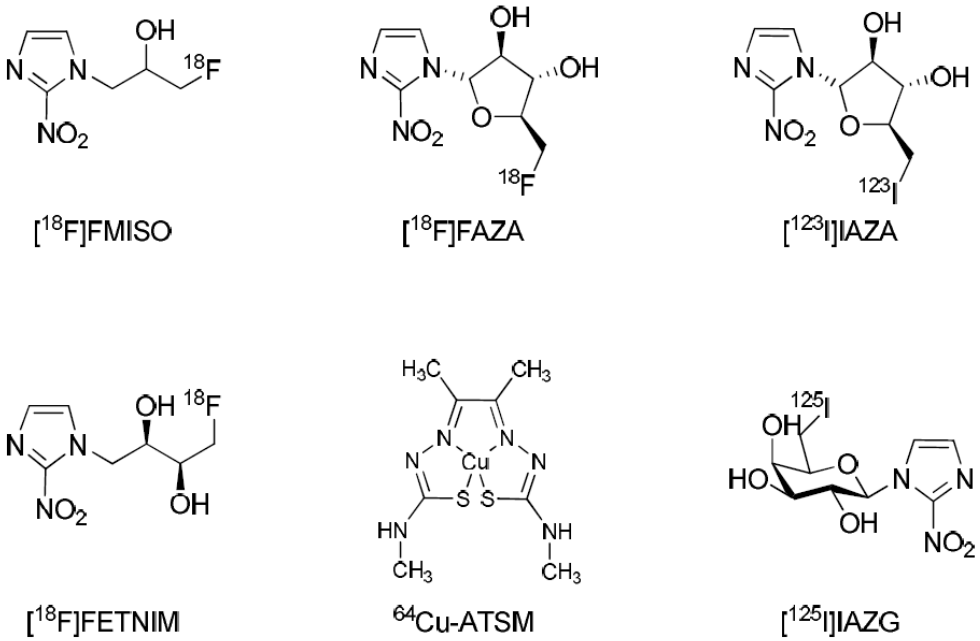
um fator limitante durante o tratamento de pacientes com câncer, uma vez que diminui a eficácia da radioterapia e da quimioterapia. Assim, radiotraçadores altamente específicos para estes tipos de tumores são essenciais para caracterização desta condição tecidual nos tecidos com baixa pressão parcial de O_2 (HAUBNER, 2010).

Para detecção de hipóxia, o traçador deve apresentar algumas características importantes como, ser específico para hipóxia; sua captação deve refletir valores intracelulares de pO_2 entre 0-10 mmHg, independentemente do tipo e grau do tumor; e deve atravessar facilmente membrana do capilar sanguíneo, preferencialmente sem o uso dos sistemas de transporte de membrana, pois poderiam dificultar a interpretação dos resultados das imagens (SHETTY *et al*., 2012).

Embora nenhum dos radiotraçadores, atualmente disponíveis, apresentem todas as propriedades de um agente de imagem de hipóxia ideal, a seleção é baseada, em grande parte, no tipo de tumor, facilidade de síntese e disponibilidade de radioisótopo. O 2-nitroimidazol, que havia sido avaliado terapeuticamente como um radiossensibilizador de citotoxina de células em hipóxia, vem sendo estudado extensivamente em diversos modelos experimentais. Ele é reduzido sob condições de baixa concentração de oxigênio, consequentemente acumulando-se em locais de hipóxia, tem sido uma molécula atraente por muitos anos para imagens PET ou fins de imagem SPECT após a marcação com diferentes radioisótopos (SHETTY *et al*., 2012).

Compostos marcados radioativamente com 2-nitroimidazol (Figura 7) são radiofármacos PET específicos utilizados para a detecção de hipóxia. O seu papel como marcadores de hipóxia foi proposto pela primeira vez em 1979 por Chapman e colaboradores (CHAPMAN, 1979; CHAMPMAN *et al*., 1981).

Figura 7 - Radiofármacos para imagem de hipóxia



Os derivados nitroimidazólicos são presos seletivamente no interior das células hipóxicas por meio de mecanismos bioquímicos, os quais estão relacionados à concentração de oxigênio. Sob condições de hipóxia, o composto 2-nitroimidazol sofre um processo de redução, que conduz à um intermediário altamente reativo por esse composto e liga-se covalentemente a macromoléculas intracelulares acumulando-se no interior da célula hipóxica (SHETTY, 2012; DU *et al.*, 2012). Além disso, a presença de um radionuclídeo emissor de pósitrons na estrutura do derivado nitroimidazólico permite a quantificação da concentração de oxigênio por meio de imagens PET e, finalmente, a reconstrução da imagem dos tecidos afetados pela hipóxia. O [^{18}F] Fluoromisonidazol ([^{18}F] FMISO) é o traçador radioativo mais comumente utilizado para detectar hipóxia tumoral por PET (DU *et al.*, 2012).

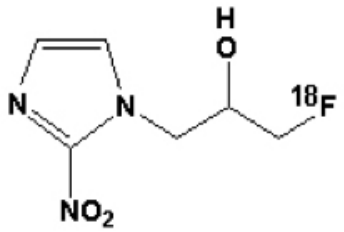
2.7 Características e síntese do Fluoromisonidazol ([^{18}F] FMISO)

Flúor-18 marcado com misonidazol (Figura 10), 1H-1-(3-[18F]fluor-2-hidroxipropil)-2-nitroimidazol, ou [^{18}F] FMISO, é uma molécula pequena, solúvel em água, com peso molecular de 189,14 Daltons. É um agente radiomarcador utilizado para

avaliação quantitativa de hipóxia tumoral por meio da PET (TOYONAGA *et al*., 2016; TANG *et al*., 2005).

O [^{18}F] FMISO (Figura 8) foi proposto como traçador da determinação de hipóxia tecidual *in vivo* em 1986, e o primeiro a ser testado clinicamente. Desde então, tornou-se o derivado nitroimidazólico mais utilizado para esta técnica e é considerado o padrão-ouro para este fim (LAPA *et al.,* 2015; TANG, 2005; DUBOIS, 2004). O [^{18}F] FMISO se liga seletivamente a células hipóxicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Ele é comumente usado na oncologia para avaliar quantitativamente tumores hipóxicos no pulmão, cérebro e em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ESCHMANN *et al.*, 2005; BRUEHLMEIER *et al.*, 2004) e na cardiologia em exames de coração de pacientes com isquemia miocárdica (MARKUS *et al.*, 2004).

Figura 8 - Estrutura química do [^{18}F] FMISO, 1-(2-Nitro-imidazolil)-3-[^{18}F]fluor-2-propanol ou 1H-1-(3-[^{18}F]fluor-2-hidroxipropil)-2-nitroimidazol.

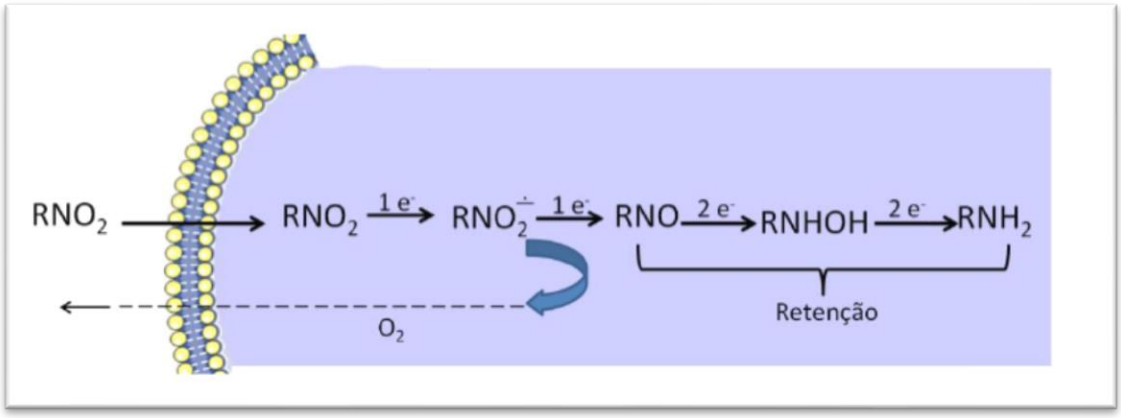


Fonte: University of Utah, 2016.

A detecção de tecidos hipóxicos com [^{18}F] FMISO é possível, uma vez que ele fica preso no interior das células tumorais por meio de um mecanismo estritamente correlacionado ao nível de oxigênio das células cancerosas.
A função nitroimidazol desempenha um papel chave no mecanismo de captura de [^{18}F] FMISO. Tal como todos os elementos da família dos 2-nitroimidazóis, este radiofármaco é lipofílico e, após a sua administração endovenosa, difunde-se, livremente, do compartimento vascular para o interior das células, por difusão passiva. Uma vez no meio intracelular, o grupo nitro (NO_2), presente neste radiofármaco, é submetido a uma redução de elétron mediada por enzimas nitroredutases; caso o oxigênio seja abundante, o processo

será reversível e então será reoxidado para o estado original, podendo o radiofármaco facilmente voltar a sair, novamente por difusão passiva, para o espaço extracelular. No entanto, quando o oxigênio é deficiente, nomeadamente se a pO_2 for igual ou inferior a 10 mmHg, a redução do [^{18}F] FMISO continua e, mais ainda, acentua-se com uma segunda redução, não sendo possível reverter o processo. Na sua forma reduzida, o [^{18}F] FMISO torna-se uma espécie altamente reativa que se liga covalentemente a biomoléculas intracelulares, acumulando no interior da célula (Figura 9) (TOYONAGA *et al*., 2016; LAPA *et al.*, 2015; HOIGEBAZAR *et al*., 2013; HAUBNER, 2010).

Figura 9 - Esquema representativo do mecanismo intracelular de compostos marcados com nitroimidazoles.



Fonte: SHETTY *et al*, 2012.

A retenção seletiva do [^{18}F] FMISO em tecidos hipóxicos pode ser observada em 1 hora após administração e o radiofármaco persiste no organismo por até 2,5 horas. Sua meia vida biológica é de 50 minutos, apresentando um coeficiente de partição octanol/água de 0,41, resultando em equilíbrio com a água total do corpo em normóxia e em tecidos sadios. O [^{18}F] FMISO é metabolizado pelo fígado e excretado pelos rins e bexiga (LEE, 2007). Estudos dosimétricos com [^{18}F] FMISO mostraram que a dose efetiva em exames PET é 0,013 mSv/MBq em homens e 0,014 mSv/MBq em mulheres, com atividade administrada de 3,7 MBq/kg (0,1 mCi/kg) (LEE, 2007).

Foi confirmado, por polarografia e por métodos imuno-histoquímicos indiretos, que a intensidade de captação (retenção) de [^{18}F] FMISO é influenciada pelos níveis de O_2 nos

tecidos tumorais, sendo tanto mais intensa quanto menor a pO2. Esta intensidade de captação pode ser estimada, em imagem funcional, por meio de análise semiquantitativa calculando, para cada área de captação do radiofármaco, o valor de *Maximum Standard Uptake Value* (SUV_{max}), simples ou corrigido para a atividade de fundo (LAPA *et al.*, 2015; TROST *et al.*, 2008).

Desta forma, conforme Lopci *et al*. (2014) defendem, o [18F]FMISO se apresenta como uma ferramenta de grande valia na clínica médica para mapeamento e monitoramento de regiões tumorais hipóxicas, especialmente os gliomas, carcinomas de cabeça e pescoço, tumores cerebrais e regiões isquêmicas vasculares. O [18F]FMISO associado à aplicação PET apresenta, ainda, boa resolução intrínseca, capacidade de reconstrução tridimensional da região tumoral, possibilidade de semiquantificação e/ou quantificação do teor hipóxico tumoral, não apresenta toxicidade ou efeitos adversos descritos para o paciente nas doses usuais diagnósticas, uso prático não invasivo e relativa facilidade de repetição nos casos em que se faça necessário.

Embora nas últimas décadas o [^{18}F] FMISO tenha sido considerado como o padrão-ouro para a detecção de oxigenação do tumor via PET, a maior limitação é o *clearance* muito lento do [^{18}F] FMISO do corpo, devido à sua alta lipofilicidade, resultando em tempos de espera mais longo após a aplicação do traçador e uma exposição maior do paciente à radiação. Além disso, o [^{18}F] FMISO exibe um metabolismo dependente não-significativo de oxigênio levando a uma quantidade considerável de produtos metabólicos radioativos (NANDY, 2010). Ao contrário de outros traçadores PET para hipóxia, que na maioria são eliminados por via renal (por exemplo, [^{18}F] FAZA e [^{18}F] FETA), a eliminação do [^{18}F] FMISO não ocorre apenas por meio do sistema renal, mas também via hepatobiliar, o que reflete a sua baixa hidrofilicidade (SHETTY et al., 2012; NANDY, 2010).

Desde que foi sugerido para este fim, várias abordagens sintéticas para o [^{18}F] FMISO têm sido investigadas com o objetivo de melhorar seu rendimento radioquímico e simplificar o processo de síntese, a fim de permitir o uso de suas aplicações clínicas.

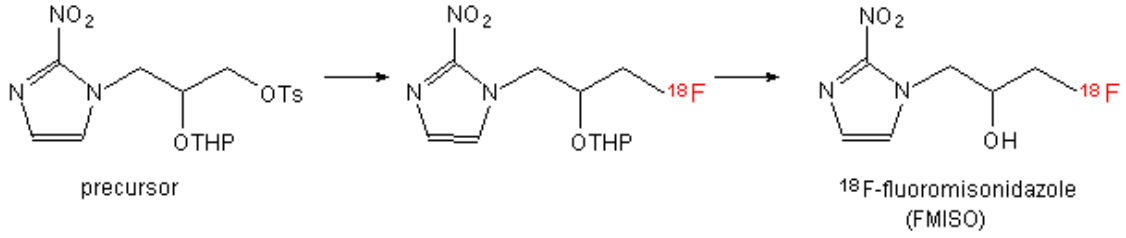
Duas estratégias principais para a síntese de [^{18}F] FMISO são relatadas na literatura: a primeira é uma substituição nucleofílica de um precursor protegido com subsequente remoção do grupo protetor; a segunda estratégia é por meio da abertura do anel epóxido e a produção do intermediário [^{18}F] epifluorohidrino, seguido de acoplamento ao 2-

nitroimidazole, em condições básicas (TANG, 2005). Ambas as abordagens têm a sua motivação com base em considerações práticas.

O primeiro método tende a minimizar o número de transformações químicas necessárias, como objetivo de uma alta eficiência de marcação e síntese em um único recipiente. O segundo se destina a utilização de vários componentes químicos e, por um tempo, recebeu maior atenção para a aplicação na rotina. A partir de uma revisão crítica da literatura, a abordagem de marcação direta mais promissora para o [^{18}F] FMISO é por substituição nucleofílica do tosilato (NANDY, 2010; OH, 2005; TANG, 2005).

A via mais utilizada para síntese do [^{18}F] FMISO é por meio da substituição nucleofílica do grupo tosilato por [^{18}F] fluoreto e subsequente hidrólise do grupo protetetor OTHP. Estudos recentes relatam que a síntese automatizada de [^{18}F] FMISO usando o CLAE para purificação obteve um rendimento maior que 60% e tempo de síntese de aproximadamente 60 minutos. Este mesmo processo usando a coluna de purificação Sep-Pak® C-18, gera um rendimento, com o precursor NITTP, maior que 40%, com uma pureza radioquímica igual ou maior que 97%, uma atividade específica de cerca de 34 TBq/mmol e tempo de síntese de 40 minutos. Na Figura 109 está ilustrada a reação de síntese do [^{18}F] FMISO (NANDY *et al.*, 2010; TANG, 2005).

Figura 10 - Reação química para síntese do [^{18}F] FMISO



Fonte: NANDY *et al.*, 2010.

Uma vez que a purificação por CLAE é bastante complicada para a operação de rotina e o tempo de síntese é significativamente aumentado, um procedimento totalmente automatizado de radiossíntese do [^{18}F] FMISO por meio da fluoração nucleofílica e emprego de uma coluna de purificação usando a interface do módulo de síntese do [^{18}F] FDG é o método mais promissor. Os estudos mostraram que o processo obteve rendimento

de aproximadamente 55% e tempo de síntese de 50 minutos (WANG *et al*., 2009; TANG, 2005).

2.8 Controle da qualidade de radiofármacos marcados com Flúor 18.

Os ensaios de controle da qualidade são de grande importância no processo produtivo de qualquer medicamento. É um atributo de caráter comercial, mas também ético, legal e moral (GIL, 2007).

Os testes de controle da qualidade de radiofármacos devem ser realizados na rotina, assegurando que todo o lote liberado do medicamento atenda às especificações preestabelecidas. As Farmacopeias são os documentos farmacêuticos oficiais que contemplam os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a área de saúde (FELTES; MILÃO, 2011).

Em específico, os radiofármacos emissores de pósitrons possuem certas características que tornam seu controle da qualidade diferente de outros fármacos convencionais. Alguns ensaios, como o teste de esterilidade, por exemplo, só são realizados após a liberação e administração do radiofármaco no paciente, devido ao tempo de meia-vida curto do medicamento (109,77 minutos, no caso dos radiofármacos marcados com ^{18}F) (ARAÚJO *et al*, 2008).

De acordo com a Farmacopeia Americana, radiofármacos PET com tempo de meia vida maior ou igual a 20 minutos devem passar pelos seguintes ensaios: medida de pH, inspeção visual, determinação da identidade radionuclídica, pureza radioquímica, atividade específica, análise de solventes residuais ou outras substâncias tóxicas usadas durante a síntese, concentração de endotoxina bacteriana e teste de esterilidade.

Os ensaios realizados para radiofármacos PET marcados com ^{18}F são descritos a seguir:

Aspecto: A aparência da solução deve ser clara, incolor ou levemente amarelada. A solução deve ser livre de material particulado (SAHA, 2010; EP, 2010).

pH: O ideal é que o pH seja o mais próximo possível do pH fisiológico, mas são aceitáveis valores nas faixas 4,5-7,5 (USP, 2010) e 4,5-8,5 (EP, 2010).

Identidade radionuclídica: O radionuclídeo é identificado por meio da determinação do tempo de meia-vida (característica individual de cada radionuclídeo), utilizando um sistema de detecção adequado. O tempo de meia vida ($T_{½}$) é definido como o intervalo de tempo necessário para uma determinada atividade do radionuclídeo decair a metade do seu valor inicial. No caso do ^{18}F, o tempo de meia-vida medido deve estar entre 105,0 e 115,0 min, de acordo com a USP (2010) e a EP (2010).

Pureza radionuclídica: É definida como a fração da radioatividade total, na forma do radionuclídeo desejado que esteja presente num radiofármaco (SAHA, 2010). Para radiofármacos marcados com^{18}F, este deve ser o radionuclídeo predominante responsável pela radioatividade do fármaco. Assim, para serem aprovadas as amostras, não menos que 99,5% das emissões dos fótons observadas devem corresponder a 0,511 MeV, 1,022 MeV ou picos de espalhamento Compton do ^{18}F (USP, 2010).

Identidade radioquímica: O teste de identidade radioquímica utiliza a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) e compara o fator de retenção da amostra ao fator de retenção da solução padrão do radiofármaco em questão. A identidade radioquímica também pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (EP 2010; USP, 2010).

Pureza radioquímica: É definida como a fração da radioatividade total na forma química pretendida no radiofármaco. Impurezas radioquímicas surgem a partir da decomposição devido à ação do solvente, mudanças de temperatura ou pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores, reação de síntese incompleta e a radiólise. A presença de impurezas radioquímicas resulta em imagens de baixa qualidade e aumento desnecessário da dose de radiação no paciente (SAHA, 2010). A pureza radioquímica pode ser testada tanto por CCD (cromatografia em camada delgada) como por CLAE (USP, 2010; EP, 2010).

Pureza química: A pureza química de um radiofármaco é a fração do material sob a forma química pretendida na forma marcada (SAHA, 2010). O teste de pureza química se resume à avaliação qualitativa ou quantitativa de substâncias que podem estar presentes na formulação final do radiofármaco. No entanto, os aditivos, ácidos, álcalis e tampões não são considerados impurezas. Impurezas químicas podem causar efeito tóxico (SAHA, 2010).

Solventes residuais: Os solventes residuais são substâncias que foram utilizadas durante a síntese do fármaco, mas que não foram completamente removidas da formulação final (ICH, 2009). A toxicidade destas substâncias deve ser determinada, bem como os seus riscos deletérios ao meio ambiente (HUNG et al, 2002). Os possíveis solventes residuais devem ser investigados por cromatografia a gás (CG) com detector de ionização de chama (NANDY, 2010; USP, 2010).

Teste de endotoxinas: Endotoxinas são lipopolissacarídeos de membrana de bactérias gram-negativas, patogênicas ou não, e são consideradas uma das principais fontes de pirogênio para a indústria farmacêutica (PEARSON, 1985). Os pirógenos são substâncias, endógenas ou exógenas, que são capazes de promover febre ou ainda alterar a contagem das células brancas do sangue, causar hipotensão, choque e até mesmo a morte (ZIJLSTRA *et al*, 1997; COOPER; LEVIN; WAGNER, 1971). A periculosidade das endotoxinas é ainda maior quando se trata de injetável por uso exclusivo por via intravenosa e seus níveis devem ser avaliados pelo controle de qualidade (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). O teste de endotoxina bacteriana pode ser realizado pelo método de coagulação em gel (semi-quantitativo) ou por métodos fotométricos (quantitativos) que incluem o método turbidimétrico, baseado no desenvolvimento de turbidez, e o cromogênico, no qual há mudança de coloração na solução (BRASIL, 2010). De acordo com as especificações da USP (2010) e da EP (2010), os níveis de endotoxinas não podem exceder 175 EU (unidades de endotoxina) por mililitro, no qual V é a máxima dose administrada em mililitros (NANDY, 2010).

Esterilidade: O teste de esterilidade é realizado inoculando-se uma alíquota da amostra em dois meios de cultura de princípios diferentes: 1) Caldo Tioglicolato, para cultura de

bactérias anaeróbicas e aeróbicas, e 2) Caldo Caseína Soja (TSB), para cultura de fungos e bactérias aeróbicas, e ambos observados durante 14 dias (USP, 2010; BP, 2009; EP, 2010; NANDY, 2010). Devido ao tempo de meia-vida curto do ^{18}F, fica impossibilitada a liberação do radiofármaco para uso somente após a finalização do teste de esterilidade. Portanto, todos os compêndios oficiais, em unanimidade, autorizam a utilização do radiofármaco antes da finalização do teste de esterilidade. A USP (2010) e o FDA (2005) estipulam o prazo de 24 horas, após a produção do radiofármaco, para a realização do teste de esterilidade (FDA, 2009).

Teste de integridade da membrana filtrante: A filtração esterilizante é um método que garante a esterilidade do produto filtrado, sem alterar as suas características iniciais. Este tipo de esterilização é normalmente utilizado para gases (ar, N_2, CO_2) e líquidos, principalmente para soluções com componentes termolábeis, tais como, vacinas, hemoderivados, reagentes de diagnóstico e injetáveis. O teste de integridade de membrana serve como controle de processo para assegurar que o sistema de filtração foi eficiente, servindo, portanto, como uma avaliação indireta da esterilidade do produto (KOGA, 2002). As farmacopeias americanas e europeia não exigem a realização deste teste, porém ele é preconizado pela RDC n° 17/2010 (ANVISA, 2010), que afirma que o teste deve ser realizado logo após o uso da membrana filtrante. A pressão de rompimento da membrana determinada experimentalmente deve ser igual ou superior ao especificado pelo fabricante (HUNG, 2002).

2.9 Validação de metodologias analíticas

Pode-se definir a validação de um método analítico como o processo realizado por estudos laboratoriais onde são estabelecidas se as características de performance do método atendem às exigências para a aplicação analítica necessária.

As definições e conceitos sobre validação de metodologia analítica para produtos farmacêuticos podem ser encontradas em diversos compêndios oficiais e guias técnicos regulatórios, fornecendo diretrizes para serem realizadas as validações das metodologias

em geral como também estabelecendo os padrões mínimos necessários para a indústria farmacêutica. Entre os materiais internacionais disponíveis estão as Farmacopeias (BRITISH PHARMACOPEIA, 2009b; USP 33, 2010), o FDA (UNITED STATES, 2000), EURACHEM (EURACHEM, 2014), além de guias e diretrizes de agências regulatórias e conferências como o ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005). Em relação à literatura nacional, estão legislações como a resolução RDC nº 166, de julho de 2017, da ANVISA (ANVISA, 2017), e normas do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2011). Além destes materiais, há inúmeros artigos nacionais e internacionais que abrangem esse assunto.

A legislação vigente no Brasil para a validação de métodos analíticos é a resolução da ANVISA RDC nº 133, de 25 de julho de 2017, que estabelece um conjunto específico de parâmetros de desempenho analítico. Esta resolução não possui informações específicas para realizar validação de metodologias analíticas para radiofármacos, mas é aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção.

Os parâmetros de desempenho analítico que devem ser avaliados de acordo com a RDC nº 133 são (ANVISA, 2017):

- Especificidade (e seletividade);
- Linearidade;
- Intervalo;
- Precisão;
- Limite de detecção;
- Limite de quantificação;
- Exatidão; e
- Robustez.

A discussão da validação de procedimentos analíticos é dirigida para os quatro tipos mais comuns de procedimentos analíticos (Tabela 3) (ANVISA, 2017):

Tabela 3 - Classificação dos métodos analíticos, segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias–primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance
IV	Testes de identificação

Fonte: RDC nº 133, de 25 de julho de 2017, ANVISA.

Categoria I) Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas: Esses procedimentos são destinados a quantificar as principais substâncias presentes em uma determinada amostra, seja o princípio ativo do fármaco ou outro componente, como matérias-primas.

Categoria II) Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas: Os testes de impurezas e produtos de degradação podem ser tanto quantitativos, como testes limites e diferentes características de validação são necessárias para os dois tipos de testes.

Categoria III) Testes de performance: Os testes de performance incluem os testes de dissolução e liberação do ativo, por exemplo.

Categoria IV) Testes de identificação: Testes de identificação são destinados a assegurar a identidade de um analito numa amostra. Isto é normalmente conseguido através da comparação de uma propriedade do espectro da amostra (por exemplo, o comportamento cromatográfico, reatividade química e outros) com a de um padrão de referência.

Na tabela 4 estão listadas as características de validação consideradas como as mais importantes para a validação dos diferentes tipos de procedimentos analíticos, com base na finalidade de cada categoria. Essa lista deve ser considerada para os procedimentos analíticos citados, mas exceções ocasionais devem ser tratadas caso a caso (ICH, 2005).

Tabela 4- Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.
** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

Fonte: ICH, Q2 (R1) de novembro de 2005.

2.10 Estudo de estabilidade

Um dos importantes requisitos exigidos pela ANVISA para obtenção do registro de radiofármacos no Brasil é o estudo de estabilidade (ANVISA, 2005).

A estabilidade de um medicamento pode ser definida como o tempo entre o momento da fabricação e aquele em que o radiofármaco tem a sua potência reduzida em 10%, mantendo suas propriedades físicas, químicas, terapêuticas e microbiológicas

originais durante o tempo de estocagem e uso pelo paciente, desde que eventuais produtos de degradação sejam devidamente identificados e seus efeitos sejam seguro (não tóxico). Este tempo, no qual se assegura sua integridade, representa o período de validade (SILVA, 2009).

Conforme o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade - RE 01 (ANVISA, 2005), a estabilidade é dependente de vários fatores ambientais tais como a umidade, temperatura e luz, bem como outros que são propriedades intrínsecas do produto, como as propriedades físicas e químicas da matéria prima ativa e dos excipientes, forma farmacêutica e sua composição, processo fabril e propriedades dos componentes das embalagens.

Prioritariamente, o estudo de estabilidade tem como objetivo determinar o prazo de validade de um medicamento, como também verificar a ocorrência de eventuais produtos de degradação. A ANVISA adota três modalidades de estudos de estabilidade: estudo de estabilidade acelerado, estudo de estabilidade de longa duração e estudo de estabilidade de acompanhamento. O estudo de estabilidade acelerado deve possuir duração de seis meses durante os quais devem ser realizados doseamentos do ativo, identificação e quantificação dos produtos de degradação. O estudo de estabilidade de longa duração deve ter duração de pelo menos 24 meses e da mesma forma, ser analisado doseamento do insumo farmacêutico, identificação e quantificação dos produtos de degradação. Finalmente, o estudo de estabilidade de acompanhamento é projetado para confirmar condições de armazenamento, datas de reteste e prazos de validade propostos.

A Tabela 5 sumariza as modalidades e condições para realização dos estudos de estabilidade das formulações que serão, após produção, mantidas em condições ambientes (15 – 30 ^{o}C)

Tabela 5 – Sumário das modalidades e condições para realização dos estudos de estabilidade.

Modalidade de estudo	Temperatura (ºC)	Umidade Relativa (%UR)	Período mínimo de estudo
Acelerado	40 ± 2	75 ± 5	6 meses
Longa Duração	30 ± 2	75 ± 5	24 meses ou o prazo de validade proposto
Acompanhamento	30 ± 2	75 ± 5	Prazo de validade proposto

Fonte: MIRCO E ROCHA, 2013.

Para radiofármacos, o que preconiza a RDC 64 de 2009, na seção V, artigo 33 é que para a comprovação do prazo de validade o fabricante deve: "apresentar os resultados do estudo de estabilidade acelerada de três lotes piloto utilizados nos testes e estudos de estabilidade de longa duração em andamento de acordo com o Guia para Realização de Estudo de Estabilidade de Medicamento da legislação vigente" (RDC 64, 2009).

A considerar pela legislação vigente e o Guia para o Estudo de Estabilidade - RE 01 (ANVISA, 2005) não faria sentido a aplicação de estudo de estabilidade a radiofármacos contendo isótopos com tempo de meia-vida inferiores a um ano, como é o caso do [^{18}F] FMISO e tantos outros agentes de radiodiagnóstico. Todavia, o item II do mesmo artigo V determina o seguinte:

> "para os radiofármacos com meia-vida menor do que 1 ano, o período de tempo mínimo coberto na submissão definido nos guias e estabilidade (12 meses no teste de longa duração e 6 meses no teste acelerado) não podem ser aplicados. Nestas situações, a frequência do teste deve ser adaptada, para que os dados de no mínimo 5 pontos do teste (incluindo o inicial) sejam apresentados na submissão." (RDC 64, 2009).

Desta forma, radiofármacos contendo radioisótopos com tempo de meia vida inferiores a 1 ano, incluindo aqueles com curtíssimo tempo de meia-vida, como aqueles marcados com o radionuclídeo ^{18}F, caso do [^{18}F] FMISO, que tem tempo de meia-vida de horas (109,8 minutos) devem apresentar um estudo de estabilidade adaptado. Os questionamentos que acabam surgindo como consequência dizem respeito a como realizar

o estudo de estabilidade adaptado, o que deveria ou não ser contemplado neste estudo, os tipos de análises a serem feitas, e o protocolo e cronograma a seguir. Estas questões ainda não estão claras a partir dos requisitos da ANVISA.

2.11 Legislação e registro para radiofármacos PET

Além do alto custo envolvido no processo de desenvolvimento de novos radiofármacos PET, um grande obstáculo são as regras de regulamentação para aprovação do registro de uso clínico desses produtos. Em particular, novos radiofármacos estão, em sua maioria, sendo desenvolvidos em universidades e hospitais e são preparados em pequena escala e em um ambiente não industrial. Porém, as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) exigem instalações de sala limpa requerendo um alto investimento para novas construções ou adequação das instalações antigas para atender a esse padrão.

A utilização da radiação e produtos radiomarcados para qualquer finalidade é controlada por órgãos reguladores em diferentes países de todo o mundo. Até o início da década de 1960, apenas normas de radioproteção e compêndios farmacopeicos eram adotadas para regulamentar o uso de produtos radiofarmaceuticos. Estados centrais, como Estados Unidos da América (EUA) e União Europeia (UE), tiveram grande influencia nas mudanças dos processos regulatórios internacionais e são referências para outras agências no mundo como também no Brasil (FERREIRA *et al*., 2011). Então, desde 1975, o FDA (*Food Drug Administration*) passou a regular a segurança e eficácia dos radiofármacos em seres humanos (SAHA, 2010).

No Brasil, a produção e comercialização de radiofármacos era regulamentada pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). No entanto, em 2009, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) tornou-se o órgão regulador responsável pela produção e comercialização de radiofármacos e neste ano foram publicadas as Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) de n° 63 e n° 64 (RDC63 e RDC64) que tratam a respeito das boas práticas de fabricação de radiofármacos e sobre o registro destes. Mais recentemente foi publicada a resolução de n° 70, aprovada em 2014, elaborada para normatizar produtos já comercializados e utilizados no Brasil, estabelecendo que os radiofármacos cuja comercialização não tenha sido iniciada antes da data de publicação da RDC 70/2014 somente poderão ser comercializados e distribuídos no País após a concessão de seu registro pela ANVISA (BRASIL, 2009b; BRASIL, 2009c).

Pelo fato de alguns radiofármacos já serem produzidos no País antes da publicação destas resoluções, esses radiofármacos foram considerados como consagrados, não requerendo a realização de ensaios não-clínicos e clínicos para registro, apenas referências bibliográficas para a comprovação de segurança e eficácia ([^{18}F] FDG e NaF).

Para fins de registro de novos radiofármacos produzidos no Brasil, deverão ser enviados à ANVISA, na forma eletrônica e física, um dossiê de registro abrangendo dados farmacológicos, toxicológicos e clínicos provenientes de resultados dos testes pré-clínicos e clínicos comprovando sua segurança e eficácia, relatório de produção e controle de qualidade, resultados do estudo de estabilidade, dados relacionados à produção, embalagem e rotulagem. A documentação deve incluir ainda, o certificado de responsabilidade técnica, a cópia do Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle (para produtos nacionais), a autorização da CNEN, além das documentações referentes ao funcionamento da empresa, como por exemplo, formulários de autorização de funcionamento. Vale ressaltar que o registro do produto é concedido por cinco anos e deve ser renovado após esse período e tem como finalidade a promoção e proteção da saúde da população (BRASIL, 2009; FERREIRA, 2011).

2.12 Ensaios não clínicos para radiofármacos PET

A liberação dos radiofármacos para uso humano funciona de forma semelhante às outras drogas e devem passar por testes não-clínicos e clínicos, desenvolvimento de processo de fabricação e controles de qualidade para obtenção das BPF, sob a investigação e aprovação do órgão regulador. Para tanto, os guias de base (*guidelines*) estabelecem resoluções específicas para regulamentação e condução de produção e pesquisas para radiofármacos (SAHA, 2010; VANBROCKLIN, 2008).

No Brasil, os ensaios não-clínicos visam atender os critérios estabelecidos pela ANVISA, tendo como objetivo de analisar a segurança e eficácia do produto desenvolvido. A segunda versão do Guia para a Condução de Estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, disponibilizada em 2013, traz orientações técnicas para ensaios não-clínicos estabelecidas com base em guias internacionais dos órgãos de vigilância sanitária, FDA e EMA (*European Medicines Agency*).

A segurança do produto pode ser avaliada por meio dos ensaios de citotoxidade e genotoxicidade *in vitro* com células. Esses ensaios permitem avaliar se uma substância tem capacidade de produzir efeitos nocivos às células de forma que impeça o seu funcionamento normal podendo até levar a morte celular (ANVISA, 2013). Já a eficácia pode ser avaliada por ensaios de biodistribuição *ex vivo* e por meio de imagens PET (*in vivo*).

Devido à complexidade celular dos seres humanos, muitas vezes é necessário que haja uma combinação dos estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Modelos animais têm sido adotados na pesquisa, pois permitem a investigação de processos biológicos e patológicos, espontâneos ou induzidos, simulando organismos humanos (CHERRY; GAMBHIR, 2001). O tipo de estudo é escolhido de acordo com o fármaco e as técnicas de investigação deste.

O documento redigido pela ANVISA (ANVISA, 2013) traz um direcionamento para a realização dos ensaios não-clínicos baseado em guias internacionais dos órgãos de vigilância sanitária, FDA e EMA (*European Medicines Agency*).

Neste guia estão contidos os seguintes estudos não-clínicos: toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local, carcinogenicidade, avaliação da segurança farmacológica, toxicocinética e segurança para o desenvolvimento e registro de medicamentos sintéticos e semi-sintéticos de uso oral (ANVISA, 2013). Quando aplicável, a não realização, adequação ou substituição de um estudo deve ser devidamente justificada.

2.12.1 Ensaios *in vitro*: citotoxicidade e genotoxicidade

Estudos *in vitro* com células são largamente utilizados para avaliar se um fármaco produz efeitos citotóxicos, impedindo o funcionamento normal de uma célula e levando-a à morte celular. A avaliação da citotoxicidade é realizada no início do desenvolvimento de novas substâncias a fim de premeditar a ação tóxica que a formulação pode apresentar (RISS, 2016).

Um método recentemente desenvolvido para avaliação da viabilidade celular, citotoxicidade e eventos de apoptose após a exposição da formulação teste é por meio da

multiplexação que envolve a medição da atividade das proteases como marcadores de células viáveis e células mortas. Esse método quantifica as células vivas e mortas ao mesmo tempo usando substratos fluorescentes. Primeiro, a viabilidade e a citotoxicidade são determinadas medindo dois biomarcadores de proteases diferentes simultaneamente com a adição de um reagente não-lítico contendo substratos peptídicos fluorescente proporcional ao número de células vivas. A apoptose é medida pela quantificação das atividades da caspase 3/7 em células lisadas usando substratos luminescentes que é proporcional à quantidade de atividade da caspase que é um indicador de apoptose (PROMEGA, 2015).

Referindo-se à toxicidade genética, são considerados os testes de genotoxicidade, cuja função é avaliar a presença ou ausência de quebras provocadas direta ou indiretamente nas fitas de DNA (clastogênese) em células de linhagens já estabelecidas para tanto, em culturas padronizadas. Além disso, os ensaios de genotoxicidade podem avaliar se determinado composto teste possui a capacidade de inibir a proliferação celular (aneugênese) (WHO, 2013).

Uma das metodologias preconizadas pela ANVISA para avaliação do poder genotóxico de uma formulação é o teste de frequência de micronúcleos *in vitro*. Esse teste baseia-se na contagem de quebras duplas não reparadas no DNA de células expostas em cultura a diversas concentrações de substâncias-teste ou a quantidades incrementais de agentes agressores diversos, tais como a radiação ionizante. Em células interfásicas, o produto de tais quebras apresenta-se sob a forma de micronúcleos, que são aglomerados de DNA com várias características do núcleo principal, e com 5 a 30% de seu tamanho. O aumento da proporção de células que apresentam micronúcleos, bem como a sua quantidade no citoplasma das células analisadas, são indicativos de dano genotóxico. Após análise, tal aumento pode relacionar a concentração utilizada da substância-teste ao potencial genotóxico da mesma (ANVISA, 2013; SPEIT *et al*., 2011).

2.12.2 Ensaios com animais: Estudo de biodistribuição *ex vivo* e por imagem PET

Estudos de biodistribuição *ex vivo* e por imagem PET fornecem informações essenciais para determinação do órgão alvo e captação do radiofármaco. A partir desses

ensaios, obtêm-se dados quanto à segurança, eficácia e especificidade do produto estudado. Dados de distribuição para os principais órgãos e tecidos, juntamente com a concentração sanguínea ao longo do tempo, permitem inferir quanto à forma de eliminação e excreção da molécula radiomarcada, entre outros (BRAGHIROLLI, 2012).

A utilização de modelos animais para estudos de novas abordagens de diagnóstico e tratamento tem sido fundamental no estudo de diversas doenças. Estudos em animais são os últimos estudos realizados antes dos testes clínicos com humanos e conferem informações importantes sobre o produto testado, visando prevenir potenciais riscos ao paciente.

Estudo de imagens é realizado em pesquisa não-clínicas nos estudos de biodistribuição não invasivos diminuindo o número de animais utilizados para esse fim (CHERRY; GAMBHIR, 2001). Para isso, foi desenvolvido um equipamento adequado para pequenos animais, denominado microPET. Este equipamento possui menor resolução que o PET para humanos e tem possibilitado o estudo de diversos distúrbios e doenças em modelos animais, além da investigação de novos fármacos ou mesmo radiofármacos PET. Esta ferramenta permite estudos repetidos utilizando um único animal, de forma não invasiva, e pode facilitar determinados estudos como os longitudinais (CHERRY; GAMBHIR, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos descritos a seguir foram realizados na Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos e na Unidade de Radiobiologia do CDTN, em conformidade com os requisitos aplicáveis da Norma CNEN-NN-3.01 (CNEN, 2011). Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram executados com a colaboração do Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais (LAIA) situado no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

3.1 Síntese do [^{18}F] FMISO

A síntese do [^{18}F] FMISO foi realizada na Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (UPPR/CDTN) em Belo Horizonte-MG, utilizando o módulo de síntese de fluordesoxiglicose [^{18}F] FDG da TraceLab MX_{FDG} (GE) adaptado para cassetes e kits de [^{18}F] FMISO (ABX).

Os reagentes utilizados foram: o precursor NITTP; tampão citrato; reservatório cônico para recebimento da água enriquecida irradiada; solução eluente TBAHCO3 (75mM) ou Kryptofix (aminopoliéter) adquiridos da ABX (Alemanha); cartuchos HLB Plus, WAX Plus, CHROMAfix, Alumina Light e QMA Light; água para injetáveis para preparo das soluções da síntese; ácido clorídrico 2N; água enriquecida 95% pureza isotópica da *Center of Molecular Researches Isotopes* (Rússia); acetonitrila; etanol; filtros de membrana hidrofóbicos de 0,20 μm (Millex) e hidrofílicos esterilizante de 0,22 μm (Cathivex) da Millipore (EUA); seringas de 30, 20, 10, 3 e 1 mL e agulhas tamanho 22G 0,7x25 mm da BD (Alemanha); frascos estéreis de 15 mL adquiridos da GiPharma (Itália). O arranjo e disposição desses reagentes estão demonstrados nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Esquema do Kit utilizado para síntese do [^{18}F] FMISO.

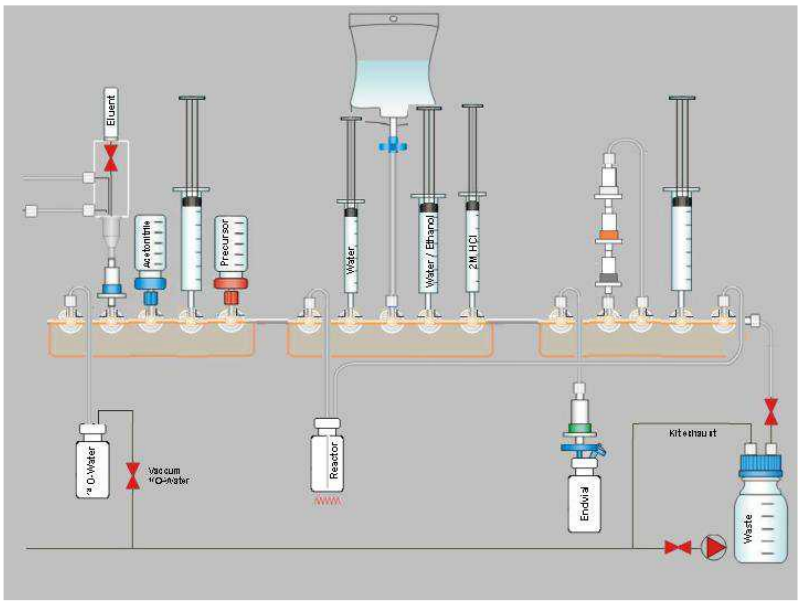
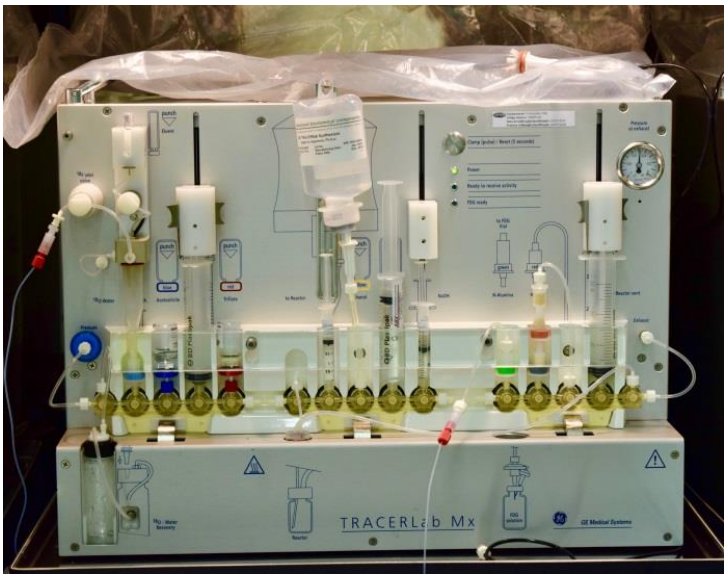


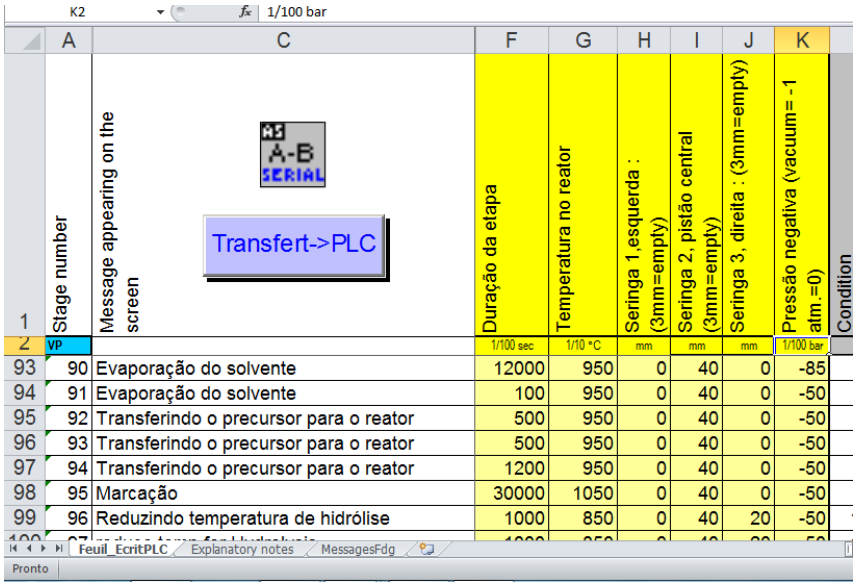
Figura 12 - Montagem do cassete para síntese do [18F] FMISO.



Para produção do radioisótopo flúor-18 (^{18}F) foi preenchido um alvo com água enriquecida (H_2O^{18}) e esse foi irradiado em cíclotron da *General Eletric Healthcare* (EUA), modelo PETrace® de 16,5 MeV. A síntese foi executada em célula quente blindada modelo BBSO-2, da COMECER (Itália).

A síntese do [^{18}F] FMISO foi feita a partir de uma programação pré-estabelecida em uma planilha contendo macros responsáveis pela execução automática em cadeia que enviava dados remotamente, para serem executados pelo módulo de síntese da Tracerlab MX_{FDG} (Figura 13).

Figura 13 - Planilha informatizada com algumas variáveis envolvidas na síntese do [^{18}F] FMISO.



A partir dessa planilha foi possível fazer modificações nos parâmetros de produção do [^{18}F] FMISO e, assim, foram estabelecidos alguns protocolos de síntese com configurações diferentes da síntese padrão estabelecida pela ABX. Essas modificações envolveram substituição do catalisador, variações nas temperaturas de marcação e modificação no volume do eluente, com o intuito de testar qual protocolo é capaz de fornecer maior rendimento da síntese e principalmente melhor pureza radioquímica.

As configurações utilizadas nos protocolos de síntese foram:

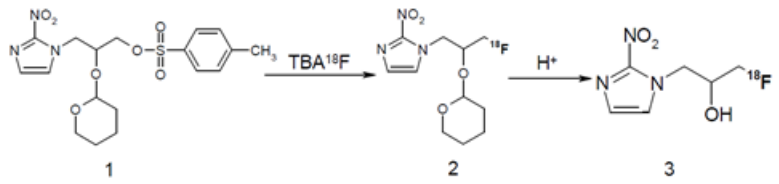
1) Síntese padrão da ABX, sem nenhuma modificação, com temperatura de marcação igual a 105°C e temperatura de hidrólise igual a 85°C;
2) Síntese com temperatura de marcação igual a 85°C e temperatura de hidrólise igual a 85°C;

3) Síntese com temperatura de marcação igual a 130°C e temperatura de hidrólise igual a 85°C.
4) Substituição do catalisador TBA por Kryptofix;
5) Modificação no volume do eluente EtOH 5% em salina que passou de 20 ml para 7 ml;

A síntese dos protocolos acima citados, se desenvolveram automaticamente via computador sem interferência humana, de acordo com programação informatizada pré-estabelecida na planilha. A partir da irradiação da água no cíclotron, foi produzido o ^{18}F. Em seguida ele foi enviado ao módulo de síntese via tubulação tefzel (capilares), onde ocorreu o processo de síntese.

No módulo, o ^{18}F foi retido no cartucho QMA light e a água enriquecida foi coletada em frasco dedicado. O ^{18}F foi eluído com a solução eluente (no protocolo 4 foi utilizado Kryptofix e nas demais TBA) e enviado ao frasco reator. Seguiu-se com evaporação dos solventes no reator a 95 °C, sob vácuo e com fluxo de nitrogênio gasoso ultrapuro, auxiliado pela adição de acetonitrila em 3 alíquotas para destilação azeotrópica. Após obtido o ^{18}F seco, foi adicionado o precursor solubilizado em 2 mL de acetonitrila anidra. Uma reação de substituição nucleofílica SN2 aconteceu ao nível do grupo tosil (OTS), com substituição deste pelo ^{18}F (marcação). Seguiu-se uma hidrólise ácida para remoção de grupos protetores. A seguir, a mistura reacional passou por purificação através de extração em fase sólida, sendo o pH corrigido com tampão citrato (Figura 14).

Figura 14 – Síntese química do [^{18}F] FMISO a partir do precursor NITTP.



1- (3-(2-Nitroimidazol-1-il)-2-O-tetrahidropiranil-1-O-toluenesulfonilpropanediol) (NITTP)
2- 1H-1-(3-(18F)fluor-2-hidroxipropol)-2-nitroimidazol
3- [18F]FMISO

Desse momento em diante os protocolos seguiram caminhos diferentes. Pelo protocolo 1 foi testada a temperatura de marcação estabelecida pela ABX que consistiu em 105 °C por 5 minutos. No protocolo 2, a temperatura de marcação foi igual a 85°C também

por 5 minutos, e no protocolo 3 a temperatura de marcação foi aumentada para 130°C durante 5 minutos. A solução foi resfriada, a temperatura ambiente sem influência do equipamento, para 85 °C. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de HCl 2 M por 5 minutos a 85 °C para a hidrólise.

A solução foi então, resfriada por 100 segundos, sendo a mesma inserida nos cartuchos PS-H+, WAX e HLB. O frasco reator foi lavado com água para injetáveis e essa também passou pelos cartuchos. Posteriormente lavou-se o cartucho HLB com água para injetáveis e eluiu-se o produto final com 20 mL de EtOH 5% (no protocolo 5, esse volume foi modificado com o objetivo de diminuir o efeito nocivo do etanol para pacientes com insuficiência hepática), passando pelo cartucho de alumina e coletado em frasco dedicado contendo 7 mL de tampão citrato com pH 6,5.

Após o processo de síntese, o radiofármaco foi enviado ao laboratório de controle de qualidade, a fim de serem realizadas análises para confiabilidade do produto final.

3.2 Controle da Qualidade do [^{18}F] FMISO

Os parâmetros avaliados, as metodologias de análise utilizadas e os requisitos especificados para esse radiofármaco foram estabelecidos com base na sua monografia (EUR. PHARM., 2016) e em dados da literatura (OH *et al*., 2005).

Ensaios de controle de qualidade foram realizados para avaliação de características físico-químicas e microbiológicas. Foram determinados: pH, identidade e pureza radioquímica, identidade e pureza radionuclídica, pureza química, solventes residuais, endotoxinas bacterianas e esterilidade.

Para os testes de controle físico-químico do [^{18}F] FMISO foram utilizados os seguintes reagentes: o padrão do FMISO da ABX, acetonitrila, etanol, padrão de Kryptofix, padrão de Tetrabutilamônio (TBA) e água ultrapura. Os testes foram realizados utilizando os seguintes equipamentos: Cromatógrafo gasoso, *Perkin Elmer Clarus*® 580, com gás de arraste hélio ultrapuro com fluxo de 2,0 mL/min; tempo total de análise de 4 minutos; coluna DB WAX 30 m x 0,25 mm; cromatógrafo a líquidos da marca Agilent Technologies (EUA) modelo 1200 com injetor manual, equipado com coluna de C18, marca Phenomex, modelo Luna 25 cm x 4,6 mm; calibrador de dose Capintec (EUA) modelo CRC-25R;

analisador multicanal com detector de cristal de Germânio da Canberra Industries (Austrália); pHmetro com microeletrodo da Mettler Toledo (EUA) e fitas de testes para aferição do pH da Merck®.

Os testes de controle microbiológico foram realizados como parte do estudo de estabilidade do produto e foram utilizados os seguintes materiais: sistema de teste portátil Endosafe, modelo PTS (Wilmington, Estados Unidos), e cartuchos PTS (Endosafe, Inc.TM, Charleston, SC); e meios de culturas de tioglicolato e caldo de caseína de soja (TSB). Para assegurar a efetividade da filtração da amostra, foi realizado um teste conhecido como "ponto de bolha" no qual foi utilizado um manômetro e os filtros utilizados no processo de filtração (Millex-GS, marca Merck Millipore, de 33 mm de diâmetro e poros com dimensões de 22 µm).

Na Tabela 4 abaixo estão apresentados, de forma resumida, as metodologias utilizadas para os ensaios de controle de qualidade do [^{18}F] FMISO.

Tabela 4 – Metodologias para ensaio de controle de qualidade do [^{18}F] FMISO.

Parâmetros	**Método**
Aspecto visual	Inspeção visual
pH	Medida em pHmetro e fita
Solventes residuais (etanol e acetonitrila)	Cromatografia gasosa
Pureza química	Cromatografia em camada delgada
Identidade radioquímica	Cromatografia líquida de alta eficiência
Pureza radioquímica	Cromatografia líquida de alta eficiência
Pureza radionuclídica	Espectrometria gama
Identidade radionuclídica	Determinação da meia-vida
Esterilidade	Inoculação direta
Endotoxinas bacterianas	Ensaio cinético-colorimétrico (PTS)

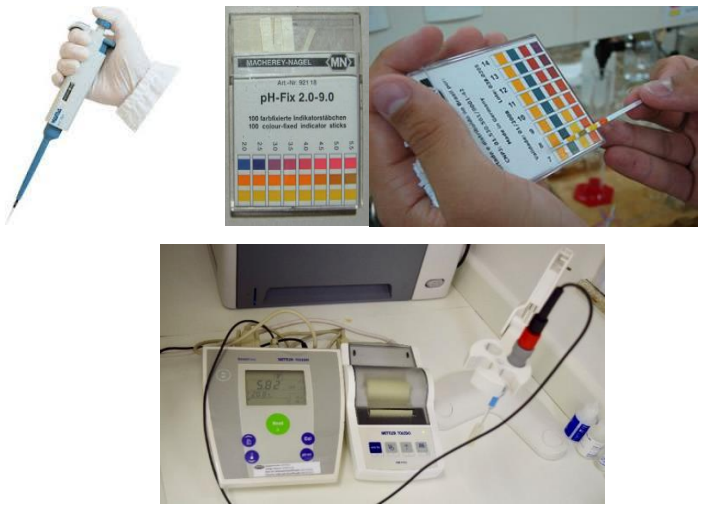
3.2.1 Características físicas

Incluiu a observação da cor da preparação e a avaliação da presença de materiais particulados. O ^{18}F-FMISO deve apresentar-se límpido, incolor ou levemente amarelado e totalmente livre de partículas.

3.2.2 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

A aferição do pH do [^{18}F] FMISO pode foi feita de duas formas, utilizando fitas teste de pH e por um micropHmetro (Mettler Toledo, Suíça). Uma alíquota da amostra foi depositada na região de teste da fita indicadora e após 1 minuto foi feita a comparação colorimétrica com o padrão fornecido pelo fabricante (Figura 15). No micropHmetro, após calibração com padrões de pH 4 e 7, foi inserido o eletrodo no frasco contendo a amostra do [^{18}F] FMISO e o resultado do teste mostrado no leitor do equipamento. Segundo a monografia do radiofármaco em questão, o valor do pH de medicamentos injetáveis deve estar compreendido na faixa de 4,5 e 8,5, próximo ao do sangue.

Figura 15 - Determinação do pH do [^{18}F] FMISO por meio de fitas de teste e micropHmetro



3.2.3 Identidade e Pureza Radionuclídica

Para determinar a identidade do [^{18}F] FMISO, a amostra foi colocada no poço do calibrador de dose (Capintec CRC 25R, EUA) (Figura 16) e foram registrados os valores da leitura inicial, de 10, de 20 e de 30 minutos. Pela equação 1 calculou-se o tempo de meia vida física do radionuclídeo. Valores compreendidos entre 105 e 115 minutos são identificados com Flúor 18.

$$A = A_0 * e^{-\lambda t} ; \lambda = \ln 2 / t_{1/2} \qquad (1)$$

Onde:

A = atividade final em Bq ou Ci;

A_0 = atividade inicial em Bq ou Ci

e = número de Euler, base dos logaritmos naturais;

λ = constante de decaimento do radionuclídeo;

ln = logaritmo neperiano

$t_{1/2}$ = tempo de meia vida

t = diferença de tempo entre as atividades inicial e final. Para o teste, t assume os valores de 10, 20 e 30 minutos.

Figura 16 - Calibrador de dose Capintec®

Na avaliação da pureza, as amostras que contém flúor-18 devem apresentar 99,5% das emissões gama observadas relativas a picos de 0,511 MeV, 1,022 MeV ou picos Comptom de dispersão do ^{18}F. Para isso, a amostra foi inserida em um analisador multicanal (Canberra Multichannel Analyzer, EUA) (Figura 17) que quantifica os diferentes valores de energia captados com suas respectivas intensidades, fornecendo um espectro da amostra. O espectro apresentado pelo [^{18}F] FMISO deve conter intensidade máxima de energia de 511 keV, representando no mínimo 99,5% do total das energias detectadas.

Figura 17 - Analisador multicanal

3.2.4 Pureza radioquímica e química

A pureza química e radioquímica foram analisadas por meio da CLAE. O CLAE é da marca Agilent 1200, (Santa Clara, Estados Unidos) com bomba isocrática (G1328B 1200, Agilent) e equipado com uma coluna C18 (Luna, Phenomenex) (Figura 18).

Figura 18 - Cromatógrafo a líquidos de alta eficiência e coluna C18.

A injeção da amostra foi feita com uso de microsseringa de volume igual a 50 µL em um loop de 20 µL de capacidade. A fase móvel consistiu em um gradiente de água e acetonitrila, sendo 90% de água e 10% de acetonitrila por 20 minutos, até atingir 95% de acetonitrila dos 20 aos 25 minutos, voltando para 10% de acetonitrila aos 26 minutos até o final da análise, totalizando 30 minutos de corrida, a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/minuto.

Simultaneamente à passagem pela coluna de C18, a fase móvel passou por dois detectores, um UV-VIS-visual com comprimento de onda de 320 nm e outro de radioatividade na faixa de energia de 19 a 1036 keV. Após obtenção do cromatograma, as áreas dos picos cromatográficos foram calculadas com auxílio do *software* do próprio equipamento.

Após obtenção do cromatogramas os picos de radioatividade e UV da amostra de [^{18}F] FMISO foram comparados com os picos do padrão de referência do FMISO. Para ser considerada como aprovada, a amostra deve representar no mínimo 95% da área de todos os picos existentes no cromatograma de detector de radioatividade.

Concomitantemente, foram obtidos por esta técnica os resultados das análises de pureza química. Para tanto, os padrões das impurezas NITTP e desmetilmisonidazol imidazol foram preparados com concentração igual a 10 ppm e armazenadas como estoque

e mantidos sob em refrigeração entre 2ºC e 8ºC. Devido ao tempo de análise ser muito longo (30 minutos), ficou definido fazer apenas uma única injeção da mistura dos padrões antes do controle de qualidade da amostra do produto acabado e uma injeção da amostra de [^{18}F] FMISO. A técnica foi validada de acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos, da RDC nº 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

3.2.5 Solventes residuais

A análise dos solventes residuais foi feita em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de ionização em chama (Figura 19). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: inicialmente, foi mantida em 40 °C nos primeiros 1,5 minutos, em seguida, foi elevada a 85°C por dois minutos (25 °C/minuto) e por último a 150 °C (50 °C/minuto) por 1,5 minutos. O injetor foi mantido a 145 °C, enquanto o detector permaneceu a 250 °C. O gás de arraste empregado foi o hélio (taxa de fluxo de 2,0 mL/min). Os solventes residuais avaliados foram etanol e acetonitrila, conforme preconizado pela Farmacopeia Europeia (EUR. PHARM, 2016). Como solução padrão, foi usada uma solução aquosa contendo etanol e acetonitrila. O teor de acetonitrila na amostra não deve ser superior a 0,04% e para etanol, espera-se encontrar concentração na faixa de até 10%.

Figura 19 – Cromatógrafo a gás *Perkin Elmer Clarus*® 580.

3.2.6 Determinação de Tetrabutilamônio (TBA) ou Kryptofix (Ky)

O teste para análise desses catalisadores foi semi-quantitativo e, quando na formulação do [^{18}F] FMISO foi utilizado TBA, foram feitas duas soluções padrão de concentrações de 50 µg/ml e 100 µg/ml em água deionizada. Em uma placa de alumina com sílica-gel foram aplicados 2 µl dessas duas soluções, além de 2 µl da amostra de [^{18}F] FMISO. Em seguida, a cromatoplaca foi inserida em uma cuba em atmosfera de iodo, o qual sublima e entra em contato com o TBA, gerando uma mancha marrom nos locais onde as soluções foram aplicadas após, aproximadamente, 5 minutos. Como critério de aceitação, estabeleceu-se que a mancha da amostra de [^{18}F] FMISO deveria exibir cor menos intensa que a mancha referente à solução de concentração 100 µg/ml.

O teste para quantificação de Ky foi feito da mesma forma da quantificação de TBA, porém as concentrações das soluções padrão de Ky foram 25 µg/ml e 50 µg/ml. Neste caso, a mancha da amostra de [^{18}F] FMISO deveria exibir cor menos intensa que a mancha referente à solução de concentração 50 µg/ml.

3.2.7 Ensaio de endotoxina bacteriana

O ensaio para determinação de endotoxinas bacterianas foi baseado na formação de gel de *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). Para tanto, foi utilizado o sistema de teste portátil Endosafe, modelo PTS (Wilmington, Estados Unidos), composto por leitor óptico e cartucho (Figura 20). O cartucho contém quatro canais nos quais estão contidos o reagente LAL e um substrato cromogênico, além de conter endotoxina, em apenas dois canais, que serviram como controle positivo do produto.

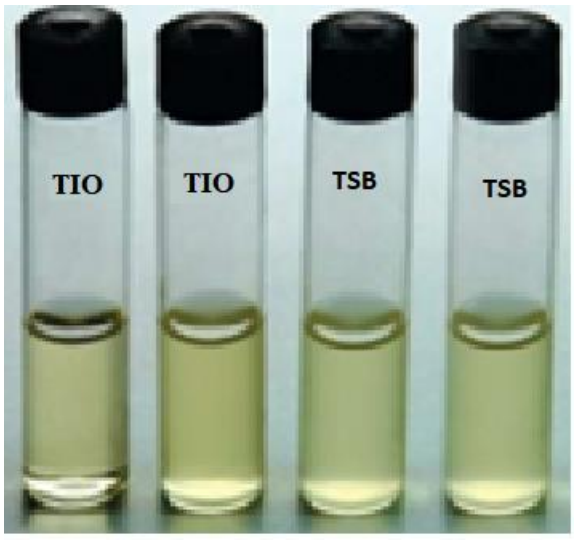
Figura 20 - Endosafe PTS

A execução do teste consistiu em inserir o cartucho no equipamento, preencher os dados requisitados pelo sistema e pipetar 25 µl da amostra de [^{18}F] FMISO em cada um dos quatro poços contido no cartucho. O tempo de reação foi de aproximadamente 20 minutos. Os compêndios oficiais preconizam como concentração limite de endotoxina o valor de 175 EU por dose.

3.2.8 Ensaio de Esterilidade

Os ensaios de esterilidades foram realizados em acordo com os compêndios oficiais, por inoculação direta. Foram utilizados tubos de ensaio contendo *Meio fluido de tioglicolato* para cultura de bactérias anaeróbicas, embora também possa detectar o crescimento de bactérias aeróbicas, e *Caldo de caseína de soja* (TSB) para cultura de leveduras, fungos e bactéria aeróbicas (Figura 21), que após inoculação de 1 ml de amostra de [^{18}F] FMISO com seringa e agulha estéreis (após decaimento radioativo, 10 meia vidas), foram incubados a 33 °C ± 2°C e 23 ± 2°C, respectivamente, por 14 dias. O resultado do teste é baseado em não haver crescimento de microrganismos, turbidez ou depósito nas amostras avaliadas.

Figura 21 - Meios de cultura líquidos de TSA e TSB



3.2.9 Teste da membrana filtrante

O teste da integridade da membrana filtrante é sempre realizado após a filtração da amostra, ao fim da síntese. Desta forma, assegura-se que a filtração foi realizada de acordo com as especificações, mostrando que a integridade do filtro não foi comprometida durante, ou antes, da utilização. O ensaio é realizado pelo teste de ponto de bolha.

O teste consistiu em acoplar a membrana filtrante a um sistema montado composto por manômetro previamente calibrado e mangueiras. A abertura do equipamento foi lenta até que a membrana fosse rompida e a formação de bolhas fosse evidente. A pressão de rompimento do filtro deve ser igual ou superior a estabelecida pelo fabricante. O filtro utilizado foi o Millex-GS, marca Merck Millipore, de 33 mm de diâmetro e poros com dimensões de 22 µm (Figura 22). A pressão de rompimento estabelecido pelo fabricante do Millex-GS é igual ou superior a 50 psi.

Figura 22 - Filtro Millex-GS, marca Merck Millipore

3.3 Validação da metodologia para análise da pureza química e radioquímica do [^{18}F] FMISO

O método proposto neste trabalho para a determinação da pureza química e radioquímica do [18F] FMISO é alternativo ao descrito na Farmacopeia Europeia (EP 8.0) e melhor se adapta às condições da Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos do CDTN, onde o radiofármaco foi produzido. Desta forma, a fim de garantir a confiabilidade na metodologia utilizada o ensaio foi validado, conforme preconiza a RDC 166/2017. Foram utilizados como textos de referência para a definição da validação os guias de

validação de metodologias disponíveis, tais como, o Food and Drug Administration (FDA), United States Pharmacopeia (USP) e a International Conference on Harmonization (ICH). Contudo, não existe uma fonte ou guia definitivo. Cada validação deve ser personalizada, avaliando-se a necessidade dos testes experimentais para a metodologia em estudo.

Para este ensaio analítico foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

Especificidade e Seletividade

O teste consistiu na avaliação da capacidade de detectar um composto, quando na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e constituintes da matriz, os quais podem atuar como interferentes. A especificidade foi determinada pela comparação dos resultados obtidos para amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas e não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não foi afetado por esses materiais. O efeito da adição do precursor, NITTP, desmetil imidazol e hidróxido de tetrabutilamônio na especificidade do método para determinação da pureza química do [^{18}F] FMISO foi avaliado.

Para tanto, foram preparadas uma solução aquosa do padrão de FMISO na concentração de 10 ppm e uma solução aquosa contendo simultaneamente, padrão de FMISO, precursor NITTP, desmetil imidazol e hidróxido de tetrabutilamônio na concentração de 10 ppm. Essas soluções foram injetadas no cromatógrafo a líquidos e o ensaio realizado em triplicata. Foram registrados os tempos de retenção, o número de pratos teóricos, e as áreas obtidas para cada um dos componentes das soluções preparadas. Então foram calculadas as médias e os desvios padrão dos resultados, comparados os tempos de retenção e as áreas obtidas e realizados os cálculos da resolução entre os picos obtidos.

Como critério de aceitação para este parâmetro os resultados obtidos para o FMISO não devem ser significativamente afetados pela presença dos interferentes, podendo as áreas e tempos de retenção diferir em no máximo 5% e a resolução entre os picos deve ser superior a 1,5 (EP 6.0/2008).

Linearidade

O ensaio de linearidade consistiu na avaliação da capacidade de o método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro da faixa definida como linear para a análise.

A linearidade foi determinada pela injeção, em triplicata, de cinco amostras do padrão de FMISO nas concentrações descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Soluções padrão de FMISO para avaliação da linearidade

Solução	Concentração (ppm)
1	0,2
2	0,4
3	0,6
4	0,8
5	1,0

Então foi realizada a análise das soluções em triplicata estabelecendo aleatoriedade entre as injeções, tanto em concentração como ordem de preparação. Foram obtidos dados relativos às áreas sob a curva para cada concentração e então calculado a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo. A partir disto, foram plotados gráficos de área sob a curva (eixo y) *versus* concentração (eixo x) e o gráfico de dispersão dos resíduos com a respectiva análise estatística. Ainda foram realizadas a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, para obter a equação da reta, o coeficiente de determinação (r^2) e o de correlação linear (r). Também foi realizada a análise da homocedasticidade dos dados, através do teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado. Para os testes estatísticos foram usados o nível de significância de 5% (RDC166/17).

Como critério de aceitação para este parâmetro a curva obtida deve possuir coeficiente de correlação (r) $\geq$ 0,990 e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero, além da verificação da homocedasticidade dos dados e não presença de *outliers* entre os resultados (RDC 166/17).

Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis:

- Repetibilidade: representa a concordância entre os resultados dentro de um curto intervalo de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação.
- Precisão Intermediária: concordância entre os resultados obtidos em um mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR), segundo as fórmulas:

$$DPR = 100\ \frac{s}{\bar{x}} \qquad (1)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum(X_n - \bar{X})^2}{n-1}} \qquad (2)$$

Onde: s = desvio padrão;

X_n = concentração determinada para cada replicata;

$\bar{X}$ = concentração média determinada;

n = número de replicatas.

Para análise da repetibilidade foram preparadas três soluções aquosas do padrão de FMISO com concentrações alta (1 ppm), média (0,6 ppm) e baixa (0,2 ppm). Foram realizadas análises em triplicatas de cada uma das soluções no mesmo dia e com o mesmo analista. Então foi determinado o valor do DPR das replicatas.

Para análise da Precisão Intermediária foram realizadas análises, em triplicata, de cada uma das soluções padrão usada no ensaio de repetibilidade em dias consecutivos com dois analistas diferentes, e então determinado o valor do DPR das replicatas.

Como critério de aceitação temos o valor máximo aceitável para o DPR das medidas até 5%.

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção foi avaliado para verificar a menor quantidade do analito presente na amostra de FMISO que pode ser detectado ainda que não necessariamente quantificado. Para tanto, foram utillizados os dados obtidos para avaliação da linearidade do método, e calculou-se o limite de detecção a partir da fórmula abaixo:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \qquad (3)$$

Onde: DPa = Desvio padrão do intercepto com o eixo Y;

IC = Inclinação da curva de calibração.

Já o limite de quantificação foi avaliado para verificar a menor quantidade do analito na amostra de FMISO que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Para isso, a partir dos resultados obtidos para a avaliação da linearidade do procedimento, foi calculado o limite de quantificação utilizando a fórmula abaixo:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \qquad (4)$$

Onde: DPa = Desvio padrão do intercepto com o eixo Y;

IC = Inclinação da curva de calibração.

Exatidão

A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, utilizando a formula a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3}\right) \text{ x } 100 \qquad (5)$$

Onde: C_1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada .

A exatidão foi verificada com nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada.

Para o cálculo da recuperação foram realizadas análise em triplicata de uma amostra de [^{18}F] FMISO fortificada com solução padrão de FMISO com concentrações de 0,4 ppm, 0,6 ppm e 0,8 ppm. Foi adicionado água purificada a uma amostra de [^{18}F] FMISO, assegurando a mesma diluição causada pela adição do padrão nas amostras fortificadas mencionadas anteriormente e realizadas a análise em triplicata. Então foi calculada a concentração de FMISO em cada solução utilizando a equação da reta obtida na avaliação da linearidade e calculada a recuperação da amostra.

Como critério de aceitação a recuperação do analito deve estar compreendida no intervalo de 80 a 120% (EUROPEAN PHARMACOPEIA 8.0, 2016).

Robustez

Para esta metodologia, as variações nos parâmetros foram no fluxo e no gradiente da fase móvel. Foram realizadas análises em triplicata da solução padrão de FMISO com concentração de 10 ppm utilizando diferentes fluxos da fase móvel: 0,95 mL/min, 1,0 mL/min e 1,5 mL/min, assim como, análises com diferentes valores para o gradiente da fase móvel da corrida cromatográfica, conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Alterações do gradiente da corrida do CLAE

Bloco	Tempo (min)	% Acetonitrila	% Água
Triplicata 1	0	10	90
	10	10	90
	20	95	5
	25	10	90
Triplicata 2	0	10	90
	10	8	92
	20	92	8
	25	10	90
Triplicata 3	0	10	90
	10	12	88
	20	97	3
	25	10	90

A partir dos dados de área sob a curva e tempo de retenção obtidos para cada condição avaliada foi calculada a resolução dos picos nos diferentes cromatogramas. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Como critério de aceitação foi definido que deve haver concordância entre o tempo de retenção e área obtida com variância de no máximo 5%.

3.4 Ensaios de estabilidade do [^{18}F] FMISO

A metodologia deste ensaio foi baseada no guia para realização de estudos de estabilidade de medicamentos (Resolução Nº01/2005 da ANVISA) e na Resolução 64/2009 que dispõe sobre o registro de radiofármacos. O ensaio de estabilidade consistiu na avaliação periódica das análises fisico-químicas e microbiológica, de três diferentes lotes de [^{18}F] FMISO sintetizados em três dias diferentes, exclusivamente para as análises

do estudo de estabilidade, simulando condições de estresse. A partir dos resultados obtidos, foi definido o prazo durante o qual o produto foi considerado estável, sendo então fixado o prazo de validade para o medicamento.

Com o propósito de avaliar a estabilidade do [^{18}F] FMISO produzido na UPPR/CDTN, amostras do referido radiofármaco foram avaliadas por até 7 horas (tempo necessário para utilização nos estudos de imagens PET e que o radiofármaco manteve suas propropriedades de pureza radioquímica) após sua síntese, em intervalos de 3,5 horas, totalizando 3 resultados de avaliação, incluindo o tempo inicial logo após o fim da síntese. Como o radiofármaco após síntese é acondicionado em um frasco ampola transparente multidose e fechado com uma tampa de borracha, sucessivas perfurações dessa tampa foram realizadas ao longo do estudo, simulando o uso real do produto.

O ensaio foi realizado nas condições de temperatura igual 40 ± 2 °C e umidade de 75 ± 5% UR. Esta é a condição mais crítica descrita na RE n° 1/2005 para forma farmacêutica líquida em embalagem semipermeável. O radiofármaco foi mantido no frasco-ampola de vidro com tampa, dentro da blindagem de tungstênio, em câmara climática qualificada. Nas condições propostas, de temperatura e humidade, foi possível avaliar o impacto da exposição do radiofármaco a condições fora daquelas que estão estabelecidas no rótulo do produto, o que pode ocorrer durante o seu transporte, por exemplo.

a) A estabilidade do produto foi avaliada por meio de análises físico-químicas e microbiológicas sendo os métodos utilizados descritos em compêndios oficiais ou devidamente validados;
b) Os testes realizados e sua periodicidade neste estudo estão apresentados na Tabela 9;

Tabela 9 - Cronograma usado para realização do estudo de estabilidade do [^{18}F] FMISO, contendo os intervalos de tempo e as referidas análises conduzidas.

Ensaios	Intervalos após fracionamento		
	0 h	**3,5 h**	**7 h**
Características	X	X	X
pH	X	X	X
Identificação radioquímica	X	X	X
Pureza radioquímica	X	X	X
Identificação radionuclídica	X	X	X
Pureza radionuclídica	X	X	X
Impurezas e Solventes residuais	X	X	X
Endotoxinas bacterianas	X		
Esterilidade	X		X
Integridade da membrana filtrante	X		

c) Para a realização dos ensaios físico-químicos foram retiradas alíquotas de 0,3 mL por vez e para a realização dos ensaios microbiológicos foi usado alíquotas de 2,3 mL;

d) O ensaio microbiológico de esterilidade foi realizado apenas no primeiro e no último intervalo de tempo, isto é: imediatamente após a síntese (tempo 0) e 7 horas após a síntese. Tal conduta se fez necessária devido uma restrição do volume do lote;

e) A tampa de borracha, conforme já discutido anteriormente, necessita ser perfurada ao longo do estudo. Com este intuito, mínimo de 15 perfurações foram realizadas visando simular condições reais de uso do produto e analisar a possibilidade de contaminação microbiana causadas por esta ação;

As especificações do [^{18}F] FMISO, estabelecidas com base na monografia deste radiofármaco descritas na Farmacopeia Europeia 8ª ed. (suplemento 8.8), estão representadas na Tabela 10. Para se estabelecer o prazo de validade do radiofármaco, deve-se considerar o atendimento integral às especificações.

Tabela 10 - Especificações do radiofármaco [^{18}F] FMISO conforme Farmacopeia Europeia 8º edição (EUR. PHARM., 2016).

Parâmetros	Especificação
Características	Solução límpida, incolor.
pH	Entre 4,0 e 8,0.
Identificação Radioquímica	O valor do T_R de ^{18}FMISO em cromatografia líquida de alta eficiência deve ser de aproximadamente 10 minutos.
Pureza Radioquímica	A radioatividade da amostra de ^{18}FMISO não deve ser inferior a 95% da radioatividade total.
Pureza Química (TBA)	O tamanho e a intensidade da mancha obtida para ^{18}FMISO não deve exceder os da mancha obtida para *TBA* padrão 100 µg/mL.
Determinação de Impurezas e Solventes Residuais	- Limite de Etanol: <10,0% - Limite de Acetonitrila: < 0,04% DPR ≤ 10,0% (injeção manual). A diferença entre os tempos de retenção dos solventes na solução padrão e no produto final deve ser inferior a 2%
Identificação Radionuclídica	O tempo de meia-vida médio deve estar entre 105 e 115 minutos.
Pureza Radionuclídica	Não menos do que 99,9% das emissões gamas devem corresponder a picos cuja energia seja de 511,0 ± 0,5 keV e 1022,0 ± 0,5 keV.
Integridade de Membrana Filtrante	Conforme especificações do fabricante.
Endotoxinas bacterianas	< 175 EU/dose
Esterilidade	Se, após 14 dias, não houver evidência de crescimento bacteriano, tanto nas amostras como nos controles negativos, o produto final é considerado estéril.

3.5 Ensaios *in vitro, ex vivo* e *in vivo.*

3.5.1 Estudos *in vitro*: citotoxicidade e genotoxicidade

- **Citotoxicidade**

Para avaliar a citotoxicidade do [^{18}F] FMISO, inicialmente foram recolhidos 10 ml de sangue de 6 doadores voluntários em tubos de heparina (Vacuette) para obter as

PBMCs (célula mononuclear de sangue periférico, do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) por meio de uma técnica de gradiente de concentração (FicollPaqueTM Plus, GE Healthcare Life Sciences, Suécia). As células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e após centrifugação (400g, 30 min, 20ºC), foi obtido um anel de PBMC que foi recolhido e contadas as células numa câmara de Neubauer.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripam (Sigma-Aldrich, EUA) e as células utilizadas apresentaram viabilidade maior que 98%. As amostras foram coletadas após aprovação de todos os voluntários do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (UFPE, Brasil nº 1.870.360 / 2016).

Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com soro fetal bovino a 10% (p/v) (Sigma-Aldrich, EUA) em placas de cultura celular a uma densidade de 10^6 células por poço. As culturas foram tratadas com diferentes concentrações de [^{18}F] FMISO após decaimento radioativo, e foram incubadas por 24 horas para análise. Os controles negativos foram realizados utilizando células não tratadas com [^{18}F] FMISO em meio de cultura. Os controles positivos utilizados foram Saponina e Ionomicina, substâncias indutoras de fenômenos citotóxicos e genotóxicos.

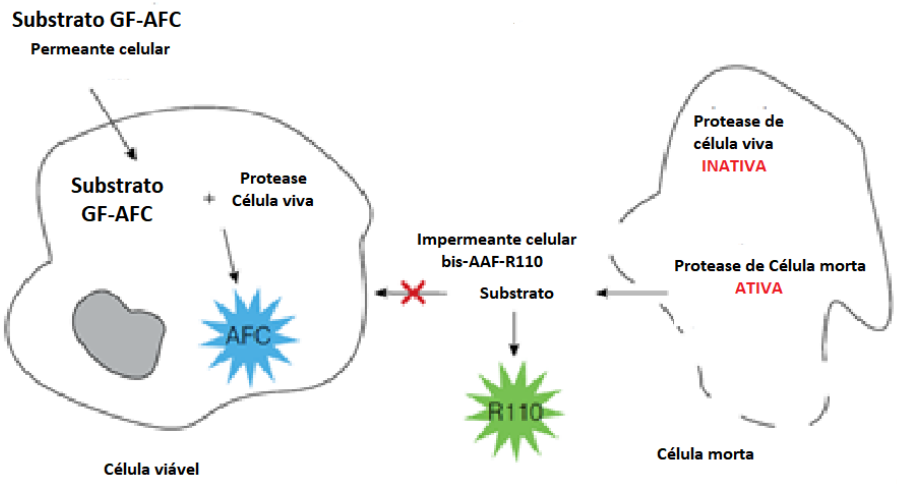
Para realização do teste foi utilizado o kit ApoTox-Glo^{TM} Triplex Assay (Figura 23), da marca Promega.

Figura 23 – Kit para avaliação de citotoxicidade ApoTox-Glo^{TM} Triplex Assay, Promega.

Este kit avalia de uma única vez três ensaios químicos: viabilidade celular, citotoxicidade e ativação da caspase (para mensurar a apoptose). Nas Figuras 24 e 25, estão esquematizadas como funcionam os substratos no interior das células de PBMC. O

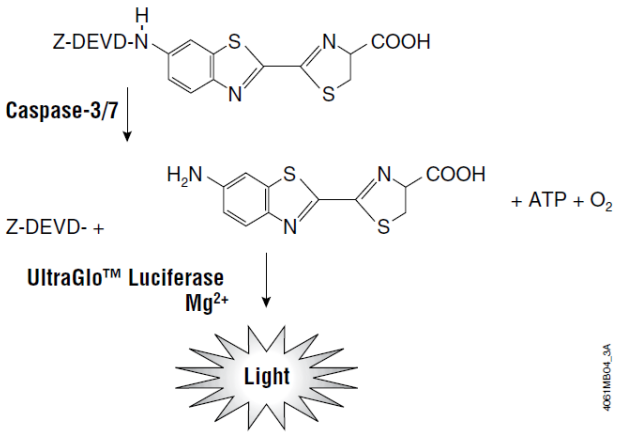
substrato GF-AFC pode entrar nas células vivas onde é clivado pelas proteases ali presentes e assim libera o AFC. O substrato bis-AAF-R110 não pode entrar em células vivas, mas pode ser clivado pelas proteases de células mortas liberando o R110, que produz fluorescência que é diretamente proporcional a quantidade de células mortas presentes no meio.

Figura 24 – Biologia do ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade.



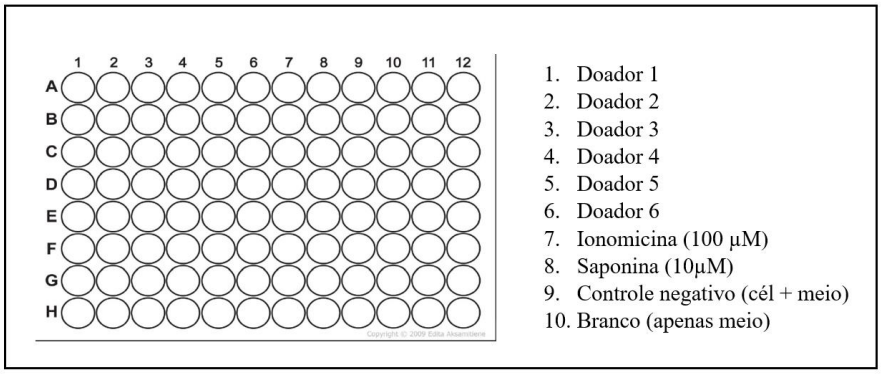
Num segundo momento do teste, segue a clivagem da caspase e então um substrato para luciferase (aminoluciferina) é liberado, resultando na reação da luciferase e produção de luz diretamente proporcional a quantidade de caspase que foi ativada (Figura 26).

Figura 25 – Clivagem da Caspase 3/7 do substrato luminogênico contendo a sequência DEVD.



Para realização do teste, as suspensões celulares de PBMC de 6 doadores humanos com concentração igual a 2 x 10^4 em 50 µL de meio RPMI completo. Essas suspensões celulares foram inoculadas em microplacas de 96 poços com fundo preto para ensaios de fluorescência e luminescência, conforme protocolo fornecido pelo fabricante do kit ApoTox-Glo Triplex Assay e incubadas por 24 h com três concentrações diferentes de [^{18}F] FMISO decaído (essas concentrações correspondem à atividade que é injetada no paciente (10 mCi), uma concentração 10 vezes menor (1 mCi) e outra 10 vezes maior (100 mCi) sendo proporcional ao volume de meio de cultura celular), controle negativo, controle positivo para viabilidade celular e citoxicidade (Saponina) e controle positivo para apoptose e necrose (Ionomicina), onde permaneceram com este estímulo por 24 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 em ensaios para análise do perfil citotóxico do [^{18}F] FMISO, conforme apresentado no esquema da Figura 26.

Figura 26 – Esquema para ensaio com ApoTox-Glo Triplex Assay.



Após incubação, foi adicionado 20 µL dos reagentes de viabilidade celular e citotoxicidade contendo os substratos GF-AFC e substrato bis-AAFR110 para todos os poços. Incubou-se a placa por mais 30 minutos e a levou para o equipamento de leitura GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader, marca Promega (Figura 27). A fluorescência foi medida em dois comprimentos de onda:

- $400_{\text{Excitação}}$ / $505_{\text{Emissão}}$ (viabilidade)
- $485_{\text{Excitação}}$ / $520_{\text{Emissão}}$ (citotoxicidade)

Figura 27 - GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader, Promega.

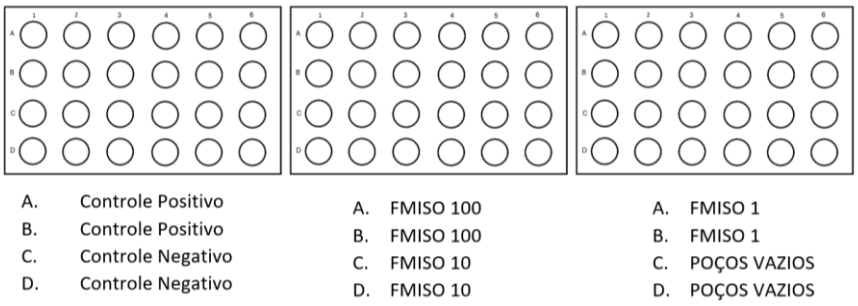
Logo após primeira leitura, foi adicionado 100 µL do reagente Caspase-Glo 3/7 a todos os poços e a placa foi incubada por mais 30 minutos, na temperatura ambiente. Então a luminescência foi medida novamente no equipamento.

- **Genotoxicidade**

O efeito genotóxico do [^{18}F] FMISO foi avaliado pelo ensaio de Micronúcleo. O isolamento de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foi utilizado seguindo o mesmo protocolo do ensaio de citotoxicidade descrito anteriormente.

Os PBMCs foram cultivados em meio RPMI completo em placas de cultura celular de 24 poços com superfície tratada e densidade de 10^6 células por poço. Todas as culturas foram tratadas incubadas por 48 horas com três concentrações diferentes [^{18}F] FMISO (essas concentrações correspondem à atividade que é injetada no paciente (10 mCi), uma concentração 10 vezes menor (1 mCi) e outra 10 vezes maior (100 mCi) sendo proporcional ao volume de meio de cultura celular), controle negativo, controle positivo (saponina) onde permaneceram com este estímulo por 24 horas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO2 em ensaios para análise do perfil genotóxico dos radiofármacos (Figura 28).

Figura 28 – Esquema de incubação das culturas de PBMC tratadas com [^{18}F] FMISO.



Ao fim da incubação, as amostras celulares foram transferidas para tubos de centrífuga e submetidas à centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o meio de cultura foi desprezado e as células foram ressuspensas com 1 mL de PBS (tampão fosfato-salino, pH = 7.4). Em seguida, 30 µL da suspensão celular foi transferida para lâminas previamente lavadas, ainda molhadas e na posição horizontal. Em seguida, estas foram deixadas para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto (P.A) por 5 minutos. Após a lavagem em água corrente, as mesmas foram submetidas à coloração com a utilização do corante Giemsa (Merck), o qual foi depositado de forma uniforme sobre as lâminas, por um tempo médio de 5 minutos, sendo em seguida lavadas com água corrente e novamente secas a temperatura ambiente. Então as células com micronúcleos foram observadas em microscópio óptico em objetiva de imersão. Cerca de 1000 células por indivíduo foram analisadas, sendo contabilizadas as células micronucleadas. Foram incluídas as células com um ou mais micronúcleos.

3.5.2 Estudos *ex vivo* e *in vivo*: Biodistribuição e imagem PET

- Estudos de biodistribuição

Os estudos de biodistribuição do [^{18}F] FMISO foram realizados com camundongos sadios da espécie *Mus musculus*, da linhagem Swiss, para avaliação da distribuição fisiológica. Para estimar o número de animais que seriam utilizados no estudo, foi feito um

cálculo do número amostral (n1) (equação 6), considerando um desvio máximo (s) de 0,40 (40%) e uma diferença esperada entre os grupos (d) de 0,8 (80%). Considerando o poder do teste de 90% e nível de significância de 0,05, o valor de C será de 10,51. Assim, foi obtido um valor de n1 igual 6,25.

$$n1 = 1 + [2 \times C \times (s/d)2] \text{ daí,}$$
$$n1 = 1 + [2 \times 10{,}51 \times (0{,}40/0{,}8)\ 2] = 6{,}25 \qquad (2)$$

Para os estudos de biodistribuição foram utilizadas as bases físicas e a infraestrutura da Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos (UPPR) do CDTN (registro na CNEN 01341-000383/2011-89 para uso de radiofármacos) para manutenção temporária dos animais. Uma área dentro do laboratório de Bioensaios foi dedicada para as estantes ventiladas. Os camundongos foram alojados em gaiolas plásticas contendo maravalha, respeitando o limite de 5 (cinco) animais por caixa. Os animais receberam ração comercial à vontade e água *ad libitum*. Todos os camundongos foram submetidos a um regime de 12 horas de luz e 12 horas sem luz em estante ventilada própria com ar filtrado.

As amostras de [^{18}F] FMISO utilizadas para os estudos foram previamente aprovadas pelo controle de qualidade, atendendo a todos os requisitos das especificações. Foram utilizados um total de 36 camundongos divididos em 6 grupos experimentais (n=6): grupos 1 a 5 foram utilizados para biodistribuição *ex vivo* nos tempos correspondentes aos tempos de eutanásia de 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após administração de [^{18}F] FMISO; grupo 6 foi utilizado para aquisição de imagem PET.

Alíquotas de 100 μL contendo de 0,45 a 0,65 μCi de [^{18}F] FMISO foram administradas via intravenosa caudal. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após os tempos de eutanásia definidos para cada grupo e amostras de sangue foram obtidas através de punção cardíaca. Foram retirados baço, bexiga, cérebro, coração, fígado, intestino grosso, intestino delgado, músculo, pulmão, rins e cauda que em seguida foram pesados e colocados em tubos de ensaios para serem analisados no contador Gama de poço (Wizard 2480, Perkin Elmer, Wallac, Finland; Eficiência de contagem para 0,511MeV: 48%) para determinação da radioatividade. A radiação de fundo ou *background* foi subtraída e correções foram feitas devido ao decaimento radioativo durante as contagens. Os resultados finais foram expressos como porcentagem de dose injetada por grama de

tecido (% DI/g), conforme equação 7. A curva de eliminação da [^{18}F] FMISO no sangue foi construída a partir da coleta de 20 μL de sangue dos animais eutanasiados durante o ensaio de biodistribuição e os resultados finais foram expressos como porcentagem de dose injetada por mililitro de sangue (% DI/mL) (equação 8). Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

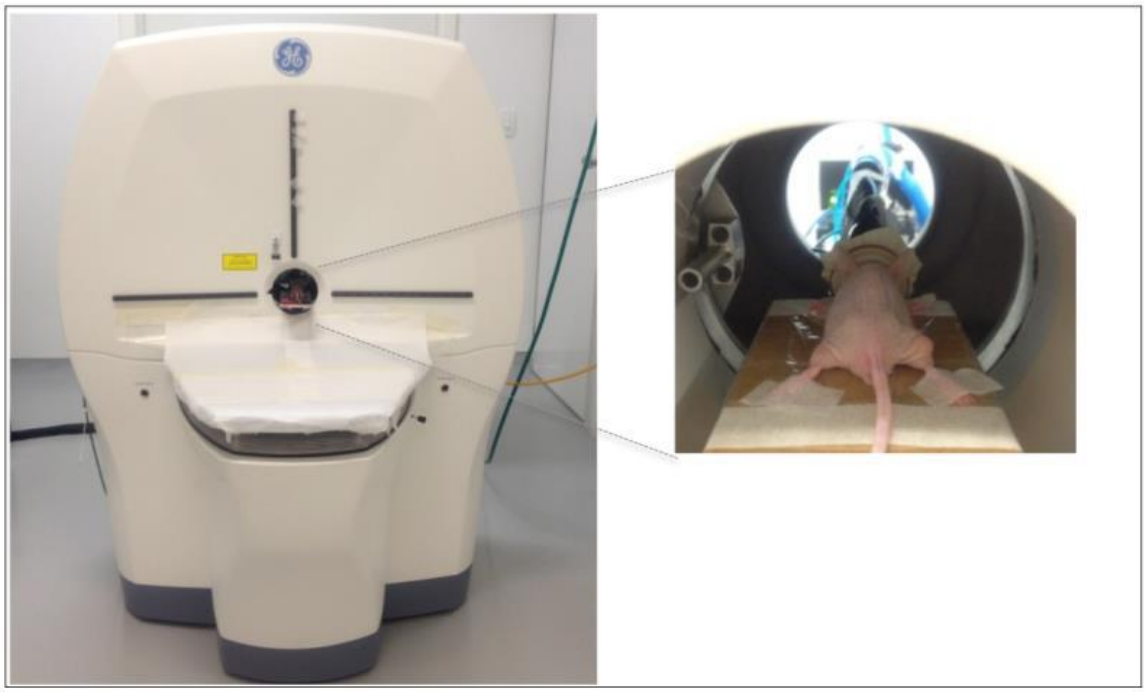
$$\%\frac{DI}{g} = \frac{cpm\ órgão}{(cpm\ padrão) x\ peso\ órgão\ (g)}\ x\ 100 \qquad (3)$$

$$\%\frac{DI}{mL} = \frac{(cpm\ 20\mu L\ sangue)}{(cpm\ padrão) x\ 0{,}02}\ x\ 100 \qquad (4)$$

- Aquisição de imagens utilizando o MicroPET

As imagens PET foram adquiridas por um tomógrafo para pequenos animais (microPET) fabricado pela *General Electric Healthcare,* modelo LabPET 4 (Figura 29). Este equipamento é totalmente digital baseado em um dispositivo eletrônico de fotodiodos (*avalanche photodiodes*, APD). O sistema de detecção consiste em pares de cristais LYSO/ LGSO com dimensões 2 x 2 x 12 mm^3. Cada par de cristal acoplado a um APD é chamado de canal, e são ao todo 1536 canais. O FOV (*field of view* – campo de visão) transverso mede 11 cm e o axial mede 4 cm e resolução espacial de cerca de 1 mm FWHM no centro do equipamento. A sensibilidade do equipamento, considerando uma janela de energia de 250 a 650 KeV, é aproximadamente 1,1%.

Figura 31 - MicroPET da GE Healthcare® –Modelo LabPET4 do CDTN



Fonte: SILVEIRA, 2016.

Para obtenção das imagens foram utilizados 6 camundongos *Swiss* sadios. Os animais receberam ração comercial à vontade e água *ad libitum*. Todos os camundongos foram submetidos a um regime de 12 horas de luz e 12 horas sem luz em estante ventilada própria com ar filtrado. Foram administrados em torno de 18 MBq de [^{18}F] FIMISO e as imagens feitas 2 horas após injeção. O anestésico utilizado foi isoflurano, 1 a 3% em oxigênio (100%), para manter o animal parado durante todo o período de aquisição. Após conclusão do período de aquisição, foi realizada a reconstrução das imagens através do método *Maximum Likelihood Expectation Maximization* (MLEM) (BERGERON *et al.*, 2009). O AMIDE (*A Medical Image Data Examiner*, versão 0.8.19; Andy Loening) foi utilizado para quantificação a partir da seleção de regiões de interesse (*region-of-interest*, ROI), considerando áreas com 2 ou 3 mm para os principais tecidos e órgãos (LOENING; GAMBHIR, 2003). Nas imagens, regiões de interesse (ROI) esféricas foram posicionadas no local de captação mais intensa de órgão ou tecido. Na Tabela 11 está apresentado o protocolo de imagem utilizado.

Tabela 11 – Protocolo utilizado para aquisição e reconstrução das imagens PET.

Aquisição Estática	
Atividade injetada	18MBq
Tempo por posição de cama	3 minutos
Número de posições de cama	5
Reconstrução	
Método utilizado	MLEM-3D
FOV	4 mm
Número de iteração	20

4 RESULTADOS

4.1 Síntese e controle de qualidade do [^{18}F] FMISO

Todas as sínteses do [^{18}F] FMISO foram monitoradas (Figura 30) quanto ao caminho em que o 18-Flúor percorreu pelo cassete, por meio de 4 detectores de radioatividade posicionados no módulo de síntese, que permitem o acompanhamento em tempo real da atividade.

Figura 31 - Planilha de dados para monitoração da atividade do Flúor 18.

Execução da síntese: célula 4 coletado na própria

Atividade enviada pelo cíclotron: _____ MBq Início da síntese: _____ h

ETAPA	Tempo aproximado após início da síntese (min)	ATIVIDADE (MBq)	% Ativid. Inicial	HORÁRIO
1º Calibrador (recepção ^{18}F)	1		100	
2º Calibrador (eluição ^{18}F)	5			
Antes da 1ª adição ACN	9			
Depois da 3ª adição ACN	11			
Início marcação	14			
Início resfr. após marcação	19			
Início hidrólise	21			
Início evaporação ACN	26			
Início reduç de temp.	33			
Início transf. p/ 1ª seringa	35 (anotar no fim da etapa anterior)			
Depois transf. p/ 1ª seringa	35			
Antes adição agua ao reator	36			
Durante agua no reator	36			
Após retirada de agua do reator	36			
No reator após carregar cartuchos	40			
Fim da síntese	53'	-----	-------	

Após a síntese

Atividade _____: _____ mCi/ _____MBq as_____ h. Rendimento não corrigido: _____

Foram utilizados cinco protocolos de produção do [^{18}F] FMISO. A primeira configuração utilizada foi seguindo a síntese padrão preconizada pela ABX que consistiu em fixar a temperatura de marcação em 105 °C e temperatura de hidrólise igual a 85 °C. Ao término da síntese foi calculado o rendimento da amostra e encontrado o valor de 22,51%, após correção de decaímento esse valor passou a ser igual a 31,45%. Na Tabela 12 estão apresentados os resultados dos testes de controle de qualidade do [^{18}F] FMISO.

Tabela 12 - Resultados do controle de qualidade de [^{18}F] FMISO da síntese padrão ABX.

Teste	Critérios	Faixa Encontrada
pH	4,5 – 8,5	5,83
Tetrabutilamônio (µg/mL)	< 100 µg/mL	< 50 µg/mL
Acetonitrila (%V/V)	0,04% V/V	0,0015%
Etanol (%V/V)	< 10% V/V	4,575%
Pureza Radioquímica (%)	≥ 95%	99%
Identidade Radionuclídica	$t_{1/2}$ = 105 - 115 min	111,1 min
Pureza Radionuclídica	> 99,5%	100%
Atividade Específica (EOS)	-	99,50 GBq/µmol

Com a finalidade de diminuir o tempo de produção do [^{18}F] FMISO que inicialmente era de 53 minutos e, principalmente, verificar a influência da temperatura de marcação no resultado final da síntese, foi proposta uma diminuição na temperatura de marcação do composto para 85 °C. A principal diferença observada foi a diminuição no rendimento de síntese que caiu para 12,58% e após correção de decaímento passou a ser 17,68%. Em relação ao controle de qualidade, a variação da temperatura não afetou os resultados finais (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultados do controle de qualidade de [^{18}F] FMISO com temperatura de marcação de 85 °C.

Teste	Critérios	Faixa Encontrada
pH	4,5 – 8,5	5,87
Tetrabutilamônio (µg/mL)	< 100 µg/mL	< 50 µg/mL
Acetonitrila (%V/V)	< 0,04% V/V	0,005%
Etanol (%V/V)	< 10% V/V	3,566%
Pureza Radioquímica (%)	≥ 95%	99,25%
Identidade Radionuclídica	$t_{1/2}$ = 105 - 115 min	109,2 min
Pureza Radionuclídica	> 99,5%	100%
Atividade Específica (EOS)	-	77,53 GBq/µmol

Ainda com o objetivo de verificar a influência da temperatura de marcação no resultado final da síntese, um aumento na temperatura de marcação do composto para 130 °C foi proposto (Tabela 14). Fazendo um comparativo entre os rendimentos dos demais protocolos verificou-se que o aumento da temperatura influenciou de forma positiva no rendimento da síntese. Neste protocolo houve um aumento para 27,85% e após correção passou a ser 39,16%. Assim, julgou-se que a alteração foi positiva e esse protocolo foi eleito como padrão para o [^{18}F] FMISO e foi o utilizado para os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Tabela 14 - Resultados do controle de qualidade de [^{18}F] FMISO com temperatura de marcação de 130 °C

Teste	Critérios	Faixa Encontrada
pH	4,5 – 8,5	5,85
Tetrabutilamônio (µg/mL)	< 100 µg/mL	< 50 µg/mL
Acetonitrila (%V/V)	< 0,04% V/V	0,009%
Etanol (%V/V)	< 10% V/V	4,924%
Pureza Radioquímica (%)	≥ 95%	98,95%
Identidade Radionuclídica	$t_{1/2}$ = 105 - 115 min	111,2 min
Pureza Radionuclídica	> 99,5%	100%
Atividade Específica (EOS)	-	70,85 GBq/µmol

No quarto protocolo de síntese, optou-se em mudar a montagem do cassete substituindo o catalisador da reação de síntese tetrabutilamônio (TBA) por Kryptofix (Ky) com a finalidade de melhorar o rendimento da síntese. Ao término da produção foi calculado o rendimento da síntese e encontrado o valor de 7,43%, após correção esse valor passou a ser igual a 10,45%. Apesar de na literatura afirmar que a presença de Ky possibilita o aumento do rendimento da reação, esse fenômeno não foi observado neste estudo (TANG *et al.*, 2005; ZHENG *et al*., 2015; KAMARAINEN *et al.*, 2004). Ainda houve um aumento na quantidade de impurezas em relação ao TBA (Tabela 15).

Tabela 15 - Resultados do controle de qualidade de [^{18}F] FMISO da síntese com Ky em substituição do TBA.

Teste	Critérios	Faixa Encontrada
pH	4,5 – 8,5	5,90
Kryptofix (µg/mL)	< 50 µg/mL	< 25 µg/mL
Acetonitrila (%V/V)	< 0,04% V/V	0,004%
Etanol (%V/V)	< 10% V/V	5,294%
Pureza Radioquímica (%)	≥ 95%	100%
Identidade Radionuclídica	$t_{1/2}$ = 105 - 115 min	105,1 min
Pureza Radionuclídica	> 99,5%	100%
Atividade Específica (EOS)	-	74,46 GBq/µmol

A redução no volume do eluente etanol 5% na formulação do [^{18}F] FMISO seria positiva para o paciente, já que implicaria na redução dos riscos de toxicidade da formulação, principalmente para aqueles que sofrem de problemas hepáticos. Além disso, quanto menor o teor de etanol em medicamentos injetáveis maior a segurança em relação à hemólise e à dor local.

A partir de levantamentos bibliográficos, compreendeu-se a possibilidade de se assumir o uso de um menor volume de etanol na formulação caso os resultados fossem melhores do que os obtidos até então.

Assim, optou-se por desenvolver outro tipo de síntese com outra montagem, chamada de protocolo 5, usando etanol 5% em água para injeção com volume igual a 7 mL

em vez de 20 mL. Os resultados estão na Tabela 16. Todas as sínteses e controle de qualidade foram executados da mesma maneira, sem variação no modo de preparo, nem na programação automática da síntese, com exceção da temperatura de marcação quando foi solicitado no protocolo.

Ao final da síntese foi calculado seu rendimento e encontrado o valor de 7,35%. Apesar dos benefícios da formulação final, esse protocolo não seria comercialmente viável, pois atenderia uma menor quantidade de paciente por síntese, aumentando os custos da produção. Além disso, a formulação apresentou pH fora da faixa de aceitação estabelecidos pelos compêndios que se referem à radiofármacos marcados com flúor.

Tabela 16 - Resultados do controle de qualidade de [18F] FMISO da síntese com 7 mL de etanol 5%.

Teste	Critérios	Faixa Encontrada
pH	4,5 – 8,5	4,42
Tetrabutilamônio (µg/mL)	< 50 µg/mL	< 50 µg/mL
Acetonitrila (%V/V)	< 0,04% V/V	0,0137%
Etanol (%V/V)	< 10% V/V	4,838 %
Pureza Radioquímica (%)	≥ 95%	97,97%
Identidade Radionuclídica	$t_{1/2}$ = 105 - 115 min	106,4 min
Pureza Radionuclídica	> 99,5%	100%
Atividade Específica (EOS)	-	45,45 GBq/µmol

Na Tabela 17 está apresentado um resumo com as modificações realizadas nos protocolos assim como os rendimentos obtidos em cada um deles. Nandy e colaboradores, em um estudo realizado em 2010, variaram a temperatura e tempo de marcação do [^{18}F]FMISO (110 ºC, 15 min; 125 ºC, 7 min; 135 ºC, 5 min e 145 ºC, 3 min) assim como utilizou quatro condições diferentes de hidrólise (105 ºC, 10 min; 110 ºC, 7 min; 115 ºC, 5 min; 125 ºC, 3 min) para determinar a eficiência de radiomarcação. Corroborando com este trabalho, os autores obtiveram maior rendimento nas sínteses quando o precursor foi marcado com as maiores temperaturas.

Tabela 17 – Modificações realizadas nos protocolos de síntese.

Protocolo	Rendimento	Características	Tempo
1	31,45%	T de marcação = 105°C T de hidrólise = 85°C	50 min
2	17,68%	T de marcação igual a 85°C T de hidrólise igual a 85°C	45 min
3	**39,16%**	**T de marcação igual a 130°C** **T de hidrólise igual a 85°C**	**54 min**
4	10,45%	Substituição do TBA → Ky	50 min
5	17,68%	Volume de EtOH 5% - 20 ml → 7 ml	50 min

Zheng e colaboradores em 2015, foram aumentando a temperatura de marcação do [^{18}F]FMISO num intervalo que variou de 60 ºC até 180 ºC. A marcação foi acompanhada por radio-TLC. Neste estudo foi observado que a marcação da molécula variou de 20 até 80% quando a temperatura variou de 10 e foi até 120 ºC. O rendimento chegou 90% quando a temperatura atingiu 170 ºC e aumentou para 92% quando atingiu 180 ºC. Esses estudos apresentados mostram que a temperatura de marcação tem forte influência no rendimento obtido na síntese do radiofármaco.

4.2 Validação da metodologia de pureza química e radioquímica

O método proposto é alternativo ao descrito na Farmacopeia Europeia (EP 8.0) e melhor se adapta às condições da Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos do CDTN. Dependendo do procedimento de síntese do [^{18}F] FMISO, o precursor NITTP e Desmetil imidazol podem estar presentes no produto acabado. Assim, a partir da validação da técnica o procedimento fica assegurado quanto a quantificação das substâncias presentes e possíveis interferentes presentes no composto. Abaixo estão descritos os resultados dos ensaios de validação para a metodologia de pureza química e radioquímica.

Especificidade e Seletividade

Na Tabela 18, estão dispostos os resultados obtidos para a injeção de amostra contendo apenas o padrão de FMISO 10 ppm. Nas tabelas 19, 20 e 21 estão dispostos, respectivamente, os resultados correspondentes aos picos cromatográficos do [^{18}F] FMISO, desmetilmisonidazol e precursor NITTP e TBA obtidos pela injeção de amostra composta por mistura dessas substâncias em concentração de 10 ppm.

Tabela 18 - Resultados obtidos para amostra de FMISO 10 ppm

Padrão FMISO	Área (mAU)	TR (s)	Pratos teóricos (N)	Simetria
Replicata 1	432	587	19789	0,973
Replicata 2	422	586	19001	0,996
Replicata 3	433	591	19895	1,003
Média	429	588	19561	0,991
Desvio padrão	6,410	2,65	488	0,020
DPR	1,490	0,45	2,50	1,580

Tabela 19 - Resultados obtidos para padrão de FMISO em presença de Desmetilimidazol e NITTP (10 ppm)

	Parâmetros				
FMISO	Área (mAU)	TR (s)	Pratos teóricos (N)	Simetria	Resolução
Replicata 1	406	586	16751	0,975	24,810
Replicata 2	407	586	17776	1,006	25,310
Replicata 3	407	590	17592	0,963	25,070
Média	406	587	17373	0,981	25,060
Desvio padrão	0,69	2,31	546	0,020	0,250
DPR	0,17	0,39	3,15	2,260	1,000

Tabela 20 - Resultados obtidos para amostra NITTP em presença de Desmetilmisonidazol e FMISO (10 ppm)

NITTP	Parâmetros				
	Área (mAU)	TR (s)	Pratos teóricos (N)	Simetria	Resolução
Replicata 1	199	1293	248233	0,886	24,810
Replicata 2	198	1294	248180	0,856	25,310
Replicata 3	201	1295	251782	0,962	25,070
Média	199	1294	249398	0,901	25,060
Desvio padrão	1,42	21294	2064	0,050	0,250
DPR	0,08	1,00	0,83	6,06	1,00

Tabela 21 - Resultados obtidos para amostra de Desmetilmisonidazol em presença de NITTP e FMISO (10 ppm)

Desmetil	Parâmetros				
	Área (mAU)	TR (s)	Pratos teóricos (N)	Simetria	Resolução
Replicata 1	5309	282	14286	0,98	11,040
Replicata 2	5326	284	14772	1,02	11,210
Replicata 3	5302	286	14292	0,90	11,110
Média	5312	284	14450	0,97	11,120
Desvio padrão	12	2,00	278,88	0,06	0,090
DPR	0,23	0,70	1,93	6,44	0,770

De posse dos resultados encontrados é possível concluir que as impurezas desmetilmisonidazol e precursor NITTP não afetam a análise do FMISO quando o método analítico proposto é utilizado. Com efeito, os valores de tempo de retenção encontrado para o FMISO não foram significativamente alterados na presença desses contaminantes.

Igualmente, a resolução entre os picos para o FMISO, que foi avaliada na ausência e na presença dos contaminantes NITTP e desmetil, imidazol apresentou em todos os casos valores superiores ao critério de aceitação (>1,5). Este resultado comprova a especificidade e seletividade do método.

Na figura 31 está apresentado o cromatograma típico obtido para a injeção do padrão de FMISO na concentração de 10 ppm. A Figura 2, por sua vez, apresenta o cromatograma da injeção de FMISO na presença dos contaminantes Desmetilmisonidazol e NITTP.

Figura 31 - Avaliação da determinação do padrão (FMISO)

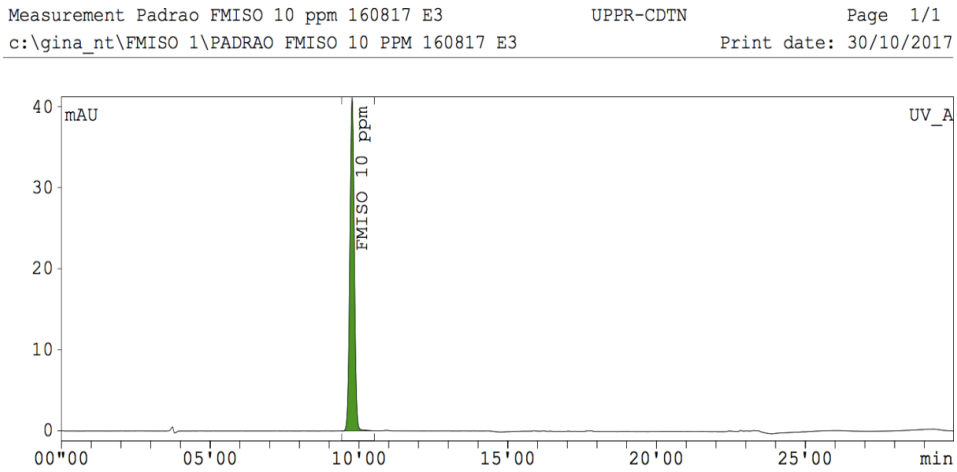
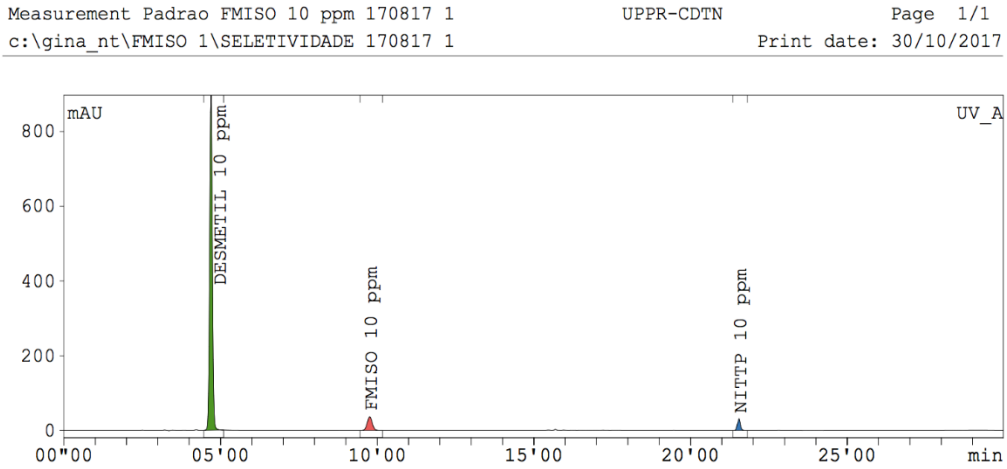


Figura 32 - Cromatograma da avaliação da determinação do padrão (FMISO) na matriz em presença dos contaminantes (Desmetilmisonidazol e NITTP)



Linearidade

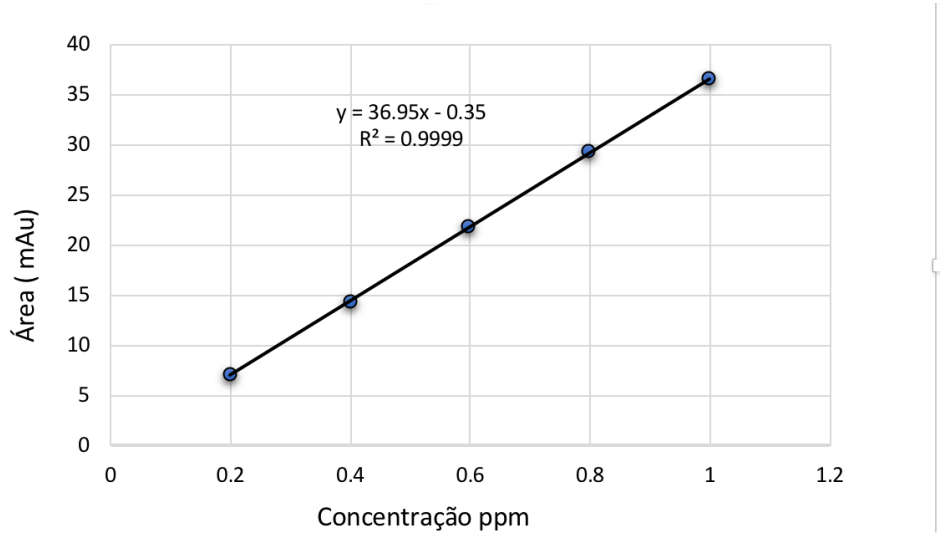
Estão dispostos na Tabela 22 os resultados de avaliação da linearidade para o FMISO. Esses dados passaram por conveniente tratamento estatístico para verificar o cumprimento dos requisitos definidos pela RDC 166/2017. Os detalhes do tratamento estão apresentados no apêndice.

Tabela 22 - Resultados da avaliação da linearidade para [^{18}F] FMISO: Dados originais

Ponto	Concentração(ppm)	Área (mAU)	Média
1	0,2	4,093	4,555
2		4,153	
3		5,419	
4	0,4	8,664	8,448
5		7,9262	
6		8,753	
7	0,6	13,824	12,679
8		11,725	
9		12,490	
10	0,8	17,504	16,518
11		15,368	
12		16,681	
13	1,0	21,914	20,589
14		19,115	
16		20,740	

Na figura 33 está a representação gráfica para a regressão linear obtida a partir da aplicação do tratamento estatístico do método dos mínimos quadrados aos resultados obtidos.

Figura 33 - Representação gráfica das áreas obtidas em função da concentração do FMISO



O coeficiente de correlação (r) determinado foi de 0,9999, valor conforme o estabelecido pela RDC 116/2017. Para a avaliação do desvio de linearidade foi utilizado o teste ANOVA que constatou ser a regressão linear significativa e sem desvios de linearidade.

A investigação da homocedasticidade dos resíduos foi feita a partir da utilização do teste de Brown-Fosythe Ou Levene modificado (ver apêndice). Concluiu-se, pelos resultados do teste, que os dados são homocedásticos, visto que as variâncias dos desvios não são estatisticamente significativas. Logo, o método analítico está validado satisfatoriamente relativo ao parâmetro de linearidade.

Precisão

a) Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada por meio de nove amostras de padrões de FMISO. As concentrações utilizadas foram triplicatas de 0,2 ppm, 0,6 ppm e 1 ppm. Os resultados estão dispostos na Tabela 23. Como os valores obtidos para o desvio padrão relativo (DPR) são inferiores ao limite máximo aceitável de 5% de variação, o método avaliado está validado para o parâmetro de repetibilidade.

Tabela 23 - Resultados da avaliação da repetibilidade para o padrão de FMISO

Definição de concentração	Replicatas	Concentração teórica do padrão FMISO (ppm)	Área UV (mAu)	Parâmetro	Resultado
Alta	1	1,0	33,943	Média	33,92
	2	1,0	33,929	DP	0,02
	3	1,0	33,897	DPR	0,06
Média	1	0,6	22,010	Média	22,08
	2	0,6	22,216	DP	0,12
	3	0,6	22,015	DPR	0,54
Baixa	1	0,2	7,104	Média	7,19
	2	0,2	7,172	DP	0,03
	3	0,2	7,231	DPR	0,42

b) Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pela análise de 9 determinações do padrão de FMISO, sendo triplicatas das concentrações de 0,2 ppm, 0,6 ppm e 1,0 ppm. O estudo foi feito em 3 diferentes dias sendo em cada dia executado por um diferente analista. Os resultados obtidos de mais outros dois analistas estão detalhados nas Tabelas 24 e 25. Os valores de DPR obtidos foram inferiores a 5%, indicando que o método cumpre o critério de aceitação para este parâmetro.

Tabela 24 - Avaliação da precisão intermediária para FMISO dia 2/ Analista 2

Definição de concentração	Replicatas	Concentração teórica do padrão FMISO (ppm)	Área UV (mAu)	Parâmetro	Resultado
Alta	1	1,0	33,192	Média	33,467
	2	1,0	33,599	DP	0,238
	3	1,0	33,613	DPR	0,713
Média	1	0,6	21,774	Média	21,764
	2	0,6	21,768	DP	0,012
	3	0,6	21,749	DPR	0,058
Baixa	1	0,2	7,603	Média	7,632
	2	0,2	7,519	DP	0,114
	3	0,2	7,747	DPR	1,495

Tabela 25 - Avaliação da precisão intermediária para FMISO dia 3/ Analista 3

Definição de concentração	Replicatas	Concentração teórica do padrão FMISO (ppm)	Área UV (mAu)	Parâmetro	Resultado
Alta	1	1,0	34,389	Média	34,370
	2	1,0	34,096	DP	0,260
	3	1,0	34,619	DPR	0,760
Média	1	0,6	20,337	Média	21,220
	2	0,6	21,985	DP	0,830
	3	0,6	21,338	DPR	3,910
Baixa	1	0,2	8,549	Média	8,160
	2	0,2	7,961	DP	0,340
	3	0,2	7,956	DPR	4,180

Quanto à precisão, o procedimento analítico desenvolvido apresentou para a repetibilidade em cada um dos três níveis analisados (concentração alta, média e baixa) DPR inferior ao máximo aceitável de 5%. O mesmo foi encontrado na análise do parâmetro de precisão intermediária por 2 outros analistas em dias diferentes. É possível constatar ainda que os desvios padrões encontrados foram baixos, significando que os dados não apresentaram resultados com divergências significativas entre si. Conclui-se, portanto, que o procedimento foi satisfatoriamente validado para o parâmetro de precisão.

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Com base nos resultados obtidos para avaliação da linearidade do procedimento e aplicação das respectivas fórmulas, foram obtidos 0,0021 ppm para o limite de detecção e 0,0071 ppm para o limite de quantificação.

Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da análise, em triplicata, de amostras de [^{18}F] FMISO fortificadas com o padrão de FMISO em três diferentes concentrações: baixa, média e alta. Os resultados obtidos no ensaio foram representados na Tabela 26. Na Tabela 27 o tratamento dos dados e cálculo da recuperação média são apresentados.

Tabela 26 - Resultados do teste de recuperação para determinação da exatidão.

Fortificado com:	Atividade	Concentração amostra	Concentração amostra+padrão	Área amostra+padrão	Recuperação
0,8	Alta 1	0,544	1,27	46,615	90,810
	Alta 2	0,544	1,38	50,543	104,090
	Alta 3	0,544	1,40	51,503	107,340
0,6	Média 1	0,544	1,10	40,426	93,180
	Média 2	0,544	1,17	42,702	103,44
	Média 3	0,544	1,19	43,787	108,330
0,2	Baixa 1	0,544	0,94	34,329	98,540
	Baixa 2	0,544	0,97	35,570	106,920
	Baixa 3	0,544	0,99	36,134	110,740

Tabela 27 – Tratamento dos dados recuperados

Concentração média	Área média	Recuperação média
1,35	49,55	100,75
1,15	42,30	101,65
0,97	35,44	105,40

Relativamente ao parâmetro de exatidão, o critério de aceitação para recuperação foi compreendido no intervalo entre 80 – 120%. Conforme os dados encontrados o parâmetro foi satisfeito, estando, pois, o procedimento validado para este parâmetro.

Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da injeção de solução padrão de FMISO em triplicata, em diferentes condições cromatográficas. Os resultados obtidos para a variação no fluxo da fase móvel (0,95 mL/min, 1 mL/min e 1,05 mL/min) estão representados respectivamente nas Tabelas 28. A concentração da fase móvel constituída por acetonitrila e água foi variada em termos de acetonitrila conforme apresentado na Tabela 29 e os resultados estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 28- Resultados global da análise do parâmetro robustez para FMISO devido a variação do fluxo.

	Fluxo 0,95	Fluxo 1,0	Fluxo 1,05	Média	Desvio	DPR (%)
Área (mAU)	36,17	34,08	33,68	34,64	1,34	3,86
Tempo de retenção (s)	592,33	594,33	588,33	591,66	3,056	0,52

Tabela 29- Concentração da fase móvel.

Bloco	Tempo (min)	% Acetonitrila	% Água
Triplicata 1	**0**	**10**	**90**
	10	**10**	**90**
	20	**95**	**5**
	25	**10**	**90**
Triplicata 2	**0**	**10**	**90**
	10	**8**	**92**
	20	**92**	**8**
	25	**10**	**90**
Triplicata 3	**0**	**10**	**90**
	10	**12**	**88**
	20	**97**	**3**
	25	**10**	**90**

Tabela 30 - Resultados global da análise do parâmetro de robustez para FMISO devido à variação de gradiente

	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 3	Média	Desvio	CV (%)
Área (mAU)	34,07	34,28	36,07	34,81	1,10	3,86
Tempo de retenção (s)	594,33	604,67	572,33	590,44	16,51	2,80

Os resultados encontrados para o parâmetro de robustez avaliado apresentaram valores inferiores a 5% para DPR tanto nas alterações deliberadas de fluxo, quanto de gradiente de concentração da fase móvel. Os tempos de retenções foram igualmente consistentes e dentro do estabelecido de 5%. Desta forma, os resultados asseguram validação do procedimento quanto ao parâmetro de robustez para pequenas alterações deliberadas de fase e fluxo.

Com a validação do procedimento de validação analítica concluída, a realização do estudo de estabilidade pode ser realizada, pois confere confiança aos resultados obtidos. De fato, como argumentam Rambla-Alegre, Esteve-Romero e Carda-Broch (2011), a principal importância de uma validação analítica é a garantia da obtenção de resultados corretos e, ao mesmo tempo, a capacidade de comprovar essa obtenção correta.

4.3 Estudo de Estabilidade do [^{18}F] FMISO

O prazo pretendido para utilização do radiofármaco é de 7 horas após a sua síntese para que seja viável sua utilização em estudos com animais (biodistribuição e imagens PET). Dessa forma, avaliou-se a estabilidade da ^{18}FMISO produzida no CDTN durante esse período definido após o tempo final de síntese.

Os resultados obtidos para a avaliação da estabilidade do [^{18}F] FMISO, conforme o protocolo, e para cada um dos três lotes produzidos, estão individualmente apresentados na Tabela 31.

Tabela 31 - Resultados dos ensaios para três lotes de ^{18}FMISO produzidos para o estudo de estabilidade. Análise em três diferentes intervalos de tempo.

Parâmetros	**Dia 1 – Lote FMS120517**			**Dia 2 - Lote FMS160517**			**Dia 3 –- Lote FMS230517**		
	0 h	**3,5 h**	**7 h**	**0 h**	**3,5 h**	**7 h**	**0h**	**3,5 h**	**7 h**
Características	Solução límpida incolor	Solução límpida incolor	Solução límpida incolor	Solução límpida incolor	Solução límpida incolor	Solução límpida incolor	Solução límpida incolor	Solução límpida incolor	Solução límpida incolor
pH (pHmetro)	5,64	5,58	5,54	5,75	5,76	5,70	5,82	5,70	5,70
$T_{1/2}$ (min)	110,8	108,3	109,3	109,3	108,2	108,1	109,8	109,0	108,4
Pureza radionuclídica (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Pureza radioquímica CLAE (%)	99,56%	98,93%	99,78%	99,40%	98,12%	98,28%	99,48%	98,50%	98,58%
Identificação radioquímica T_R (≈ 600s)	605	604	604	563	552	556	617	600	609
Pureza química (µg/mL)	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
Solventes residuais (%)	EtOH: 3,057	EtOH: 5,459	EtOH: 3,7189	EtOH: 3,7469	EtOH: 4,0192	EtOH: 3,9327	EtOH: 3,23	EtOH: 4,9893	EtOH: 4,8447
	ACN: 0,0045	ACN: 0,0086	ACN: 0,0057	ACN: 0,0011	ACN: 0,0016	ACN: 0,0013	ACN: 0,0016	ACN: 0,0023	ACN: 0,0023
Endotoxinas (EU/mL)	< 5,0	-	-	< 5,0	-	-	< 5,0	-	-
Esterilidade	Estéril	-	Estéril	Estéril	-	Estéril	Estéril	-	Estéril
Integridade do filtro (≥ 50 psi)	60	-	-	58	-	-	60	-	-

*EtOH: etanol; ACN: acetonitrila;

Analisando os resultados obtidos para o estudo de estabilidade, temos que as características da solução se mantiveram dentro dos conformes ao longo de todo o período de análise e para os três lotes analisados. O efeito da temperatura e umidade nas soluções não apresentou nenhuma influência física. Elas se mantiveram límpidas e incolores, atestando a não formação de particulados ou sedimentados.

Os valores de pH medidos variaram entre 5,54 – 5,82. Este pH está de acordo com o preconizado para o radiofármaco, que são valores entre 4,0 e 8,0. Ao longo das 7 horas, todos os lotes analisados conservaram o valor de pH dentro da faixa aceitável. Os resultados para o pH foram considerados conforme, de acordo com o protocolo executado e o tempo analisado.

Os resultados obtidos para o tempo de meia-vida e pureza radionuclídica foram ambos compatíveis com os resultados preconizados, que são, respectivamente, 105 - 115 minutos para o tempo de meia-vida e, para a pureza radionuclídica, não menos do que 99,9% das emissões gamas correspondendo a picos cuja energia seja de 511,0 ± 0,5 keV e 1022,0 ± 0,5 keV. Desta forma este parâmetro manteve-se estável durante o estudo.

A pureza radioquímica e identificação radioquímica, dois dos mais importantes parâmetros do estudo de estabilidade realizado, foram analisados a partir da utilização do método utilizando a CLAE validado. Tais valores encontrados foram devidamente compatíveis com os valores preconizados para o [^{18}F] FMISO nas condições de produto estável. O tempo de retenção encontrado para o [^{18}F] FMISO, próximo a 600 s foi suficiente a identificar precisamente o pico associado ao [^{18}F] FMISO. A pureza radioquímica determinada esteve acima do valor mínimo exigido de 95%, confirmando a estabilidade do produto nas condições analisadas e no tempo analisado.

Os solventes residuais determinados nos lotes analisados no estudo de estabilidade apresentaram valores dentro do limite estabelecido pela Farmacopeia Europeia (EUR. PHARM., 2016) a saber, porcentagem de etanol inferior a 10% e porcentagem de acetonitrila inferior a 0,04 %. Essa condição foi observada ao longo de todo o estudo realizado, confirmando a adequabilidade do produto relativo aos solventes residuais por até 7 horas após processo de síntese.

O teste de esterilidade apresentou resultados negativos para crescimento de microorganismos após 14 dias de incubação e monitoramento. Isso permite assegurar que o radiofármaco se manteve isento de contaminação bacteriana até 7 horas após a preparação e, portanto, adequado para o uso, mesmo após sucessivas perfurações na tampa, simulando o uso real do produto.

Finalmente, o teste de integridade de filtro realizado através do teste de bolha permitiu comprovar que o mesmo se manteve íntegro durante o processo de filtragem, sendo esta mais uma prova da esterilidade, visto que o filtro usando no processo de filtração

esterilizante final não apresentava rompimento. Para a filtragem de cada lote, apenas um filtro esterilizante é utilizado. Isto justifica a realização de apenas um teste de filtro para cada estudo de estabilidade realizado.

Relativamente ao ensaio de endotoxinas, este foi realizado apenas imediatamente após a síntese. A considerar pelo curto tempo de meia-vida do radioisótopo e observando o resultado do teste de esterilidade que confirmaram ser os lotes analisados estéreis tanto imediatamente após síntese quando após as 7 horas, justifica-se a realização do teste de endotoxinas apenas no início. Com efeito, se a amostra foi isenta de contaminação e levando em consideração que microrganismos são a principal fonte de endotoxinas, conforme defende Ramachandran (2014), repetidas análises de endotoxinas ao longo do estudo de estabilidade não se fazem necessárias, desde que seja mapeada a esterilidade no início e fim do estudo, conforme o procedimento adotado. Finalmente, os resultados das análises realizadas de endotoxinas deram abaixo de 5 UE/ml (que é o limite de detecção) para todos os lotes analisados. Este valor está abaixo do exigido que deve ser de 175 UE/V ou 11,67 UE/ml, considerando envase de 15 ml.

Compete ressaltar que a ANVISA estabelece que a frequência de testes para o estudo de estabilidade deve ser de pelo menos cinco pontos. No entanto, o trabalho conduzido baseou na coleta de apenas três pontos para análise da estabilidade do [^{18}F] FMISO. No entanto, o resultado experimental obtido com a coleta e análise de apenas 3 pontos se mostrou satisfatória, fornecendo resultados que permitiram avaliar a estabilidade do radiofármaco em atendimento a todos os requisitos estabelecidos pela Farmacopeia Europeia. Além disso, não se observou alterações significativas entre o primeiro e o último ponto coletado, ou entre estes e o ponto intermediário. Neste caso específico, coletas menos espaçadas adicionais (perfazendo os cinco pontos) seriam úteis a determinar com maior precisão o momento de início ou as condições de eventos que desencadeariam as eventuais alterações do produto.

4.4 Ensaios *in vitro, ex vivo e in vivo.*

4.4.1 Ensaios *in vitro*: citotoxicidade e genotoxicidade

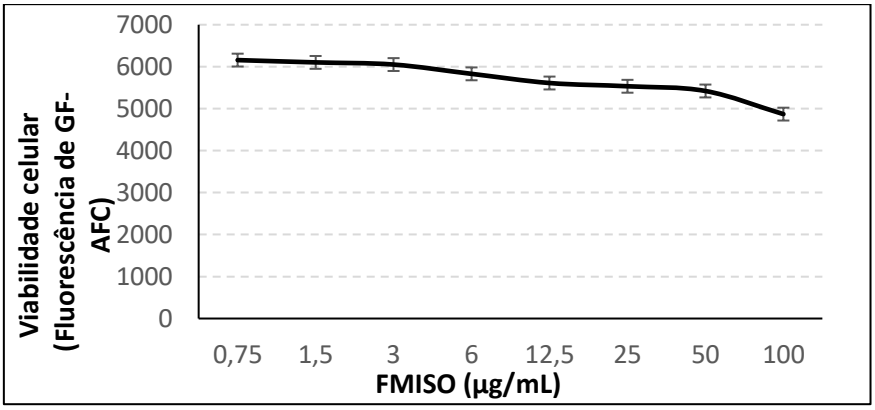
- **Citotoxicidade**

Os estudos de citotoxicidade e genotoxicidade foram conduzidos com intuito de analisar o potencial citotóxico e genotóxico da solução final do [^{18}F] FMISO. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por teste ANOVA *one-way*, utilizando o software GraphPad Prism 7.02. Foi considerado um valor de nível de significância $p > 0.05$. De modo geral, as avaliações dos resultados dos estudos com [^{18}F] FMISO em células de PBMCs humano não expressaram efeitos citotóxicos e genotóxico para nenhuma das concentrações testadas, sendo todas estatisticamente semelhante ao controle negativo.

Vale ressaltar que foram testadas concentrações de até 10 vezes a concentração administrada nos pacientes. A atividade injetada em um paciente adulto é 370 MBq (10 mCi) que, fazendo a conversão para o volume sanguíneo de um indivíduo adulto de 70 kg, corresponde a 2 µCi/mL, concentração para a qual não foi observado nenhum efeito citotóxico no estudo *in vitro*.

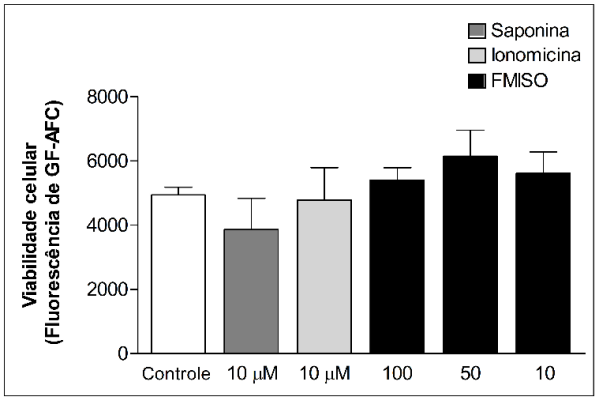
Conforme observado na figura 34, as células de PBMCs de humanos não apresentaram alterações significativas de viabilidade celular em função do aumento da concentração do [^{18}F] FMISO.

Figura 34 – Ensaio para avaliação da viabilidadade celular em função da variação das concentrações de [^{18}F] FMISO.



Confirmando o resultado apresentado acima, na Figura 35 está a comparação das concentrações das amostras de [^{18}F] FMISO aos controles negativos e positivos (Saponina e Ionomicina) que influenciaram na diminuição da viabilidade celular. Nota-se que a taxa de viabilidade celular nas amostras contendo [^{18}F] FMISO apresentou valores maiores que as amostras de controles positivos.

Figura 35 – Índice de viabilidade celular das culturas teste tratadas com [^{18}F] FMISO (0.1x, 1x, 10x; concentrações que equivalem a 0.1, 1 e 10 vezes a concentração máxima administrada em pacientes por procedimentos clínicos), controle negativo e controles positivos que induz efeitos citotóxicos.



Em relação ao teste de apoptose (estimadas pela ativação de caspases 3/7), o aumento do nível da caspase 3/7 observado na Figura 36, não foi suficiente para causar morte celular a ponto de caracterizar o [^{18}F] FMISO como uma substância apoptótica para as células de PBMCs tratadas com as diferentes concentrações. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre si, comprovado estatisticamente ($p \geq 0,05$; ANOVA). Estes resultados podem ser confirmados analisando o gráfico de barras da Figura 37. Nele observa-se o estudo comparativo entre as 3 concentrações teste com os controles negativos (que não receberam tratamento com o radiofármaco) e positivos (que foram tratadas com substâncias que induz apoptose).

Figura 36 – Avaliação da taxa de apoptose pela ativação da caspase 3/7 variando as concentrações de [^{18}F] FMISO.

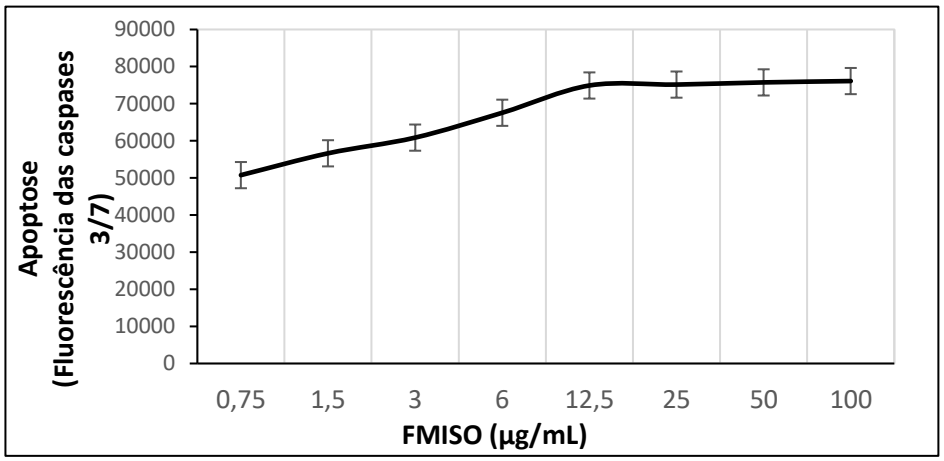
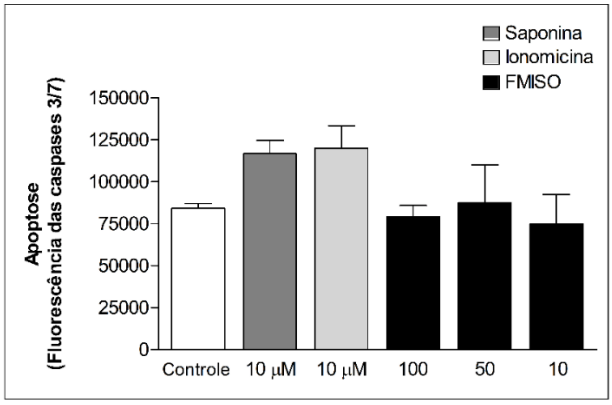


Figura 37 - Índice de apoptose das células das culturas teste tratadas com [^{18}F] FMISO (0.1x, 1x, 10x; concentrações que equivalem a 0.1, 1 e 10 vezes a concentração máxima administrada em pacientes por procedimentos clínicos), controle negativo e controles positivos que induz efeitos citotóxicos.



Em relação aos ensaios de citotoxicidade, o [^{18}F] FMISO não foi um produto tóxico para as células de PBMCs em nenhuma das concentrações testadas. O aumento do efeito citotóxico apresentado na Figura 38, nas células de PBMCs tratadas com as concentrações mais elevadas de [^{18}F] FMISO não apresentaram diferenças significativas para as concentrações menores. Esse resultado foi comprovado estatisticamente pelo Teste ANOVA ($p \geq 0,05$; ANOVA). No gráfico de barras estão comparadas as 3 concentrações teste com os controles negativos (que não receberam tratamento com o radiofármaco) e positivos (que foram tratadas com substâncias citotóxicas) (Figura 39).

Figura 38 – Ensaio do efeito citotóxico em função da variação das concentrações de [^{18}F] FMISO frente a cultura de células de PBMCs de humanos.

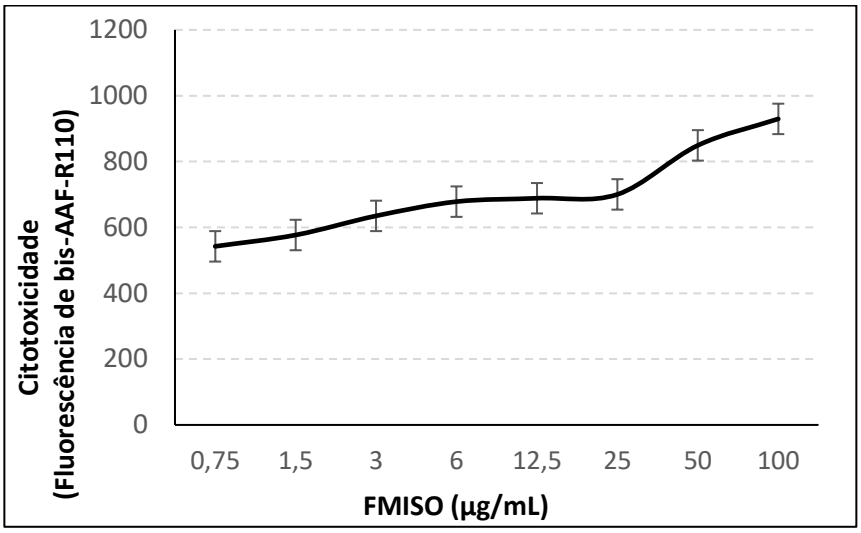
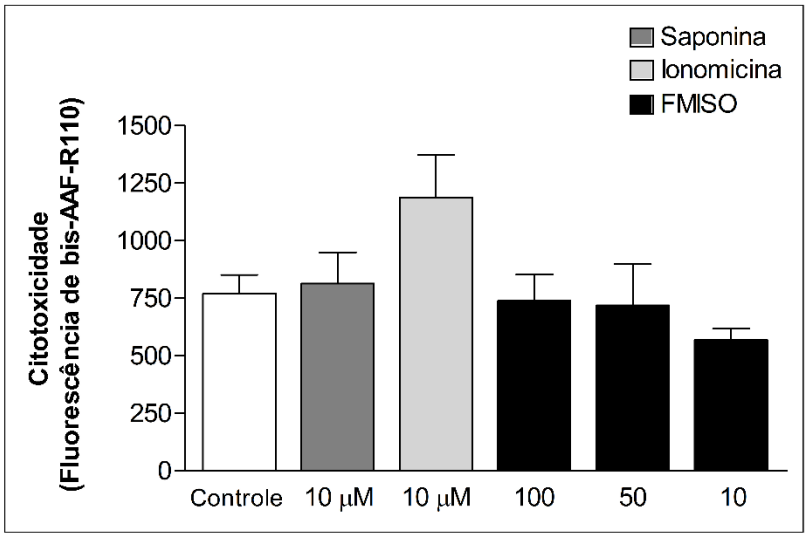


Figura 39 - Ensaio do efeito citotóxico nas células das culturas teste tratadas com [^{18}F] FMISO (0.1x, 1x, 10x; concentrações que equivalem a 0.1, 1 e 10 vezes a concentração máxima administrada em pacientes por procedimentos clínicos), controle negativo e controles positivos que induz efeitos citotóxicos.



Os resultados encontrados para citotoxicidade para o [^{18}F] FMISO estão de acordo com o esperado. Este radiofármaco é derivado de um composto nitroimidazólico já amplamente avaliado frente a microrganismos anaeróbicos e protozoários, sendo utilizado como antiparasitários, imunossupressor, além de apresentar atividade contra tumores hipóxicos (MORETH *et al.*, 2010; BOECHAT *et al*., 2015; IND, 2009). Vale ressaltar que a quantidade da substância com ação farmacológica para síntese de qualquer radiofármaco é muito pequena, na ordem de picomolares (SAHA, 2010).

Os conhecimentos dos efeitos tóxicos de 2-nitroimidazóis em humanos baseiam-se, principalmente, no misonidazol, um análogo do fluoromisonidazol. Em meados dos anos 70, foram realizados estudos em humanos com derivados nitroimidazólicos em pesquisas clínicas envolvendo tumores hipóxicos. O objetivo foi sensibilizar esses tumores à níveis citotóxicos de radiação para que eles obtivessem característica de tecidos normóxicos. Esses estudos utilizaram doses consideradas eficazes para aumentar a citotoxicidade da radioterapia. Não foram relatados efeitos prejudiciais até doses cumulativas que excederam alguns gramas, o que é de aproximadamente cinco a seis vezes maior do que a dosagem necessária para a imagens PET (IND, 2009).

Estudos clínicos que empregam doses múltiplas de MISO também foram relatados e sintomas como neuropatia periférica foi a manifestação de toxicidade que se tornou limitante da dose com doses diárias de 3-5 g/mL,5 vezes por semana. Os resultados desse estudo demonstram a proporcionalidade da dose da toxicidade primária do fármaco durante administração crônica em doses que excedem em muito as utilizadas em imagens PET. Limitando a dose total e não administrando mais do que duas doses em uma semana a toxicidade foi minimizada (IND, 2009).

A toxicidade primária do FMISO é a neuropatia periférica, que depende da frequência e do nível de dose administrada. Não há evidência para sugerir que o FMISO representa um risco para neuropatia periférica quando administrado como agente PET como aqui descrito. O risco para essa doença parece, de fato, ser minimizado ou ausente mesmo em doses terapêuticas que excedem em muito as necessárias para a imagem PET (IND, 2009).

A dose máxima para humanos relatada em protocolos de imagem foi de 1 mg/kg ou 70 mg para um homem de 70 kg. Nenhum evento adverso foi relatado. Isso corresponde a

cerca de 0,1% da DL50 (Dose Letal: dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50% de uma população em teste). As doses totais para realização de imagens nos pacientes contêm formulação radiofarmacêutica ≤ 15 μg de fluoromisonidazol e menos de 35 μg de outros derivados do nitroimidazol. Isso é <0,001% da DL50. A droga não teve efeitos tóxicos nessas doses com base em uma revisão de 5400 pacientes incluídos em estudos com MISO e mais de 269 pacientes estudados com doses de [^{18}F] FMISO (OVERGAARD, 1994).

- **Genotoxicidade**

Para mensurar os efeitos genotóxicos do [^{18}F] FMISO, as amostras celulares foram analisadas por meio do Teste de Micronúcleo (FENECH E MOLEY, 1985a) com uma pequena modificação em relação a atividade mitogênica e a aplicação do bloqueador de ciclo celular, citocalasina. Este teste representa um ensaio bem estabelecido para o biomonitoramento de populações humanas como um indicador de instabilidade genética e dano por radiação (ERIDGE *et al*., 2003).

Os dados reunidos na Tabela 32, apresentam a frequência de micronúcleo (FMN) observadas em células PBMC após exposição as diferentes concentrações do radiofármaco [^{18}F] FMISO (1, 10 e 100 mCi). Estes dados demonstram que houve diferenças estatisticamente significativas de FMN, quando comparados aos grupos controle negativo e ao grupo exposto a concentração de 100 mCi, tendo obtido um nível de confiança de 95% e o valor de *p*, estatisticamente significativo igual 0,02. Estes dados demonstram que o [^{18}F] FMISO nas concentrações acima de 10 mCi, poderá apresentar efeito genótoxico, induzindo a formação de micronúcleo em células PBMC normais. Nas demais concentrações, 1 e 10, os resultados obtidos para FMN não foram estatisticamente significativos, sendo observado na concentração de 1 mCi valores semelhantes ao controle negativo.

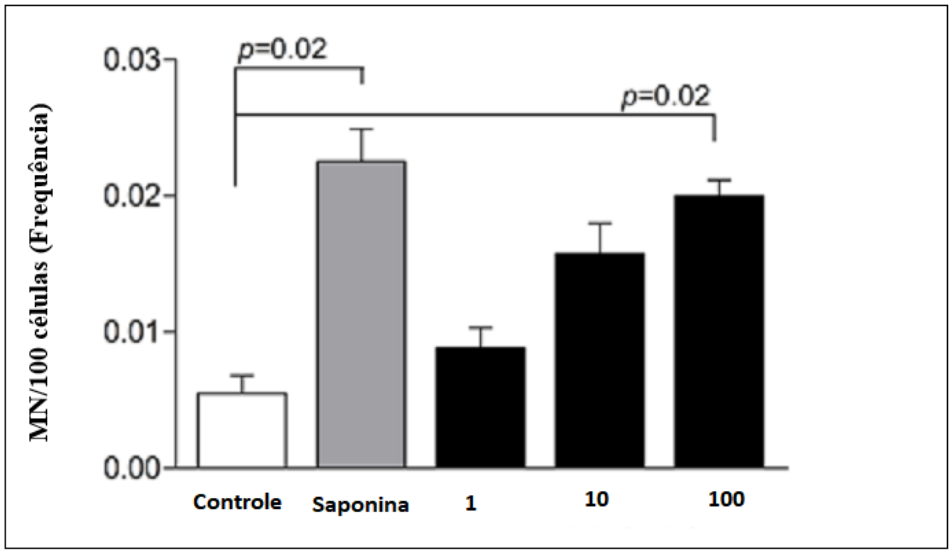
Tabela 32 - Frequência de micronúcleo em células PBMC após 48h de cultivo celular com o radiofármaco [^{18}F] FMISO em diferentes concentrações.

Doadores	Controles			Tratamentos (mCi)								
	[a]CN	[b]MN	[c]FM	1			10			100		
				CN	MN	FMN	CN	MN	FMN	CN	MN	FMN
1	1002	4	0,004	898	8	0,008	835	19	0,022	921	21	0,022
2	1001	6	0,006	916	11	0,012	856	17	0,019	948	19	0,020
3	1004	3	0,003	1007	7	0,007	880	13	0,014	893	19	0,021
4	1000	5	0,005	1005	9	0,009	1004	15	0,014	1005	21	0,020
5	1004	7	0,007	920	10	0,010	879	20	0,022	911	25	0,027
6	1005	4	0,004	850	8	0,009	989	18	0,018	890	24	0,026

[a]CN (Células normais), [b]MN (micronúcleo), [c]FMN (frequência de micronúcleo).

Na comparação do grupo controle negativo com o controle positivo (saponina) (Figura 40), foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa (p>0,02), pela alta frequência de micronúcleo formada em relação ao grupo controle. As saponinas ou saponosídeos são glicosídeos do metabolismo secundário vegetal, caracterizados pela formação de espuma, tendo propriedades de detergentes e surfactantes (BELCAVELLO *et al.*, 2012). Este glicosídeo tem sido usado em estudos citotoxicidade como controle positivo devido ao seu alto potencial citotóxico e genotóxico (DE BONA *et al*., 2012). Quando comparado o grupo controle negativo ao o grupo tratado na concentração de 100 mCi foi possível observar diferenças estatisticamente significativas, tendo o valor de p>0,02. Para os demais tratamentos, 1 e 10, não houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo e o grupo controle positivo. Nas concentrações abaixo de 10 mCi, os dados sugerem que não há efeito genotóxico estatisticamente significativo, sendo confirmada pela baixa frequência de micronúcleo observada.

Figura 40. Frequência de micronúcleos em células PBMC humanas após 48 horas de cultivo nas diferentes concentrações do radiofármaco[^{18}F] FMISO.



Vários estudos descobriram transformações genéticas devido à exposição de misonidazol e nitroimidazóis utilizando ensaios *in vitro*. Linhagem celular murina (fibroblastos de embrião de camundongo) tem uma frequência normal de transformação espontânea $<10^{-5}$, mas estas sofreram transformação oncogênica *in vitro* quando expostos a agentes químicos e físicos. A frequência de transformações genéticas com 3 dias de exposição ao fármaco 1 mM foi de 2,27± 0,38 x 10^{-4} para FMISO e 4,55 ± 0,95 x 10^{-4} para misonidazol. Esses valores são cerca de três a cinco vezes ao que é administrado ao paciente, este nível de exposição ao medicamento requer cerca de 10 gramas da droga em um ser humano (IND, 2009). Estudos de imagem injetarão ≤ 15 μg ou cerca de 0,00015%. A exposição a medicamentos para exames de imagem está muito abaixo dos níveis de genotoxicidade observado.

4.4.2 Ensaios de Biodistribuição e imagens PET

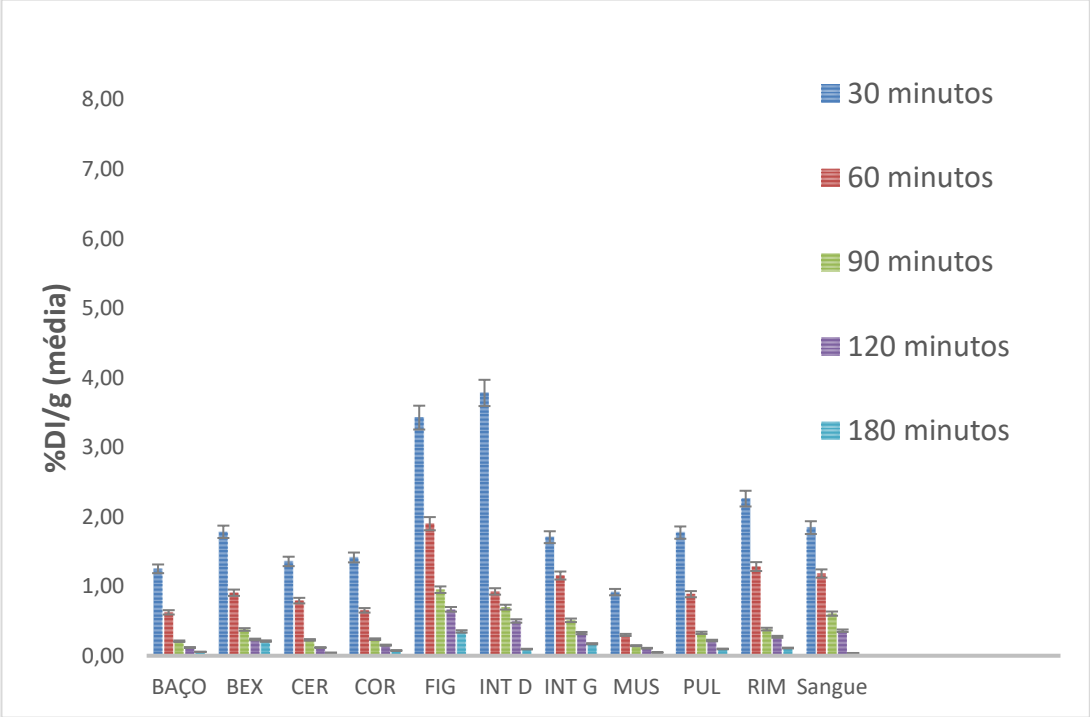
O ensaio de biodistribuição foi conduzido com 6 animais por grupo de tempo, todos sadios. Os tempos utilizados foram baseados no perfil de biodistribuição apresentado no trabalho de Liu e colaboradores (2008). A partir desse trabalho, foram escolhidos os tempos de 30, 60, 90, 120 e 180 minutos para traçar o perfil de distribuição do radiofármaco [^{18}F] FMISO nos órgãos através do tempo.

Os resultados de biodistribuição do [^{18}F] FMISO em camundongos *Swiss* sadios encontram-se na Tabela 32 e na Figura 40. De acordo com os dados apresentados, pode-se observar que a captação do radiofármaco no tempo de 30 e 60 minutos ainda é muito elevada. Essa captação diminui consideravelmente no tempo de 90 minutos, não sendo observada diferença na captação dos órgãos.

Tabela 33 - Biodistribuição de [^{18}F] FMISO em camundongos sadios em função do tempo.

Órgão	%DI/g				
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Baço	1,25 ± 0,11	0,62 ± 0,24	0,20 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,05 ± 0,00
Bexiga	1,78 ± 0,31	0,90 ± 0,17	0,37 ± 0,15	0,23 ± 0,03	0,21 ± 0,03
Cérebro	1,35 ± 0,17	0,79 ± 0,19	0,22 ± 0,07	0,11 ± 0,02	0,04 ± 0,01
Coração	1,41 ± 0,18	0,65 ± 0,10	0,23 ± 0,06	0,15 ± 0,03	0,07 ± 0,01
Fígado	3,42 ± 0,39	1,89 ± 0,51	0,95 ± 0,20	0,66 ± 0,10	0,35 ± 0,10
Intestino Delgado	3,78 ± 1,23	0,92 ± 0,46	0,69 ± 0,26	0,50 ± 0,17	0,09 ± 0,05
Intestino Grosso	1,70 ± 0,45	1,15 ± 0,45	0,51 ± 0,15	0,32 ± 0,06	0,17 ± 0,04
Músculo	0,91 ± 0,31	0,29 ± 0,11	0,14 ± 0,04	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,01
Pulmão	1,77 ± 0,21	0,88 ± 0,36	0,32 ± 0,12	0,21 ± 0,06	0,09 ± 0,05
Rim	2,26 ± 0,27	1,28 ± 0,63	0,38 ± 0,06	0,27 ± 0,05	0,11 ± 0,04
Sangue	1,84 ± 0,58	1,18 ± 0,25	0,60 ± 0,15	0,36 ± 0,10	0,03 ± 0,00

Figura 41 - Perfil de captação do [18F] FMISO por tempo em cada órgão e no sangue.



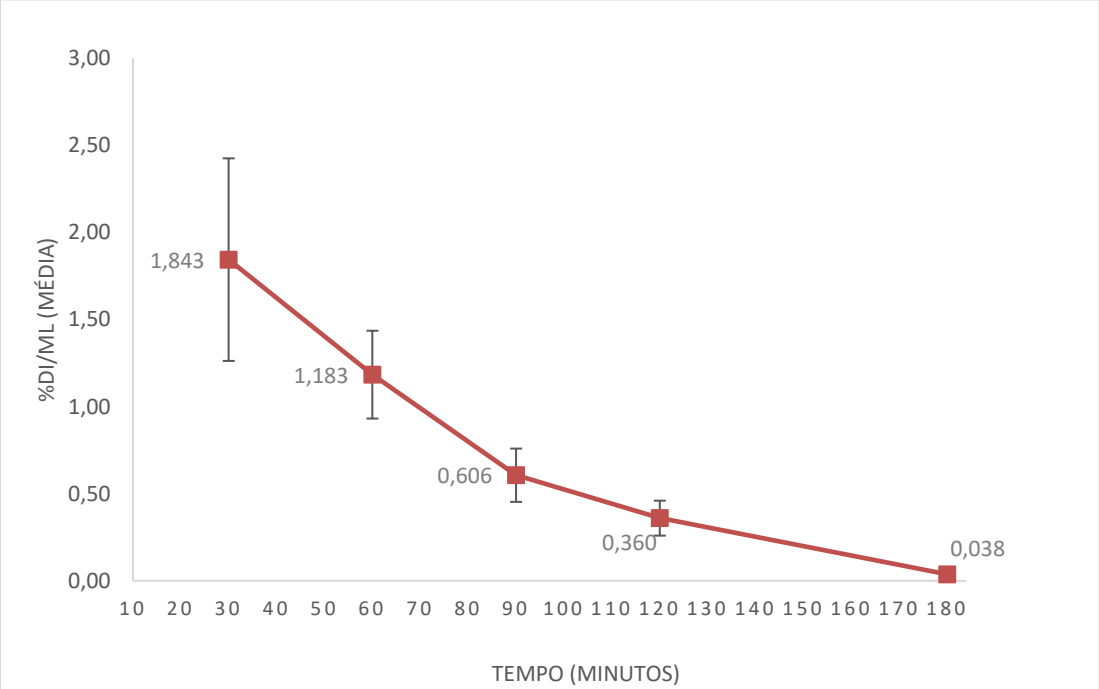
Se tratando individualmente de cada órgão, pode-se observar que houve uma maior captação do [^{18}F] FMISO pelo fígado, intestinos e rins. Esses achados estão de acordo com o fato de que o [^{18}F] FMISO é uma molécula relativamente lipofílica (coeficiente de partição = 0,40, log P = −0,40) (FERNANDEZ *et al*., 2013). Estudos apontam que, em humanos, a excreção de [^{18}F] FMISO na urina é mínima, em torno de 3% da dose total injetada, por ser metabolizado no fígado e intestino, principalmente. Porém, seus metabólitos são tipicamente excretados na urina (83% aos 95 minutos pós-injeção) (CHENG *et al*., 2016). Esses achados mostram que a eliminação deste radiofármaco não é exclusivamente pela via renal, mas também através do sistema hepato- biliar devido à sua maior lipofilicidade (CHENG *et al*., 2015). Também foi relatado que uma grande quantidade de bactérias anaeróbias presentes no intestino grosso pode resultar em alta absorção intestinal de [^{18}F] FMISO (LIU *et al.*, 2009).

A curva de clareamento sanguíneo em modelo animal utilizando camundongos Swiss, fêmeas, adultas e sadias está demonstrada na Figura 42. Os cálculos se basearam na porcentagem da dose injetada por mililitro de sangue (DI%/mL) em função do tempo após

administração do radiofármaco. Observa-se que o [^{18}F] FMISO, uma vez na corrente sanguínea, permanece com seus níveis elevados, apresentando dose inicial relativamente alta por grama de sangue e depuração lenta de, aproximadamente, 90 minutos pós injeção sendo lentamente distribuído até o fígado para ser metabolizado e reabsorvido no intestino delgado, até então ser eliminado no tempo final de 180 minutos.

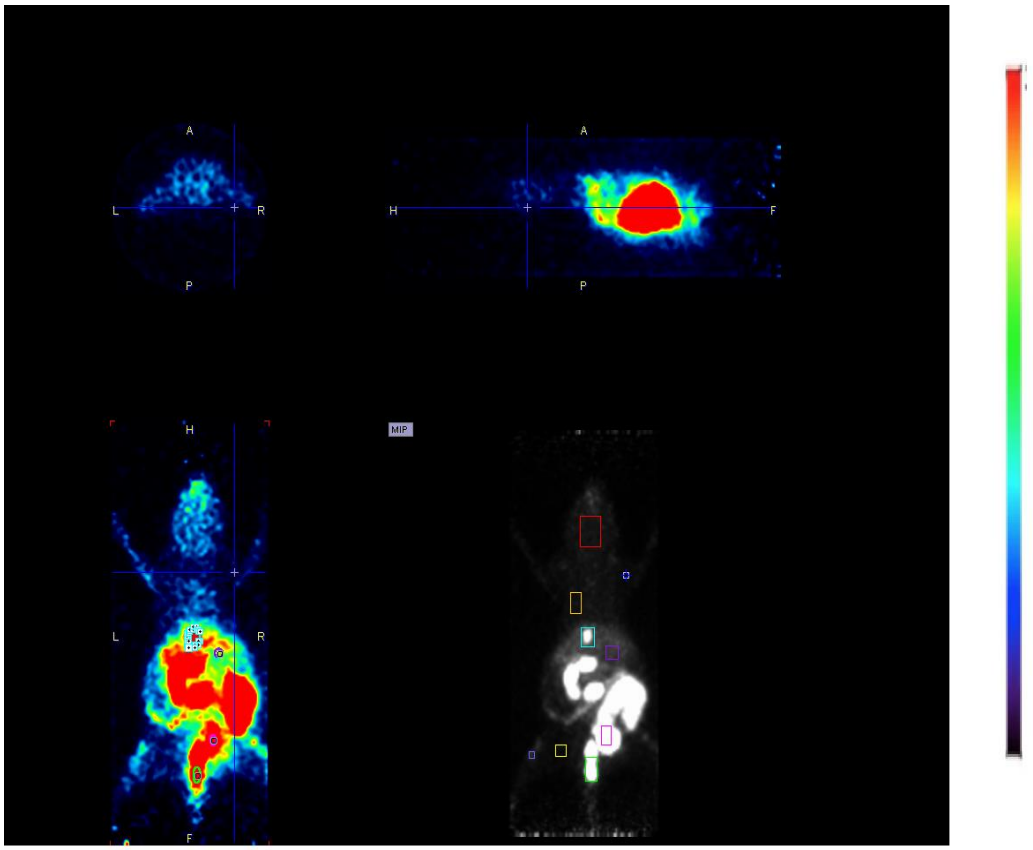
Esses resultados já são esperados, corroborando com resultados de Fernández *et al*. (2013) e com dados bibliográficos que indicam taxas de depuração lenta do sangue e tecidos moles como a principal desvantagens deste radiofármaco.

Figura 42 – Curva de cinética no sangue.



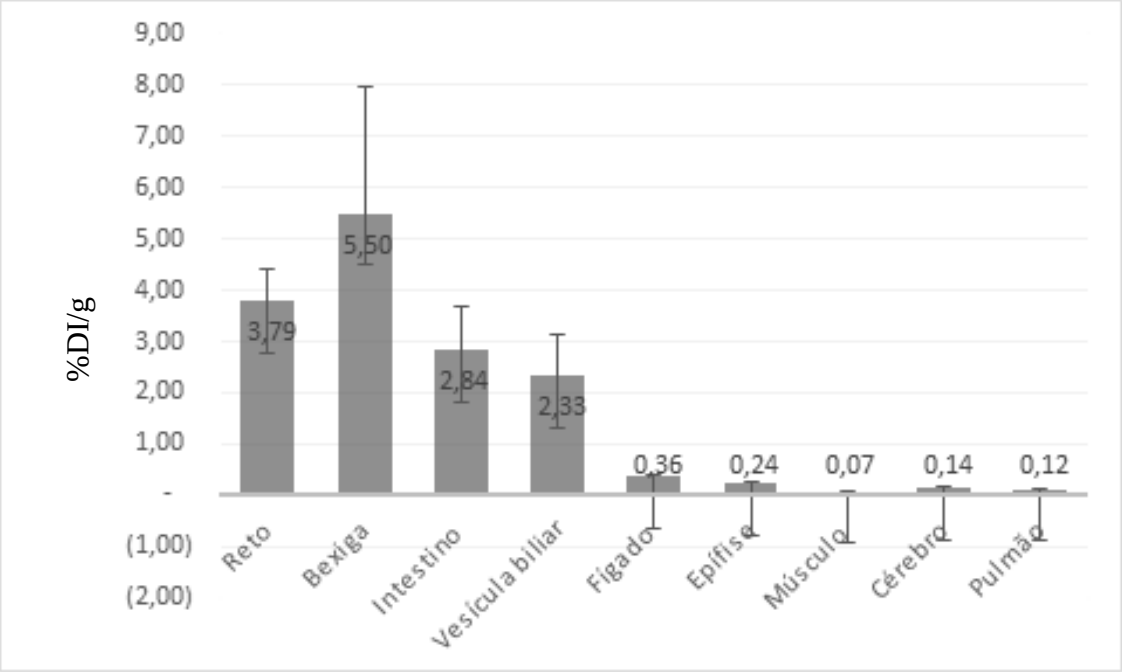
Foram realizados estudos de imagens microPET com camundongos sadios com intuito de complementar os estudos do perfil de biodistribuição *ex vivo* em órgãos normais. O protocolo de imagem envolve cinco posições de cama, cada posição com 3 minutos de análise, totalizando cada imagem, 15 minutos. A imagem obtida nesse estudo foi realizada após 2 horas da administração do [^{18}F] FMISO e é apresentada na Figura 43.

Figura 43 – Perfil de biodistribuição do [^{18}F] FMISO por imagens de microPET.



Por meio da análise da imagem acima, pode-se observar que o [^{18}F] FMISO proporciona uma imagem bem nítida, com pouca ou nenhuma radiação de fundo, a não ser, realmente os órgãos que captaram o radiofármaco. Isto mostra a especificidade tecidual do [^{18}F] FMISO sintetizado na UPPR do CDTN. Após reconstrução e quantificação de imagens, os valores de %DI/g calculados foram obtidos e estão representados na Figura 44. Nota-se que, para bexiga e fígado, as captações foram de 5,50 ± 2,47 e 0,36 ± 0,04 %DI/g, respectivamente.

Figura 44 – Perfil da captação do [^{18}F] FMISO em camundongos Swiss sadios.



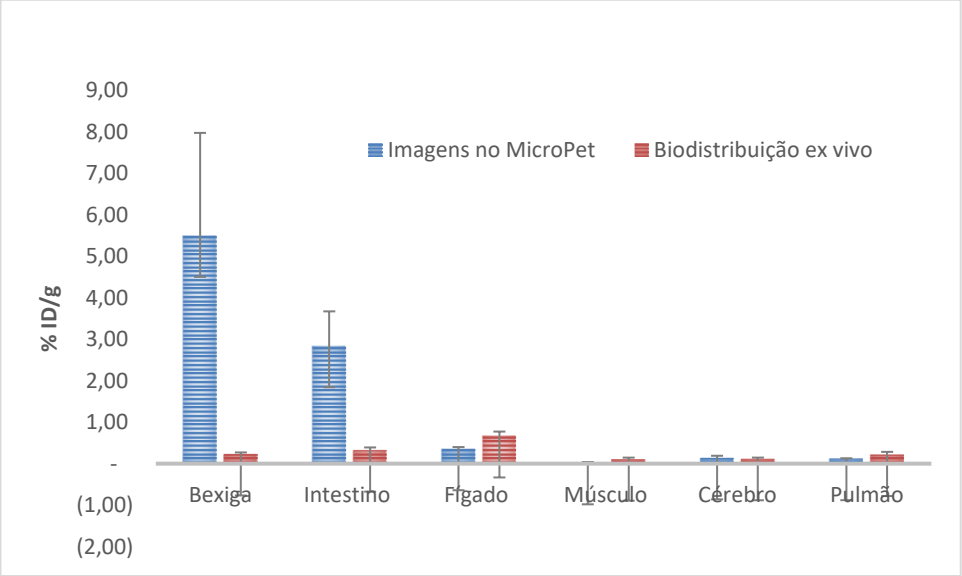
A imagem apresentada está de acordo com os dados obtidos na biodistribuição *ex vivo* no tempo de 120 minutos pós injeção, mostrando alta captação pelos órgãos responsáveis pelo metabolismo e eliminação do [^{18}F] FMISO. A escala em modo arco-íris indica captação elevada (vermelha) do radiofármaco pelo reto, vesícula biliar, intestino, fígado e bexiga, confirmando sua rota de eliminação. Os resultados para bexiga foram de encontro ao estudo anterior, a bexiga se mostrou como o órgão mais captante. Isso pode ser explicado pelo fato da bexiga, no momento da sua incisão para ser analisada no contador Gama, pode ter sido estourada e ocorreu a perda do material radioativo que estava ali presente.

Uma comparação entre resultados de captação obtidos a partir das duas técnicas empregadas (*ex vivo* e microPET) é apresentada na Figura 44. É possível observar um perfil semelhante de biodistribuição do [^{18}F] FMISO em animais sadios.

Bexiga e intestino apresentaram diferentes resultados de captação quando analisados pelas técnicas propostas. No caso da bexiga, a ROI estabelecida não exclui a urina, que apresenta elevada quantidade do [^{18}F] FMISO. Portanto, a %DI/g é maior em relação àquela determinada apenas pela parede da bexiga pela técnica *ex vivo*. Fígado,

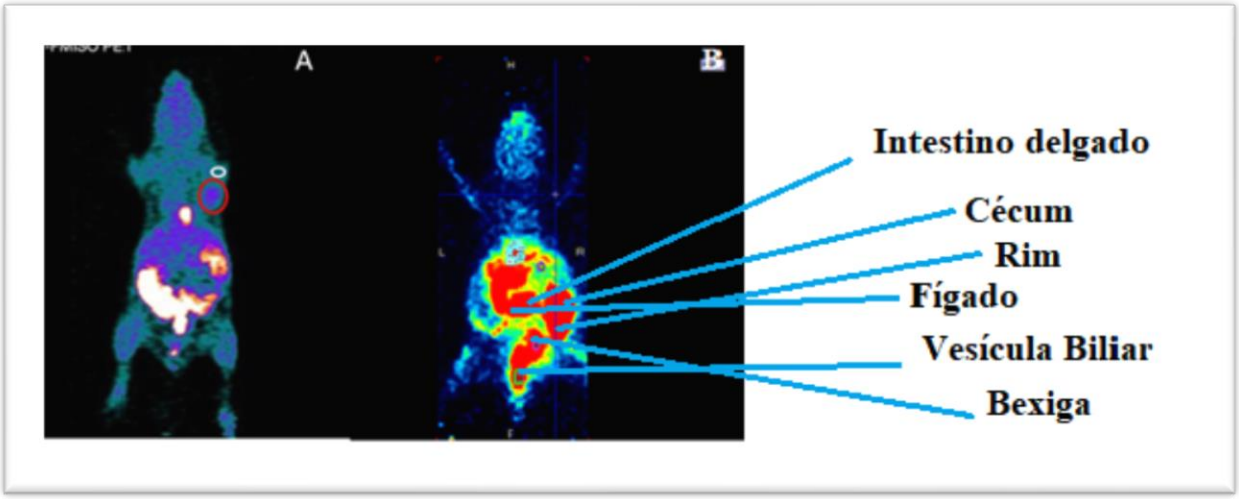
músculo, pulmão e cérebro não apresentaram diferença quanto à %DI/g obtidas por meio das duas técnicas. No caso do intestino o equipamento microPET utilizado possui uma limitação no delineamento exato do órgão para definir a região de interesse (ROI), sendo assim a região do intestino pode ter abrangido mais órgãos e sua captação superestimada. Os demais órgãos não puderam ser comparados com o estudo *ex vivo* pelo mesmo motivo da dificuldade de delimitar as regiões de interesse de cada órgão. Efeitos de volume parcial não foram corrigidos e contribuem com as diferenças observadas.

Figura 44 - Gráfico referente à comparação do perfil de biodistribuição [^{18}F] FMISO em camundongos sadios 120 minutos após injeção utilizando técnicas distintas.



A Figura 46 é uma imagem comparativa dos estudos realizados por Cheng e colaboradores (2016) para diagnóstico de câncer de mama em modelos murinos e o estudo do perfil de biodistribuição por meio de imagens PET utilizando o [^{18}F] FMISO produzido na UPPR do CDTN/CNEN.

Figura 46 – Imagem comparativa da captação do [^{18}F] FMISO dos estudos de Cheng, 2006 (A) e o perfil de captação do [^{18}F] FMISO produzido no CDTN/CNEN (B).



A partir da observação das imagens, podemos concluir que o perfil de captação do [^{18}F] FMISO em ambos estudos são bastante semelhantes. Nas duas imagens, o radiofármaco se acumula preferencialmente na região gastrointestinal, comprovando que sua via de metabolização e eliminação fígado, rins e bexiga.

5 CONCLUSÃO

- O processo de produção e controle de qualidade do [^{18}F] FMISO sintetizado na Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos do CDTN/CNEN foi desenvolvido usando o módulo de síntese TracerLabMX$_{FDG}$ em acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Radiofármacos.
- Dos cinco protocolos de síntese testados, o protocolo 3, com temperatura de síntese de 130 °C e temperatura de marcação de 85 °C, apresentou maior rendimento (~40%) sendo eleito como o melhor protocolo a ser utilizado para síntese do [^{18}F] FMISO.
- Todo o controle da qualidade do [^{18}F] FMISO foi desenvolvido satisfatoriamente.
- O método de análise para avaliação da pureza química e radioquímica foi validado e pode ser utilizado na rotina do controle da qualidade do [^{18}F] FMISO produzido no CDTN.
- O estudo de estabilidade do [^{18}F] FMISO realizado conforme o protocolo de estabilidade proposto cumpriu todos os requisitos preconizados pela Farmacopeia Europeia 8º Edição até 7 horas pós processo de síntese.
- O [^{18}F] FMISO não apresentou sinais de citotoxicidade e genotoxicidade em concentrações ideais para ser administradas em paciente nem em concentrações 10 vezes maiores, provando a segurança da formulação produzida na UPPR do CDTN/CNEN.
- Os ensaios de biodistribuição e imagens PET mostraram que o [^{18}F] FMISO produzido na UPPR do CDTN/CNEN está de acordo com os estudos disponíveis na literatura e comprovam o seu perfil de distribuição.
- Estudos futuros serão desenvolvidos para avaliação da eficácia do radiofármaco produzido na marcação de tumores hipóxicos em camundongos.
- Para o [^{18}F] FMISO tornar-se disponível nos serviços de medicina nuclear do Brasil é necessário que haja o pedido de registro do radiofármaco junto a ANVISA, como preconiza a RDC 64. Com esses resultados apresentados, é fundamental que ainda sejam feitos os estudos clínicos em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, A. M., SERRA, M. E., MURTINHO, D., GONSALVES, A. R., BOTELHO, M. F. An insight into tumoral hypoxia: the radiomarkers and clinical applications. **Oncology Reviews.** v. 3. pp. 3-18. 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2009. Atlanta: American Cancer Society; 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home. Acesso em 26 de março de 2015.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos.** Versão 2. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. 48 p.

ARAÚJO, E.B.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M.T.; MENGATTI, J. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 44, n. 1, jan/mar., 2008

AXELSON H, FREDLUND E, OVENBERGER M, LANDBERG G, & PÅHLMAN S. Hypoxiainduced dedifferentiation of tumor cells - a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 16(4-5), 554–63.(2005).

BELCAVELLO, LUCIANO et al. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de Zornia diphylla, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BLOM, E., KOZIOROWSKI, J., Automated synthesis of [18F]FMISO on IBA Synthera. **Journal Radioanal Nuclear Chemistry.** v. 299: 265-270. 2014.

BOECHAT, E., CARVALHO, A. S., SALOMÃO, K., CASTRO, S., ARAUJO-LIMA, C. F., MELLO, F., FELZENSWALB, I., AIU, C., CONDE, T. R., ZAMITH, H. Studies of genotoxicity and mutagenicity of nitroimidazoles: demystifyng this critical relationship with the nitro group. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 110 (4): 492-499. 2015.

BOGLIOLLO, L. **Bogliollo Patologia**. 8°edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2011.

BRAGHIROLLI, A. M. S. **Produção de I-124 com uso de nanomateriais e sua biodistribuição em animais.** Tese de doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro, 2014. 110 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RE n° 1 de 29 de julho de 2005:** Publicação do guia para realização de estudos de estabilidade. Brasília: 2005. 7 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução **RDC nº. 17, de 16 de abril de 2010**. Dispões sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 de abril de 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução **RDC nº. 63, de 18 de dezembro de 2009.** Dispões sobre Boas Práticas de Fabricação de Radiofármacos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de dezembro de 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução **RDC nº. 64, de 18 de dezembro de 2009.** Dispões sobre Registro de Radiofármacos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de dezembro de 2009c.

BRASIL – ANVISA (2003) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução **RE Nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para

validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Publicada no Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC n° 166 de 24 de julho de 2017**: dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: 2017. 22p.

BRITISH PHARMACOPEIA. Fludeoxyglucose F18 Injection. London: British Pharmacopeia Commission, 2009.

BRITZ-CUNNINGHAM, S. H., ADELSTEIN, S. J. Molecular targeting with radionuclides: state of the science. **Journal of Nuclear Medicine**, 44(12), 1945–61. 2003.

BRUEHLMEIER, M., ROELCKE, U., SCHUBIGER, P. A., AMETAMEY, S. M. Assessment of hypoxia and perfusion in human brain tumors using PET with ^{18}F-fluoromisonidazole and ^{15}O-H_2O. **Journal Nuclear Medicine.**v. 45(11). p. 1851–1859. 2004.

BRYAN, J. C. **Introduction to Nuclear Science.** Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009. 244 p.

CHAPMAN, J.D. Hypoxic sensitizers: implications for radiation therapy. **TheNew England Journal Medicine** v. 301(26). p. 1429-1432. 1979.

CHAPMAN, J.D., FRANKO, A.J., SHARPLIN, J. A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. **Britsh Journal of Cancer.** v. 43. p. 546-550. 1981.

CHENG, Z.; JIANG, X.; YANG, L.; SHEN, T.; WANG, X.; LU, H.; WU, J.; XIA, C.; SONG, B.; AI, H. Micro PET imaging of ^{18}F-Fluoromisonidazole in an MDA-MB-231 triples negative human breast cancer xenograft model. **Tranl. Cancer.** v. 5(3):277-284. 2016.

CHENG, Z., WEI. R., WU, B., QING, H., JIANG, X., LU, H., CHEN, S., LI, X., XU, G., AI, H. Ex-vivo biodistribution and micro-PET/CT imaging of 18F-FDG, 18F-FLT, 18F-

FMISO, and 18F-AlF-NOTA-PRGD2 in a prostate tumor-bearing nude mouse model. **Nuclear Medicine Communications.** v. 36 914-921. 2015.

COENEN, H.H.; ELSINGA, P.H.; IWATA, R.; KILBOURN, M.R.; PILLAI, M.R.; RAJAN, M.G.; *et al*. – Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond [18F] FDG for use in oncology and neurosciences. **Nucl Med Biol**. 37(7):727-40. 2010.

COOPER, J.F; LEVIN, J; WAGNER JR, H, N. Quantitative Comparison of in vitro and in vivo Methods for the Detection of Endotoxin. **J. Lab. Clin. Med.,** v. 78, p. 138-145, 1971.

DE AZEVEDO VAZ, S., DE REZENDE BARBOSA, G., SANTOS, G., LOPES, P., SALES, P. M., CAVALCANTI, M. Positron-emission tomography in head and neck câncer. **Revista Gaúcha de Odontologia.** Porto Alegre, v. 61, n.3, p.383-388. 2013.

DE BONA, A. P. et al. Phytochemical and mutagenic analysis of leaves and inflorescences of Erythrina mulungu (Mart. Ex Benth) through micronucleus test in rodents. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 344-351, 2012.

DECRISTOFORO, C. **The radiopharmacy.**Viena: European Association of Nuclear Medicine. 2012

DEDIVITIS R.A., FRANÇA C.M., MAFRA A.C.B, GUIMARÃES F.T, GUIMARÃES A.V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.** v.70, p.35-40, 2004.

DEGRADO, T *et al.* Pharmacokinetics and radiation dosimetry of 18F-fluorocholine. **Journal of Nuclear Medicine** v. 43, n. 1, p. 92–96, 2002.

DIMITRAKOPOULOU -STRAUSS, A. – PET-based molecular imaging in personalized oncology: potential of the assessment of therapeutic outcome. **Future Oncol**. 11(7):1083-91; 2015.

DOBROSSY L.Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer and Metastasis** Rev. v.24, p.9-17, 2005.

DU, J., ZHU, L., ZHOU, X., YIN, W., DENG, A., QIAO, J. Dose-response relationships of FMISO between trace dose and various macro-doses in rat by ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry and radioactivity analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 70. p. 499-504. 2012.

DUBOIS L, LANDUYT W, HAUSTERMANS K, DUPONT P, BORMANS G, VERMAELEN P, FLAMEN P, VERBEKEN E, MORTELMANS L. Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [^{18}F] fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry. **British Journal of Cancer**. v. 91(11) p. 1947–1954. 2004.

DUET, M.; POUCHOT, J.; LIOTÉ, F.; FARAGGI, M. Role for positron emission tomography in skeletal diseases. **Joint Bone Spine**.; 74(1):14-23. 2007.

DUNPHY M. P. S.; LEWIS, J. S. Radiopharmaceuticals in Preclinical and Clinical Development for Monitoring of Therapy with PET. **The Journal of Nuclear Medicine**. v. 50. nº 5. p. 106-121.

ELL PJ. The contribution of PET/CT to improved patient management. **The British Journal of Radiology.** 79:32-36. 2006.

ERRIDGE, SARA C. et al. Portal imaging to assess set-up errors, tumor motion and tumor shrinkage during conformal radiotherapy of non-small cell lung cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 66, n. 1, p. 75-85, 2003.

ESCHMANN, S. M., PAULSEN, F., REIMOLD, M., DITTMANN, H., WELZ, S., REISCHL, G., MACHULLA, H. J., BARES, R. Prognostic impact of hypoxia imaging with ^{18}F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. **Journal Nuclear Medicine.** v. 46(2). p. 253–260. 2005.

EURACHEM GUIDE– The fitness for purpose of analytical methods. **A laboratory guide to method validation and related topics**. 2th 2014.

EUROPEAN PHARMACOPEIA – EP. 7th ed. London: Stationery Office, 2010.

EUROPEAN PHARMACOPEIA – EP. 8th Edition (8.8). Strasbourg: EDQM Council of Europe, 2016.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Center for drugs Evaluationand Research Guidance – PET Drugs (CDER). **PET Drugs – Current Good Manufacturing Practice (CGMP)**, dezembro de 2009.

FELTES, P. K., MILÃO, D., Controle de Qualidade do Radiofármaco Fluodesoxiglicose (^{18}F): comparação prática entre os testes requeridos nas Farmacopéias Britânica, Européia e Americana. Revista da Graduação, vol. 4, n° 2, 2011.Disponível em **http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/10079/7112** Acesso em: 26 março. 2015.

FENECH, MICHAEl; MORLEY, ALEXANDER A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n. 1-2, p. 29-36, 1985.

FERNÁNDEZ, S., DEMATTEIS, S., GIGLIO, J., CERECETTO, H., REY, A. Synthesis, in vitro and in vivo characterization of two novel 68Ga-labelled 5-nitroimidazole derivates as potential agentes for imaging hypoxia. **Nuclear Medicine and Biology.** v. 40 273-279. 2013.

FERREIRA, S. M. Z. M. D., SILVA, J. B., SILVEIRA, M. B. O registro de radiofármacos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia.** v. 92 (3). p. 104-110, 2011.

GAGEL, B., REINARTZ, P., DEMIREL, C., KAISER, H. J., ZIMNY, M., PIROTH, M., PINKAWA, M., STANZEL, S., ASADPOUR, B., HAMACHER, K., COENEN, H., BUELL, U. EBLE, M. J. [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in response evaluation after chemo-/radiotherapy of non-small-cell lung cancer: a feasibility study. **BMC cancer**, 6, 51. 2006.

GIL, E. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3° edição. São Paulo: Pharmabooks. p. 103-104. 2007.

GROSSU, A. L., WEBER, W. A. PET for radiation treatment planning of brain tumours. **Radiotherapy and Oncology.** v. 96. n. 3. p. 325. 2010.

HÄGG M, WENNSTRÖM S. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. **Exp. Cell Res.** 2005;306:180–191.

HANDLEY, M.G., MEDINA, R.A., NAGEL, E., BLOWER, P.J., SOUTHWOTH, R. PET imaging of cardiac hypoxia: Opportunities and challenges. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology.** v. 51. p. 640-650. 2011.

HAUBNER, R. Pet radiopharmaceuticals in radiation treatment planning – Synthesis and biological characteristics. **Radiotherapy and Oncology**. v. 96. P. 280-287. 2010.

HATANO, T., ZHAO, S., ZHAO, Y., NISHIJIMA, K., Kuno, N.; Hanzawa, H.,Biological characteristics of intratumoral [F-18]-fluoromisonidazole distribution in a rodent model of glioma. **International Journal of Oncology**. v. 42. p. 823-830. 2012.

HATT, M.; TIXIER, F.; VISVIKIS, D.; CHEZE LE REST, C. – Radiomics in PET/CT: more than meets the eye? **J Nucl Med.** 2016.

HOIGEBAZAR, L.; JEONG J. M. Hypoxia imaging agents labeled with positron emitters. **Recent Results Cancer Res**. 194:285-99; 2013.

HOLLAND, J. P., LEWIS, J. S., DEHDASHTI, F. Assessing tumor hypoxia by positronemission tomography with Cu-ATSM. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicineand Molecular Imaging**, 53(2), 193–200. 2009.

HUNG, J. C. Comparison of Various Requirements of the Quality Assurance Procedures for 18F-FDG Injection. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 43, p. 1495-1506. 2002.

ICH TOPIC Q3C (R2), EUROPEAN MEDICINES AGENCY, Impurities: **Guideline for Residual Solvents.**London, fev. 2009.

IMAM, S. K. Review of positron emission tomography tracers for imaging of tumor hypoxia. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, 25(3), 365–74. 2010.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. Julho de 2011.

INCA. Incidência de câncer no Brasil. http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR acesso em: 18 de março de 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (1995) ICH Harmonised Tripartite Guideline. S2A. Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. http://www.ich.org.

INVESTIGATIONAL NEW DRUG – IND. INVESTIGATOR BROCHURE – An investigational Positron Emission Tomography (PET) radiopharmaceutical for injection and intended for use as an in vivo diagnostic for imaging hypoxia in tumors. National Institute of Health – Bethesda. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INVESTIGATOR´S BROCHURE FOR [^{18}F]FMISO, IND 76, 042, Cancer Imaging Program NCI, 5 de fevereiro, 2013.

JACOBSON, O.; CHEN, X. PET Designated Fluoride-18 Production and Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry.** v. 10, n. 11, p. 1048-59, 2010.

KÄMÄRÄINEN, E. **F-18 labelling synthesis, radioanalysis and evaluation of a dopamine transporter and a hypoxia tracer.** Academic Dissertation – University of Helsinki. Finland, Helsinki, 2007. 63 p.

KOGA, O.E. Validação de processo de filtração esterilizante. **Revista e Portal Meio Filtrante**. Ano 1, ed. 3, out., nov., dez. De 2002.

KOWALSKY, R. J., FALEN, S. W. Radiation detection and measurement. In: LANDIS. N. T. (Ed.) *Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine.* Universidade de Michigan: American Pharmacists Association. 2004. Pag. 39-60.

KROHN, K. A., LINK, J. M., MASON, R. Molecular imaging of hypoxia. **Journal of Nuclear Medicine**, 49 Suppl 2, 129S–48S.

KUMAR, P., WIEBE, L. I, MANNAN, R. H., ZHANG, Z., XIA, H., MCEWAN, A. J. B. [^{99m}Tc]Technetium labelled PnAo-azomycin glucuronides: a novel class of imaging markers of tissue hypoxia. **Applied Radiation and Isotopes**, 57(5), 719–28. 2002.

KUMAR, V.; PERKINS, J. A. Cell Injury, cell death, and adaptations. In: Robbins e Cotran Patologia: bases patológicas das doenças. 8ª edição. Ed. Filadélfia: Saunders Elsevier, 2007. p. 1-19.

LANGEN, K. J., HAMACHER, K., WECKESSER, M., FLOETH, F. STOFFELS, G., BAUER, D., COENEN, H. H., PAULEIT, D., O-(2- e [^{18}F] fluorethyl)-l-tyrosine: uptake mechanism and clinical applications. **Nuclear medicine and biology.** v. 33. n. 3. p. 287-294. 2006.

LEE, S.T., MBBS, FRACP, SCOTT, A.M. Hypoxia Positron Emission Tomography Imaging with 18F- fluoromisonidazole. **Seminars in Nuclear Medicine**. v. 37. p. 451-461. 2007.

NELSON, D. L., COX, M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6º edição. 2014.

LI, Z., CONTI, P. S.**Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography.** Advanced Drug Delivery Reviews. v. 62(11) p. 1031-51. 2010.

LIU, R. S.; CHOU, T. K., CHANG, C. H., et al. Biodistribution, pharmacokinetics and PET imaging of [(18F)] FMISO, [(18F)] FDG and [(18F)] Fac in sarcoma- and inflammation-bearing mouse model. **Nucl Med Biol** 2009; 36:305-12.

LOPCI, E.; GRASSI, I.; CHITI, A.; NANNI, C.; CICORIA, G.; TOSCCHI, L.; FONTI, C.; LODI, F.; MATTIOLI, S.; FANTI, S. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor

hypoxia: a review of the evidence. **American Journal of medicine and Molecular Imaging**, v. 4, n. 4 p. 365 – 384, 2014.

MARKUS, R., REUTENS, D. C., KAZUI, S., READ, S., WRIGHT, P., PEARCE, D. C., TOCHON-DANGUY, H. J., SACHINIDIS, J. I., DONNAN, G. A. Hypoxic tissue in ischaemic stroke: persistence and clinical consequences of spontaneous survival. **Brain.**v. 127(Pt 6). p.1427–1436. 2004.

MICAD RESEARCH TEAM. [18F]Fluoromisonidazole. Molecular Imaging and contrast agente database PUBMED 2005.
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23099/>. Acesso em 6 maio 2018.

MIRCO, J.; ROCHA, M. S. Estudo de estabilidade de medicamentos. **Centro de Pósgraduação Oswaldo Cruz**, 12 p.

MORETH, M., ORNELAS, D., GOMES, C. R. B., SOUZA, M. Nitroimidazóis – Uma promissora Classe de substâncias para o tratamento da tuberculose. **Revista virtual de química.** v. 2 n. 2. 2010.

NANDY, S., RAJAN, M.G.R., KORD, A., KRISHNAMURTHY, N.V. The possibility os a fully automated procedure for radiosynthesis of fluorine-18-labeled fluoromisonidazole using a simplified single, neutral alumina column purification procedure. **Applied Radiation and Isotopes.** v. 68. p. 1937-1943. 2010.

OH, S. J., CHI, D. Y., MOSDZIANOWSKI, C., KIM, J. Y., GIL, H. S., KANG, S. H., RYU, J. S., MOON, D. H. Fully automated synthesis [^{18}F]fluoromisonidasole using a conventional [^{18}F]FDG module. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 32. p. 899-905. 2005.

OLIVEIRA, R.B., ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química nova.**v. 25. p. 976-984. 2002.

PAPANDREOU, I., KRISHNA, C., KAPER, F., CAI, D., GIACCIA, A. J., DENKO, N. C. Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. **Cancer Research,** 65(8), 3171–8. 2005.

PEARSON, F.C. Pyrogens Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation. New York, NY: Marcel Dekker, p. 3-7, 11-14, 23-44, 89-214, 1985.

PESSOA, F. Livro do Desassossego. Editora: Companhia de Bolso. P. 560. 2006.

PINTO, T.J.A; KANEKO, T.M; OHARA M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.**2 ed., São Paulo: Atheneu, p. 179-215, 2003.

PLANALTO (Brasil). **Emenda constitucional n° 49, de 8 de fevereiro de 2006**: Altera a redação da alínea b e acrescenta alínea c ao inciso XXIII do caput do art. 21 e altera a redação do inciso V do caput do art. 177 da Constituição Federal para excluir do monopólio da União a produção, a comercialização e a utilização de radioisótopos de meia-vida curta, para usos médicos, agrícolas e industriais. Brasília: 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/emendas/emc/emc49.htm?TSPD_101_R0=89e6a7f529f2da431a4650d8de7277c0d230000000000000000e32cc8affff000000000000000000000000005aa533b90096cd266a>. Acesso em 30 de abril 2018.

RAJENDRAN, J. G., MANKOFF D. A., O'SULLIVAN, F., PETERSON, L. M., SCHWARTZ, D. L., CONRAD, E. U., SPENCE, A., MUZI, M., FARWELL, D. G. Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. **Clinical Cancer Research** 10(7), 2245–52. 2004.

RAMACHANDRAN, G. Gram – positive and gram – negative bacterial toxins in sepsis; a brief review. **Virulence**, v. 1, n. 5, issue 1, p. 213 – 218, jan. 2014.

RAMBLA – ALEGRE, M.; ESTEVE – ROMERO, J.; CARDA BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, Castelló, v. 1232, p. 101 – 109, out. 2011.

RICE, S. L.; RONEY, C. A.; DAUMAR, P.; LEWIS, J. S. – The next generation of positron emission tomography radiopharmaceuticals in oncology. **Semin Nucl Med**.; 41(4):265-82; 2011.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays.** In: SITTAMPALAM, G. S. et al. Assay Guidance Manual. Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm. nih.gov/books/NBK53196/>. Acesso em: 15 dezembro 2017.

ROBILLOTA C. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Rev Panam Salud Publica** 20 (2/3): 134 – 142, 2006.

SACHIPEKIDIS, C., THIEKE, C., ASKOXYLAKIS, V., NICOLAY, N. H., HUBER, P., THOMAS, M. Combined use of 18F-FDG and 18F-FMISO in unresectable non-small cell lung cancer patients planned for radiotherapy: a dynamic PET/CT study. **American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.** v. 5(2). p.127-142. 2015.

SAHA, G. B., **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 6th. ed. Cleveland: Springer, 410p, 2010.

SAR, A., PONJEVIC, D., NGUYEN, M., BOX, A. H., & DEMETRICK, D. J. Identification and characterization of demethylase JMJD1A as a gene upregulated in the human cellular response to hypoxia. **Cell and tissue research**, v. 337, n. 2, p. 223-234, 2009.

SHETTY, D., JOENG, J., SHIM, H. Stroma Targeting Nuclear Imaging and Radiopharmaceuticals. **International Journal of Molecular Imaging.** Review Article. v. 2012 Article ID 817682, 23 páginas. doi:10.1155/2012/817682. 2012.

SILVA, K.E.R; ALVES, L.D.S., SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R; ROLIM Neto, P.J.; Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, vol. 30 n. 2 p. 129 – 135, set. 2009.

SINGHAL, T., NARAYANAN, T. K., JAIN, V., MUKHERJEE, J., MANTIL, J. ^{11}C-l-methionine positron emission tomography in the clinical management of cerebral gliomas. **Molecular Imaging and Biology.** v. 10. n. 1. p. 1-18. 2008.

SLOMKA, P. J.; PAN, T.; GERMANO, G. – Recent Advances and Future Progress in PET Instrumentation. **Semin Nucl Med**. 2016;46(1):5-19.

SOBIN, LESLIE H., GOSPODAROWICZ, MARY K.; WITTEKIND, CHRISTIAN (Ed.). TNM classification of malignant tumours. Wiley.com, 2011.

SONNI, I.; BARATTO, L.; PARK, S.; HATAMI, N.; SRINIVAS, S.; DAVIDSON, G.; GAMBHIR, S. S.; IAGARU, A. Initial experience with SiPM-based PET/CT scanner: influence of acquisition time on image quality. **EJNMMI Physics**. 5:9. 2018.

SPEIT G, ZELLER J, NEUSS S. The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomonitoring studies. Mutagenesis. 2011 Jan;26(1):107-10.

TANG, G., WANG, M., TANG, X., GAN, M., LUO, L. Fully automated one-pot synthesis os [^{18}F] fluoromisonidazole. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 32. p. 553-558. 2005.

THOMLINSON, R., GRAY, L. The histological structure of some human lung cancer and the possible implications for radiotherapy. **British Journal of Cancer**, 9(4), 539–549. 1955.

TONG, X., SRIVATAN, A., JACOBSON, O., WANG, Y., WANG, Z., YANG, X., NIU, G., KIESEWETTER, D. O., ZHENG, H., CHEN, X. Monitoring tumor hypoxia using (18)F-FMISO PET and pharmacokinectics modeling after photodynamic therapy. **Scientific Reports**. Vol. 6.31551. 2016.

TOYONAGA, T., HIRATA, K., YAMAGUCHI, S.; HATANAKA, K.; SYUZAWA, S.; MANABE, O.; KOBAYASHI, K.; WATANABE, S.; SHIGA, T.; TERASAKA, S.; KOBAYASHI H.; KUGE, Y.; TAMAKI, N. ^{18}F-fluoromisonidazole positron emission

tomography can predict pathological necrosis of brain tumors. **Eur J Nucl Med Mol Imaging.** DOI 10.1007/s00259-016-3320-x. 2016.

TRÉDAN, O., GALMARINI, C. M., PATEL, K., TANOCK, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**. 2007; 99(19):1441-54.

TROOST, E. G., LAVERMAN, P., PHILIPPENS, M. E., LOK, J., VAN DER KOGEL A. J., OYEN, W. J., *et al*. Correlation of [18F] FMISO autoradiography and pimonidazole [corrected] immunohistochemistry in human head and neck carcinoma xenografts. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 35(10):1803-11; 2008.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION - USP. 33th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

UNIVERSITY OF UTAH. Current radiopharmaceutical availability. Center for Quantitative Cancer Imaging. 2016. Disponível em: <https://healthcare.utah.edu/huntsmancancerinstitute/research/cqci/radiochemistry/curren tradiopharmaceutical- availability.php>. Acesso em: 15 jan. 2018

World Health Organization – WHO. Handbook: Nonclinical Safety Testing (2003). http://www.who.int/tdr/publications/documents/safety_handbook.pdf.

WHO. Câncer. http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/ acesso em 19 de março de 2015.

VALLABHAJOSULA, S. 18F-Labeled Positron Emission Tomographic Radiopharmaceuticals in Oncology: An Overview of Radiochemistry and Mechanisms of Tumor Localization. **Seminars in Nuclear Medicine.** v. 37, n. 6, p. 400-19, 2007.

VALLABHAJOSULA, S.; SOLNES, L.; VALLABHAJOSULA, B. – A broad overview of positron emission tomography radiopharmaceuticals and clinical applications: what is new? **Semin Nucl Med**.; 41(4):246-64. 2011.

VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C., THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation**. Science**, 324(5930), 1029–33. 2009.

VAUPEL, P., HARRISON, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanism, and cellular response. The oncologist. 2004;9 (Suplement 5): 4-9. 2004.

cWERNICK, M. N., ARSVOLD, J. N. **Emission tomography: the fundamentals of PET and SPECT.** Academic Press, 2004.

VERA, P.; THUREAU, S.; BOHN, P.; Phase II Study of a Radiotherapy Total Dose Increase in Hypoxic Lesions Identified by 18F-Misonidazole PET/CT in Patients with Non–Small Cell Lung Carcinoma (RTEP5 Study). **Journal Nuclear Medicine.** 2018.

WANG, M., ZHANG, Y., YUAN, H. Automated synthesis of hypoxia imaging agent [^{18}F] FMISO based upon a modified Explora FDG$_4$module. **Journal of radioanalytical and nuclear chemistry.** 280, 149-155. 2009.

WIEBE, L. I., MCEWAN, A. J. B. Scintigraph imaging of focal hypoxic tissue: development and clinical applications of 123I-IAZA. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v. 45. p. 69-81. 2002.

ZIJLSTRA, S; GERHEN, P; RECHIN, C; WARTMANN, R; NOLOTRAMIPRODJO, G. Validation of the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test for Routine PET Radiopharmaceuticals. **Appl. Radiat. Isot.,** v. 48, p. 51-54, 1997.

ZHENG, M.; COLLIER, L.; BOIS, F.; KELADA, O. J.; HAMMOND, K.; ROPCHAN, J. Synthesis of [18F]FMISO in a flow-through microfluidic reactor: Development and clinical application. v. 42, p. 578-584, 2015.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO C - PERECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação imunológica e antitumoral de compostos naturais extraídos de plantas

Pesquisador: Cristiane Moutinho Lagos de Melo
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 62119716.5.0000.5208
Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICIAS
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.870.360

Apresentação do Projeto:
Trata-se de um projeto a ser desenvolvido no departamento de antibióticos desta universidade a ser conduzido pela pesquisadora Cristiane Moutinho Lagos de Melo e oito colaboradores com desenvolvimento das atividades no Laboratório de Imunoparasitologia - LIMP, Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz - Pernambuco (CPqAM/FIOCRUZ - PE). No presente projeto, compostos naturais como lectinas, inibidores de proteases e frações isoladas de extratos de plantas serão investigados in vitro quanto à sua ação imunológica e antitumoral frente a linhagens decélulas normais e cancerígenas humanas.

Objetivo da Pesquisa:
Investigar in vitro mecanismos celulares e moleculares de novos compostos naturais candidatos a fármacos imunomoduladores e antitumorais.

Avaliar em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano a atividade citotóxica de compostos naturais;

Determinar in vitro a atividade antitumoral das substâncias avaliadas sobre as linhagens de células cancerígenas JURKAT (câncer de próstata) e MDA MB231 (câncer de mama);

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Investigar in vitro a liberação de cálcio citosólico e mitocondrial promovida pelos compostos;

Investigar in vitro a liberação de Espécies Reativas de Oxigênio promovida pelos compostos;

Determinar in vitro a liberação de Citocromo c e ativação das Caspases 8, 9 e 3 promovidas pelos compostos;

Quantificar a produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-4, IL-12, TNF-e TGF- nos sobrenadantes de cultura de PBMC humano e de linhagens celulares tumorais após estimulação in vitro com os compostos;

Investigar a viabilidade celular das células tumorais tratadas in vitro com oscompostos avaliados.

Avaliação dos Riscos e Beneficios:

No caso deste projeto de pesquisa os riscos devem ser considerados mínimos, uma vez que para os experimentos de imunomodulaçãodesse projetos estamos requerendo apenas alíquotas sanguíneas de doadores voluntários sadios, para que possamos isolar os linfócitos e testar os compostos isolados in vitro. Neste procedimento acreditamos ser possível haver apenas um desconforto, especialmente psicológico, com a retirada de sangue do voluntário, assim como acontece em um hemograma comum prescrito pro um médico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os compostos serão isolados poralguns grupos de pesquisa no estado de Pernambuco, provenientes do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco e Departamento de Biofísica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Além disso, outras atividades biológicas desses compostos já vêm sendo investigadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZPE. A pretensão desse estudo é investigar novosfármacos naturais potencialmente imunomoduladores e antitumorais, elucidando parte de seu mecanismo de ação de indução de morte celular. Os resultados deste projeto, se bem sucedido, nos permitirá chegar a uma adequada eleição de protótipos a fármacos antitumorais e imunomoduladores, bem como contribuir para o entendimento do mecanismo de ação destas classes de moléculas,aspectos que são cruciais para a inovação terapêutica. A pretensão inicial é a busca de autênticos compostos naturais candidatos a novos fármacos antitumorais, planejados para atuarem de maneira alvo-especifica. Isso significa que os resultados

obtidos poderão permitir novos avanços nas estratégias imunoquimioterápicas e profiláticas (tanto a nível regional como mundial).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto tem um orçamento de R$ 15.750,00 e todos os itens econtram-se já adquiridos e recebidos pelos pesquisadores. O cronograma tem previsão para a coleta das amostras em dezembro de 2016 e janeiro de 2017. O projeto apresenta viabilidade para a realização com a estrutura dos laboratórios citados. Os compostos serão isolados poralguns grupos de pesquisa no estado de Pernambuco, provenientes do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco e Departamento de Biofísica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Apresentou carta de anuência do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE e do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_778348.pdf	10/12/2016 00:41:11		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Emmanuel.jpeg	10/12/2016 00:40:47	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_de_anuencia_projeto_humanos.pdf	10/12/2016 00:40:32	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Outros	resposta_ao_parecerista.docx	10/12/2016 00:40:05	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_final.docx	10/12/2016 00:39:13	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.doc	10/12/2016 00:38:58	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Outros	termo_confidencialidadecristiane.docx	18/11/2016 12:14:31	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Folha de Rosto	FRCRISTINEMOUTINHO.doc	18/11/2016 12:04:02	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Vanessa.pdf	17/11/2016 23:22:29	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Leydianne.pdf	17/11/2016 23:22:17	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Jessica.pdf	17/11/2016 23:22:04	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Glezia.pdf	17/11/2016 23:21:54	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Dayane.pdf	17/11/2016 23:21:40	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Camila.pdf	17/11/2016 23:21:30	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito

Outros	Curriculo_Bruno.pdf	17/11/2016 23:20:20	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Outros	Curriculo_Barbara.pdf	17/11/2016 23:19:58	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Outros	lattes_cristiane.pdf	16/11/2016 02:07:15	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_de_anuencia_virginia.jpg	16/11/2016 02:05:46	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_de_anuencia_thiago.jpg	16/11/2016 02:05:33	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RECIFE, 16 de Dezembro de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA

Comissão de Ética de Uso de Animais
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CEUA/CDTN

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***Protocolos de validação dos processos de síntese e controle de qualidade do [18F]FMISO no Brasil***, registrada com o ***protocolo nº 001/17***, que tem como responsável, ***Marina Bicalho Silveira***, 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 aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS DO CDTN, em reunião de 26/06/2017.

Finalidade: ( ) Ensino (x) Pesquisa
Vigência da autorização: 27/06/2022
Espécie/linhagem/raça: Mus musculus/raça C57Bl/6
Nº de animais: 152
Peso/Idade: 20-25g/6-8 semanas
Sexo: ( ) macho (x) fêmea
Origem: Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas – CEBIO/UFMG

Belo Horizonte, 26 de junho de 2017.

Dr. Carlos Malamut
Coordenador do CEUA/CDTN

Av. Presidente Antônio Carlos, 6.627, Campus da UFMG – Pampulha, CEP 31270-901
Caixa Postal 941 - CEP 30161-970, Belo Horizonte - Minas Gerais, Brasil
Telefone: 31-30693101 E-mail: ceua.cdtn@cdtn.br

APÊNDICE A - VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICAS

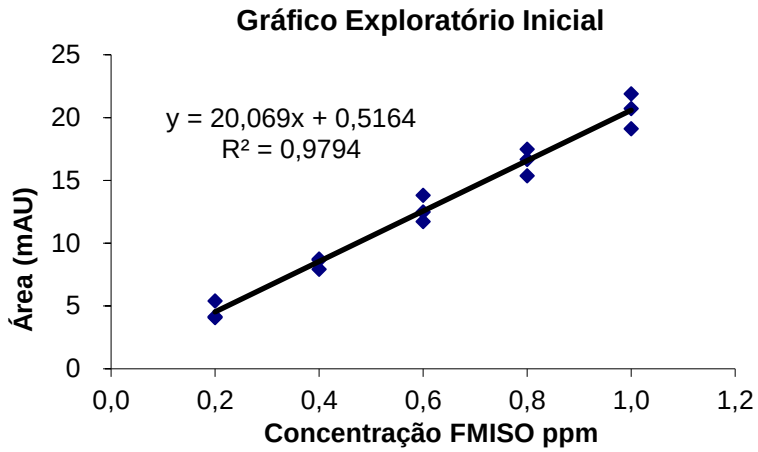
Item A: Resultados originais obtidos para FMISO

Tabela A1: Dados experimentais obtidos para linearidade do FMISO

Pontos	*Concentração (ppm)*	*Área(mAU)*	*Média das áreas*
1	0,2000	4,0931	
2	0,2000	4,1537	4,5555
3	0,2000	5,4197	
4	0,4000	8,6639	
5	0,4000	7,9261	8,4477
6	0,4000	8,7531	
7	0,6000	13,8237	
8	0,6000	11,7249	12,6795
9	0,6000	12,4899	
10	0,8000	17,5042	
11	0,8000	15,3678	16,5177
12	0,8000	16,6810	
13	1,0000	21,9138	
14	1,0000	19,1154	20,5899
15	1,0000	20,7404	

Item B: Gráfico Exploratório Inicial

Gráfico construído a partir da tabela dos dados originais sem quaisquer eventuais correções estatísticas.



Item C: Teste do resíduo Padronizado Jacknife – Outliers.

Na tabela a seguir estão dispostos os resultados obtidos a partir da aplicação do teste de Jacknife para investigação de *Outliers.*

Tabela A2: Tratamento dos dados para análise de Outliers

Pontos	x_i	y_i	e_i	J_{ei}	r_i	h_i
1	0,2000	4,0931	-0,44	-0,538	-0,553	0,200
2	0,2000	4,1537	-0,38	-0,462	-0,477	0,200
3	0,2000	5,4197	0,89	1,138	1,126	0,200
4	0,4000	8,6639	0,12	0,137	0,143	0,100
5	0,4000	7,9261	-0,62	-0,724	-0,738	0,100
6	0,4000	8,7531	0,21	0,240	0,249	0,100
7	0,6000	13,8237	1,27	1,563	1,483	0,067
8	0,6000	11,7249	-0,83	-0,974	-0,976	0,067
9	0,6000	12,4899	-0,07	-0,077	-0,080	0,067
10	0,8000	17,5042	0,93	1,124	1,112	0,100
11	0,8000	15,3678	-1,20	-1,505	-1,437	0,100
12	0,8000	16,6810	0,11	0,125	0,130	0,100
13	1,0000	21,9138	1,33	1,825	1,681	0,200
14	1,0000	19,1154	-1,47	-2,087	-1,861	0,200
15	1,0000	20,7404	0,15	0,188	0,196	0,200

As colunas x_i e y_i correspondem respectivamente às colunas concentração e área da tabela de dados originais (item A). A coluna J_{ei} corresponde ao tratamento dos dados para a presença ou não de outliers. É permitido a exclusão de no máximo 3 *outliers* (22% dos

15 dados tratados originais. No caso dos dados analisados para o Fluoromisonidazol, não houve a presença de *outliers*.

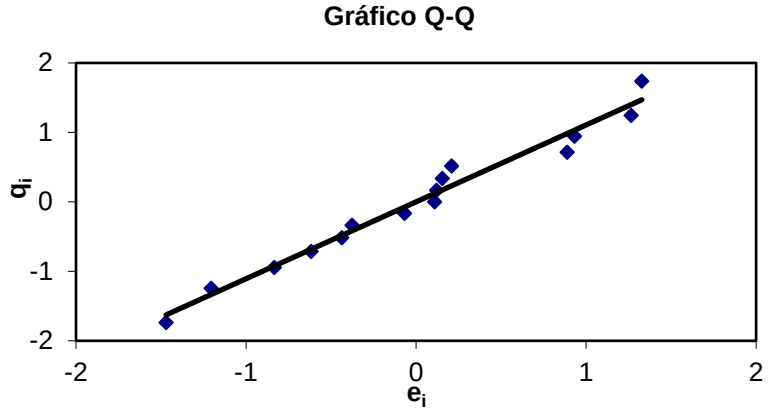
Item D: Teste de Ryan – Joiner – Normalidade de Resíduos

O teste é realizado usando os resultados do teste de *outliers* levando em conta o número de pontos e os resultados obtidos. Para o resultado obtido para o FMISO, o teste de Ryan – Joiner fornece os seguintes resultados:

Tabela A3: Resultados decorrentes da aplicação do teste de Ryan – Joiner

Pontos	p_i	q_i	e_i
1	0,0410	-1,7394	-1,4704
2	0,1066	-1,2450	-1,2041
3	0,1721	-0,9458	-0,8332
4	0,2377	-0,7137	-0,6181
5	0,3033	-0,5150	-0,4372
6	0,3689	-0,3349	-0,3766
7	0,4344	-0,1651	-0,0682
8	0,5000	0,0000	0,1091
9	0,5656	0,1651	0,1197
10	0,6311	0,3349	0,1546
11	0,6967	0,5150	0,2090
12	0,7623	0,7137	0,8894
13	0,8279	0,9458	0,9323
14	0,8934	1,2450	1,2656

A seguir encontra –se plotado os valores de e_i em função de q_i demonstrando aspecto visual da distribuição destes valores em torno da normal.



Os valores críticos adotados para R foram conforme na tabela A4:

Tabela A4: valores críticos de R

Valores Críticos de R	
$R_{critico}$ (a: 0,10)	0,9506
$R_{critico}$ (a: 0,05)	0,9383
$R_{critico}$ (a: 0,01)	0,9109

O valor calculado para R_{eq} foi 0,9867. Como este valor é maior da que tanto $R_{critico}$ para níveis de 1% e 5% de significância, conclui-se que os resíduos seguem a distribuição estatística normal.

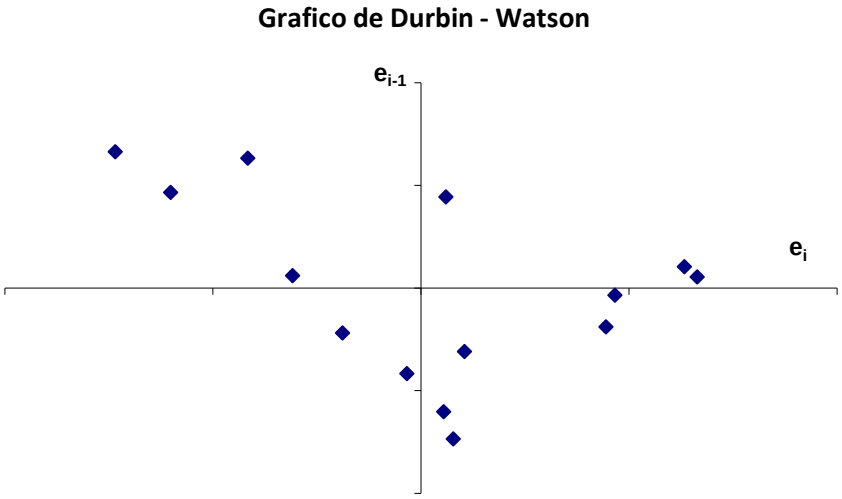
Item E Teste de Durbin – Watson ou da independência dos resíduos.

O teste de Durbin – Watson busca verificar se há, ou não, auto-correlação entre os resíduos. A tabela a seguir apresenta os resultados obtidos com a execução do teste.

Tabela A5: Resultados obtidos na análise da independência de resíduos pelo teste de Durbin – Watson.

Pontos	e_i	e_{i-1}	$e_i - e_{i-1}$
1	-0,44		
2	-0,38	-0,44	0,06
3	0,89	-0,38	1,27
4	0,12	0,89	-0,77
5	-0,62	0,12	-0,74
6	0,21	-0,62	0,83
7	1,27	0,21	1,06
8	-0,83	1,27	-2,10
9	-0,07	-0,83	0,76
10	0,93	-0,07	1,00
11	-1,20	0,93	-2,14
12	0,11	-1,20	1,31
13	1,33	0,11	1,22
14	-1,47	1,33	-2,80
15	0,15	-1,47	1,62

O gráfico a seguir apresenta a distribuição dos resíduos ao longo dos quatros Quadrantes.



Para a avaliação dos resultados da independência de resíduos assume-se duas hipóteses: Hipotese nula onde não há autocorrelação (independência) entre os resíduos e hipótese não nula onde há correleção (independência) entre os resíduos. Após execução do teste, o parâmetro de correlação calculado foi de d=2.8369079. Este valor inserido na referida tabela de correlação (ver tabela A5) devolve resultado compatível com a inexistência de correlação entre os resíduos.

Tabela A6: Tabela de correlação para comparação do resultado obtido e os limites determinados

Correlação positiva	d_L	Não Conclusivo	d_U	*Não há correlação*	4-d_U	Não conclusivo	4-d_L	Correlação Negativa
-----	1,08	-----	1,3596318	-----	2,6403681	2,8369079	2,92	

Conclui-se, dessa forma, independência entre os resultados dos resíduos.

Item F: Teste de Brown – Forsythe Ou Levene modificado – Homoscedasticidade dos resíduos.

O teste de Brown –Forsythe é aplicado aos dados do teste de outliers convenientemente divididos em dois conjuntos de valores: Grupos K =1 e K=2. Duas Hipoteses são então verificadas. A hipótese nula, que assegura que as variâncias dos desvios não são diferentes (confirmação de homoscedasticdade) e a hipótese não nula, que garante que as variâncias dos desvios são diferentes (presença de heteroscedasticidade). Os resultados obtidos para o tratamento são apresentados a seguir:

Tabela A7: Avaliação estatística da homoscedasticidade dos resíduos.

Grupo k=1	***Grupo k=2***		
$\mathbf{e_{1j}}$	$\mathbf{e_{2j}}$	$\mid d_1 \mid$	$\mid d_2 \mid$
-0,437	0,9323	0,3088	0,8004
-0,377	-1,2041	0,2482	1,3360
0,889	0,1091	1,0179	0,0227
0,120	1,3280	0,2482	1,1962
-0,618	-1,4704	0,4896	1,6022
0,209	0,1546	0,3374	0,0227

Tabela A8: Resultados dos parâmetros estatísticos avaliados.

Estatística	***Groupo k=1***	***Groupo k=2***
n_k	6	6
e_k (mediana)	-1,3E-01	1,3E-01
d_k (média)	4,42E-01	8,30E-01
SQD_k	4,38E-01	2,29E+00
s^2_p	2,73E-01	
t_L	**1,29E+00**	
p	0,226798	

Como o valor de p encontrado (0,226798) é maior que o valor de significância teórico definido para p (p <0,05), não há evidencias para refutar a hipótese nula. Consequentemente, há homoscedasticidade.

Item G: Análise da regressão linear.

O modelo utilizado foi Y = a +bX. Na tabela A7, está compilado os valores encontrados para os coeficientes linear e angular.

Tabela A9: Coeficientes encontrados para a equação da reta Y = a + bX

Coeficiente	***Valor***	***s (EP)***
Linear (a)	0,5164	0,5349
Angular (b)	20,06938	0,80644

Os resultados estatísticos da regressão são apresentados na tabela A8:

Tabela A10: Valores estatísticos da regressão

Estatísticas da regressão	
R^2	0,97944
n	15

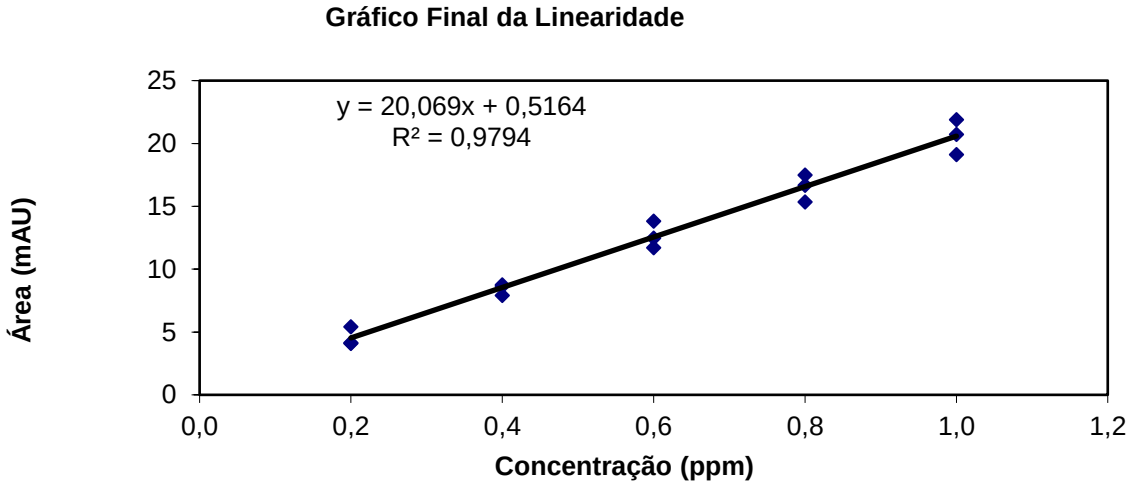
Para a verificação da linearidade da curva e significância da regressão, aplicou-se um teste ANOVA. Para avaliação da significância da regressão, duas hipóteses foram propostas: hipótese nula assumindo regressão não estatisticamente significativa e hipótese não nula, assumindo que a regressão era estatisticamente significativa. Da mesma forma, duas hipóteses foram assumidas para a linearidade. A hipótese nula, que assume que o modelo linear é o modelo mais simples e não apresenta desvios de linearidade e a hipótese não nula que assume que o modelo linear não descreve a regressão pois apresenta desvios de linearidade. O dado relativo à tabela ANOVA calculada estão compilados na tabela A9.

Tabela A11: Teste do desvio de linearidade e significância da regressão.

FV	***GL***	***SQ***	***QM***	***F***	***p***	$F_{critico}$
Regressão	1	4,83E+02	4,83E+02	619,34	2,37E-12	4,667192732
Resíduo	13	1,01E+01	7,80E-01			
Desvio da linearidade	3	8,29E-02	2,76E-02	0,027	9,93E-01	3,708264819
Entre níveis	4	4,83E+02				
Erro puro	10	1,01E+01	1,01E+00			
Total	14	4,93E+02				

Como o valor encontrado para p da regressão (2,37 E-12) é inferior e tal que p < 0,05, tem-se que a regressão determinada é estatisticamente significativa.

Da mesma forma, o valor encontrado para o p do desvio de linearidade (0,993) ê tal que p > 0,05. Portanto, o desvio de linearidade não é estatisticamente significativo.

Item H: Gráfico final da linearidade.

Após todo o devido tratamento estatístico, chega-se à conclusão que o gráfico final da linearidade incluindo todas as devidas correções estatísticas é dado por: