INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia estadual associada à Comissão Nacional de Energia Nuclear

Melhoramento de metodologia de teste aplicada a testes pré-clínicos de radiofármacos produzidos pelo IPEN

Projeto submetido à Comissão Julgadora do III Prêmio IPEN de Inovação Tecnológica - 2016

Daniel Perez Vieira

Ago/2016

Pesquisador Principal: Daniel Perez Vieira – Pesquisador Adjunto do Centro de Biotecnologia (Centro de Biotecnologia – IPEN/CNEN-SP)

Colaboradores: Dra. Fabiana Medeiros (Lab. Biosintesis Ltda.), Dras. Olga Higa e Kayo Okazaki (Centro de Biotecnologia – IPEN/CNEN-SP), além de pesquisadores do Lab. Biosintesis e alunos de graduação e pós-graduação do CB.

Linhas de Pesquisa do Plano Diretor do IPEN (2011-2020): (I) Obtenção / seleção de novos candidatos a fármacos; reagentes para uso diagnóstico; produtos de interesse da indústria farmacêutica, 2012-2018; (II) Aprimoramento das técnicas de detecção dos efeitos biológicos da radiação para dosimetria biológica, 2013-16.

Título: Metodologia modificada de quantificação “in vitro” de dano genotóxico aplicada a testes pré-clínicos de fármacos e radiofármacos.

Início/Término previsto: 2013/2014

Caracterização da inovação tecnológica: A técnica de frequência de micronúcleos em células é amplamente utilizada como parte das etapas de verificação de segurança farmacológica de produtos para uso humano. A inovação do presente projeto utiliza modificações na metodologia de cultivo de células diretamente em lâminas histológicas, reduzindo o tempo de processamento de amostras e facilitando a leitura por microscopia, e na técnica de coloração, que permite discriminar com mais precisão os eventos relevantes à análise.

Descrição de impactos: O Lab. Biosintesis utiliza a inovação rotineiramente em suas atividades em. Em Novembro de 2015, o laboratório recebeu o reconhecimento INMETRO para utilização da técnica em testes padronizados, com Boas Práticas reconhecidas e portanto, aptos a avaliar de maneira oficial qualquer substância destina a consumo humano ou animal.

Apoio: Centro de Radiofarmácia-Ipen (Edital Interno IPEN nº 2 – 2013), Centro de Biotecnologia-Ipen e Lab. Biosintesis.

RESUMO EXECUTIVO

O presente projeto trata da introdução de melhorias na técnica de análise *in vitro* de frequência de micronúcleos em células de mamíferos. A técnica é amplamente utilizada para a verificação da segurança farmacológica de vários compostos de uso humano, como fármacos, cosméticos e polímeros biocompatíveis. Em ensaios pré-clínicos, anteriores aos testes em voluntários, a metodologia se presta a determinar se certo composto-teste tem a capacidade de causar avarias no material genético de células em cultura. Tais avarias podem ser observadas por microscopia óptica sob a forma de micronúcleos, que são massas de DNA nuclear aparentes em caso de dano. A técnica é considerada "padrão-ouro" para verificação de genotoxicidade em testes pré-clínicos, e normativas internacionais determinam que um composto possa ser considerado como genotóxico quando sua administração em cultura induz dano significantemente maior do que a ocorrência de dano espontâneo encontrado em controles não tratados.

O projeto tem como metas técnicas reduzir o tempo de processamento de amostras, o volume total de rejeitos químicos, o tempo de treinamento de pessoal especializado e a acurácia da análise por microscopia óptica que, por sua vez, carrega freqüentemente subjetividade em análises por operadores humanos. A técnica modificada também contempla mudanças no método de cultivo das células, que passaram a ser cultivadas diretamente em lamínulas para microscopia, reduzindo sensivelmente o tempo de processamento de amostras e o volume de rejeitos. A metodologia de coloração também foi modificada para permitir melhor discrepância visual na análise por microscopia, reduzindo significantemente os tempos de análise e de treinamento de pessoal técnico especializado.

As inovações já estão em prática como parte dos estudos de genotoxicidade dos radiofármacos produzidos pelo CR-IPEN, em projeto interno financiado com verba orçamentária da instituição.

Entrega de proposta de projeto de pesquisa à Comissão Julgadora do III Prêmio IPEN de Inovação Tecnológica - 2016

Responsáveis:

Daniel Perez Vieira

Pesquisador Responsável – Lab. Radiobiologia

Centro de Biotecnologia – IPEN/CNEN-SP

Tatiana Franco da Cunha

Gerente de Instalação – Laboratório Biosintesis Ltda.

INTRODUÇÃO

Radiofármacos e Medicina Nuclear

Tecnologias de medicina nuclear vêm sendo utilizadas desde meados dos anos 1950 com o intuito de diagnosticar diversos tipos de doenças, além de tratar pacientes que apresentam doenças de fundo oncológico. Para estes fins são utilizadas as propriedades de penetração em tecidos vivos e de indução de dano biológico, presentes nas radiações ionizantes. Cerca de 2 milhões de brasileiros por ano são submetidos a algum procedimento de diagnóstico ou tratamento que envolva radiofármacos [1]. O emprego destas tecnologias envolve frequentemente a administração de radiofármacos, que são compostos bioativos carreadores de isótopos radioativos específicos e que tem a capacidade de tornar células, tecidos ou órgãos-alvo detectáveis, além de terem a capacidade de induzir dano genotóxico ou citotóxico significativo nos tecidos em que se concentram [2,3].

Associa-se a esta classe de fármacos notável eficiência em medicina diagnóstica e terapêutica, uma vez que, pelo poder de penetração das radiações e suas características tóxicas, determinou-se que são necessárias quantidades bem pequenas (microgramas, em contraste com a escala de uso na faixa dos miligramas utilizada em fármacos convencionais) para obtenção dos efeitos desejados, reduzindo os riscos do aparecimento de efeitos colaterais em indivíduos tratados.

Em estudo que monitorou 750.000 injeções, a administração de ^{18}FDG (18-Flúor Deoxiglicose) oferece risco observado de 2,3±1,1 ocorrências de reações adversas a cada 100.000 aplicações; compostos não radioativos produzidos com intuito diagnóstico oferecem 5,9±5,8 reações para o mesmo número de utilizações [4]. Em estudo mais recente que avaliou mais de um milhão de injeções entre 2007 e 2011, a proporção observada foi mantida, e nenhum caso de internação ou morte registrado [5].

Pela sua eficácia e segurança, o uso de radiofármacos vem sendo ampliado, de maneira geral, em todos os países. O aumento de demanda

impulsiona a indústria, que além de aumentar a produção de radiofármacos já existentes, passa a pesquisar novas moléculas carreadoras e novas associações a isótopos radioativos. Estão disponíveis para utilização em pacientes várias gerações de radiofármacos, cujas moléculas carreadoras mostram-se mais e mais específicas para o tipo de tecido-alvo a cada ciclo de pesquisa e desenvolvimento concluído. Atualmente são comercializadas cerca de 100 associações diferentes entre carreadores e isótopos, compreendendo uma família de produtos para uso em saúde humana que mostra potencial diagnóstico e terapêutico muito além do emprego do isótopo 131 do iodo, tradicionalmente utilizado no tratamento de tumores metastáticos de tireoide [6].

Regulamentação do emprego de radiofármacos no Brasil

A resolução ANVISA RDC-64 de 18 de Dezembro de 2009 organiza os quesitos necessários para o registro da utilização e produção de radiofármacos no Brasil, sejam novos ou já em utilização, além de listar as moléculas já consideradas consagradas, e que, portanto não necessitariam de avaliações clínicas e pré-clínicas. A Seção III do Capítulo II versa sobre a necessidade da apresentação de “relatório de ensaios pré-clínicos: toxicidade aguda, subaguda e crônica, toxicidade reprodutiva, atividade mutagênica, potencial oncogênico (...)” referente ao fármaco em questão, na ocasião do pedido de registro junto à ANVISA. Surgiu então a demanda de testes clínicos e pré-clínicos de uma grande parcela de moléculas, as quais mesmo já em uso, não são contempladas no Anexo I da resolução. É objetivo da CNEN “nacionalizar” estes compostos, ou seja, submetê-los a baterias de testes de eficácia e segurança aceitos e regulados pela ANVISA [7].

Testes de fármacos – Etapa pré (não) – clínica – Genotoxicidade

A avaliação pré (ou “não”) clínica compõe uma fase preliminar de avaliação da eficácia, toxicidade e segurança, válida para qualquer fármaco, associado a isótopos radioativos ou não, e que antecede a etapa de ensaios clínicos, composta por testes em voluntários humanos.

São previstos ensaios para a pesquisa da farmacocinética de compostos, seu comportamento e destino no organismo, sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (*ADME*), além de metodologias que comprovem que a molécula em teste não produza risco potencial (toxicidade), seja ela direta e observável *in vitro* ou *in vivo*, seja sob a forma de dano genético propagável hereditariamente ou indutor de risco de oncogênese. 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) [8].

Teste de frequência de micronúcleos

O teste de frequência de micronúcleos *in vitro* é uma das metodologias de escolha no desenvolvimento de testes de segurança toxicológica [9]. Sua realização 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 coloração similar à do núcleo principal, e com 5 a 30% de seu tamanho. O aumento da proporção de células que apresentam micronúcleos, bem como a sua quantidade no citoplasma das células analisadas, são indicativos de dano genotóxico. Após análise, tal aumento pode relacionar a concentração utilizada da substância-teste ao potencial genotóxico da mesma [10].

A técnica baseia-se na observação de micronúcleos através do bloqueio de citocinese (CBMN), e é realizada utilizando-se a citocalasina B, composto de origem fúngica que tem a capacidade de inibir a citocinese (divisão celular propriamente dita) sem inibir a cariocinese (divisão do núcleo celular após a duplicação do DNA). Desta forma, células tratadas por este composto exibem dois corpos nucleares, sendo denominadas células binucleadas. Caso tais

células tenham passado por evento agressor genotóxico, e tal evento produza quebra irreparada de fitas de DNA, células binucleadas mostram um fragmento de cromatina densa, com coloração e aspecto semelhantes aos dos núcleos principais. A técnica caracteriza-se como um teste *in vitro*, e é um sistema relativamente rápido e muito eficiente de teste de mutagênese utilizado para testar produtos químicos que podem induzir dano genotóxico, levando à formação dos micronúcleos no citoplasma das células. Estes micronúcleos podem ser originários de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que são incapazes de migrar com o resto dos cromossomos durante a anáfase da divisão celular [2].

Os micronúcleos observados de tal maneira só se manifestam em células que tenham completado ao menos uma divisão nuclear após a exposição ao mutagênico, sendo por isso um bom indicador de dano cromossômico. Altas frequências de MN podem ter relação com o aumento de dano de DNA, o que pode ter como consequência maior risco para o desenvolvimento de câncer ou doenças genéticas. Utilizando os mesmos dados são também calculados o índice de proliferação sob bloqueio da citocinese (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) e o índice de replicação (*replication index*, RI), cujos valores analisados juntos às proporções de células binucleadas com micronúcleos indicam possíveis fenômenos de aneugenia e clastogenia, respectivamente.

O protocolo de teste é realizado após a exposição de células em cultura a concentrações variáveis de determinada substância-teste. Após este período, as células são fixadas, recebem coloração conveniente e são submetidas à análise por microscopia óptica [11] ou de fluorescência [12].

METODOLOGIA

Caracterização da inovação – Centro de Biotecnologia (CB-IPEN)

Sendo uma técnica de microscopia, a análise da frequência de micronúcleos em dada amostra pode enfrentar certos desafios operacionais. A forma clássica de preparação implica na fixação de suspensões de células em meio líquido pela ação da solução de Carnoy (metanol/ácido acético, 3:1), seguida por sucessivas lavagens por centrifugação (1 a 3, variando a cada protocolo descrito) e espalhamento da mesma por pipetagens avulsas sobre lâminas histológicas a 65°C em câmara úmida. Tais processos, tanto de lavagem quanto de dispersão em lâminas, frequentemente podem levar à perda de eventos (células binucleadas com micronúcleos) durante o procedimento, e num aumento da dificuldade em encontrar tais células por observação microscópica, dado o alto nível de espalhamento. Além disso, a coloração clássica (segundo Giemsa) pode apresentar uma série de artefatos, tais como acúmulos inespecíficos de corantes e pequenos dejetos insolúveis, podendo falsear os resultados [13,14], daí a importância da padronização e adequação da técnica a critérios de qualidade em experimentação.

O Laboratório de Radiobiologia (CB-29) do Centro de Biotecnologia do IPEN tem suas atividades tradicionalmente associadas à mensuração de dano citotóxico e genotóxico em sistemas *in vitro* de exposições às radiações ionizantes. Sob a coordenação da Profa. Dra. Kayo Okazaki, o grupo publica vários artigos utilizando técnicas de avaliação de dano genotóxico, seja ele detectável durante a interfase [15] sob a forma de micronúcleos, ou após a metáfase [16] assumindo a configuração de cromossomos dicêntricos ou em anel. Ambas as técnicas são previstas pela AIEA como padrão para avaliação dosimétrica de exposição de indivíduos à radiação [17], apesar de serem utilizáveis para a avaliação de dano genotóxico de qualquer outro agente químico ou físico [10].

Utilizando sua familiaridade com as tecnologias usuais para avaliação de genotoxicidade, o grupo vislumbrou realizar certas modificações nas técnicas

citadas de forma a reduzir os tempos de preparação e análise, além de reduzir o componente subjetivo do analista, fator muito frequente em análises de eventos biológicos por microscopia. A metodologia de frequência de micronúcleos é caracterizada como técnica de análise rápida. No entanto, o próprio protocolo de preparação (gotejamento de células fixadas em lâminas histológicas) causa o espalhamento dos eventos relevantes no substrato, obrigando o analista a dispor de mais tempo ao procurar eventos dispersos. Além disso, a coloração clássica (May-Grünewald segundo Giemsa) apresenta certas deficiências em diferenciar as estruturas celulares, também ampliando o tempo de análise.

Desta forma, o grupo do Lab. de Radiobiologia iniciou em 2012 a padronização de um novo modelo de testes de frequência de micronúcleos, utilizando células cultivadas diretamente em lâminas ou lamínulas histológicas, as quais são levadas diretamente ao microscópio ao final do experimento. Esta modificação reduz o tempo de processamento, por omitir etapas de centrifugação e lavagem das células suspensas em solução fixadora; o tempo de análise, por fazer com que as células se posicionem próximas umas às outras, reduzindo o tempo de busca durante a microscopia; o volume de rejeitos gerados. A inovação em questão foi devidamente cadastrada no Sistema de Informação Gerencial e de Planejamento do IPEN (SIGEPI). A Tabela 1 mostra estes dados agrupados, coletados durante a padronização da técnica.

	Tempo de preparação (por amostra)	**Tempo de análise (por amostra; contabilidade de 1000 células binucleadas/lâmina)**	**Volume de rejeitos de soluções de fixação (por amostra)**
Convencional	Destacamento das células: 5-7 min. Lavagem da suspensão celular: 5-7 min. Tratamento com solução isotônica: 15-17 min. Fixação: 3 etapas sucessivas de fixação e lavagem por centrifugação: 3 x 15-18min. Gotejamento e adesão em lâminas de microscopia: 3-5 min. Coloração (anterior à análise): 15-20 min. ***Total: 58 - 74 min.***	50 – 90 min.	15mL (3 etapas de centrifugação)
Modificada - CB	Lavagem de células aderidas: 5-7 min. Tratamento com solução isotônica: 15-17 min. Fixação em solução de formaldeído: 15-17 min. Lavagem: 10-12 min. Coloração (no momento da análise): 1 min. **Total: *46 - 54 min.***	25-60 min.	3mL (etapa única de fixação direta nas lâminas)

Tabela 1: Redução dos tempos de preparação e análise, bem como do volume de rejeitos químicos gerados pela técnica de análise de frequência de micronúcleos modificada pelo Lab. de Radiobiologia do CB em relação à metodologia-padrão. Dados obtidos a partir de observações realizadas em experimentos feitos entre Outubro / 2012 e Junho / 2014.

Além destas modificações, a técnica incorporou a coloração pelo corante laranja de acridina [18], que possui capacidade discriminatória superior à da coloração convencional. Após esta coloração, núcleos e micronúcleos (compostos por DNA) são corados em verde, e a área citoplasmática em vermelho. Esta inovação consistiu em maior poder de resolução da técnica, uma vez que o contraste gerado (verde sobreposto ao vermelho) é maior do que o gerado pela heteropicnose simples observada na coloração convencional. A Figura 1 mostra as diferenças visuais entre lâminas preparadas pela metodologia convencional e a modificada

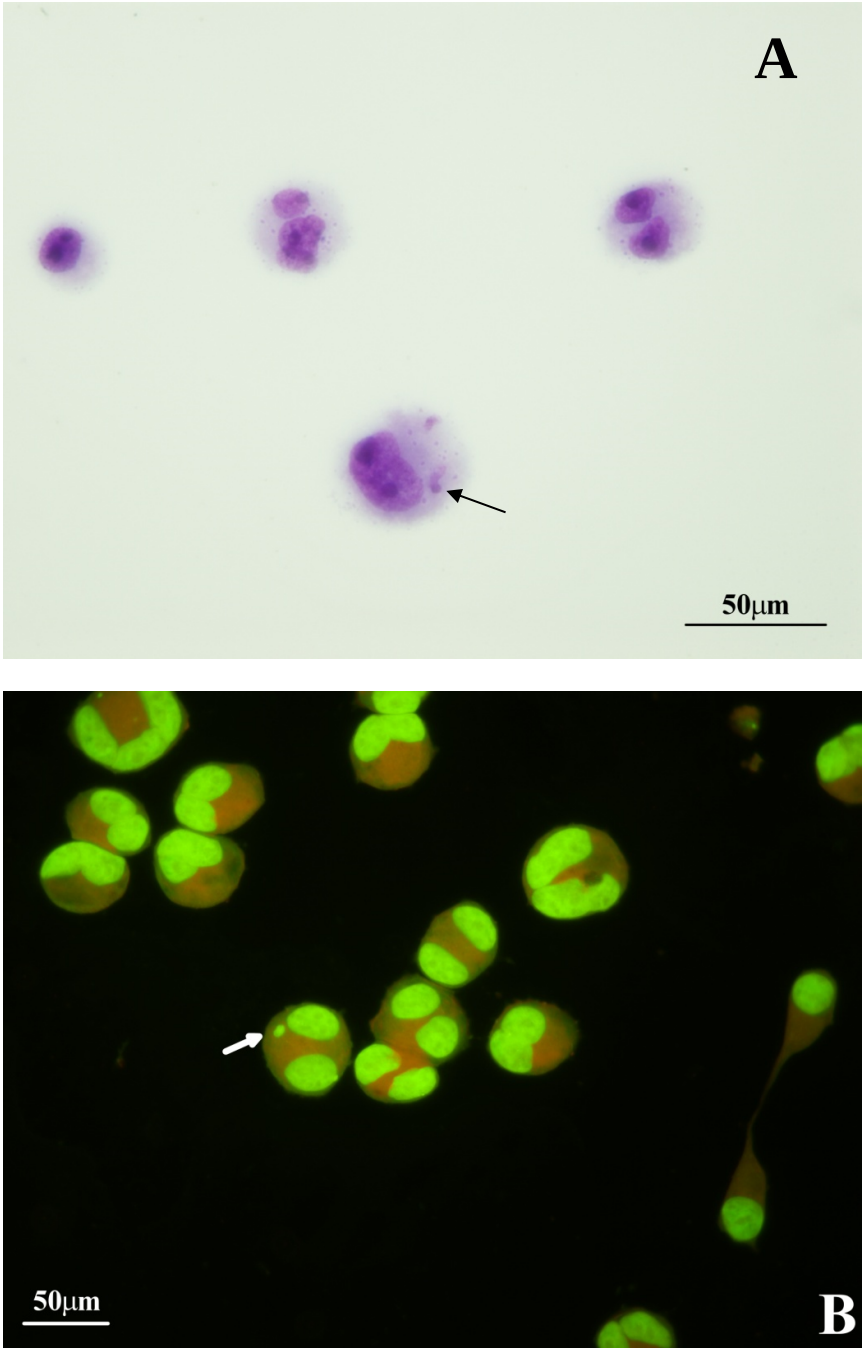

Figura 1: Aspecto geral de material preparado segundo as técnicas de fixação e coloração convencionais (A) e modificadas (B). Observa-se maior agrupamento das células e maior discrepância visual dos micronúcleos (setas) no material gerado pela técnica modificada. Aumento: 20X. Créditos: Lab. Radiobiologia (CB) e Lab. Biosintesis.

Cooperação com CR-IPEN e Biosintesis Ltda.

Em 2013, o Centro de Radiofarmácia (CR) e a Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino (DPDE) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares lançaram edital interno de fomento á pesquisa aplicada às demandas de melhorias na produção e teste de radiofármacos produzidos pelo IPEN. Entre tais problemáticas, o grupo do Lab. de Radiobiologia identificou possibilidade de cooperação justamente na que se referia aos testes pré-clínicos *in vitro* de moléculas carreadoras e radiofármacos, em atendimento à resolução ANVISA citada anteriormente. Apesar de possuir o conhecimento e de ser detentora de tecnologia inovadora, a equipe do Lab. necessitava de espaço laboratorial acreditado para realização oficial das baterias de testes pré-clínicos. Além disso, o protocolo modificado necessitava de adequação a sistema de qualidade e boas práticas de experimentação, características que não são incorporadas rotineiramente ao escopo de laboratórios de verve acadêmica.

Neste contexto surgiu a colaboração com o Lab. Biosintesis Ltda.. Coordenado pela Dra. Fabiana Medeiros da Silva e contando com a consultoria científica da Profa. Dra. Olga Higa (CB-IPEN), o Lab. Biosintesis é uma empresa outrora incubada pelo CIETEC (Centro de Inovação, Empreendedorismo e Tecnologia) e que atua prestando serviços qualificados de testes pré-clínicos para diversos compostos, entre eles polímeros biocompatíveis. Ao longo da década de 2000, o laboratório sofreu diversas mudanças com o intuito de se adequar aos mais rígidos quesitos de boas práticas de experimentação e teste.

Em Julho de 2013 foram outorgados os recursos financeiros para o projeto, totalizando R$ 110.000,00 vindos da verba orçamentária do IPEN. O projeto tem término previsto para Janeiro de 2015.

Desenvolvimento do projeto

Fase I

Durante os seis primeiros meses, as equipes do Lab. de Radiobiologia e do Lab. Biosintesis dedicaram-se à adequação do protocolo modificado ao

sistema de qualidade implantado pelo Lab. Biosintesis, e ao treinamento de pessoal técnico especializado para a realização dos ensaios. Foram gerados 39 POP's (Procedimentos Operacionais Padrão) para que a técnica modificada pudesse atender às normas internacionais de boas práticas de experimentação [2,8,9] e, portanto, ser adequada às necessidades do CR-IPEN.

Todos os procedimentos relativos a preparos de soluções, tempos de incubação e lavagem, bem como a coloração por laranja de acridina foram padronizados e inseridos em sistema de boas práticas. Durante o mesmo período, cinco técnicos especializados foram treinados, entre pesquisadores do Lab. Biosintesis e alunos de graduação e pós-graduação do Lab. de Radiobiologia – CB.

Neste período o Lab. Biosintesis obteve a acreditação temporária pelo INMETRO (Abril/2014), o que possibilitou a continuidade dos testes no espaço devidamente autorizado para tanto. O Lab. Biosintesis ainda realizou testes de citotoxicidade de dois fármacos, DOTATATO e ubiquicidina, cuja realização também foi prevista pelo projeto contemplado pelo Edital Interno IPEN 2013/02. Usando o repertório próprio de conhecimento técnico-científico, sua equipe também implantou inovações no referido teste, inserindo a utilização da fração hepática S9, cujas propriedades simulam a atividade do fígado de mamíferos a fim de se observar possível efeito da degradação hepática nos compostos-teste. Esta modificação também foi incorporada nos testes de genotoxicidade por micronúcleos.

Fase II

Entre Janeiro e Junho de 2014 foram realizados testes de citotoxicidade e genotoxicidade dos compostos citados (DOTATATO e ubiquicidina). Os fármacos em questão foram escolhidos através de sucessivas negociações com o grupo do Controle de Qualidade de Produção de Radiofármacos, composto pelas Dras. Elaine Bortoletti de Araújo e Maria Teresa Coulturato, e o MSc. Luis Alberto Pereira Dias, além do próprio Dr. Jair Mengatti, gerente do Centro. Os testes realizados levaram em consideração concentrações em

cultura equivalentes a 10%, 100% e 1000% das concentrações máximas de administração em pacientes.

As análises por microscopia foram realizadas por três analistas diferentes, que contabilizaram células binucleadas em lâminas devidamente randomizadas para evitar qualquer viés de julgamento. Um aluno de mestrado e dois de iniciação científica estão envolvidos nestas análises, orientados pelo coordenador do projeto e pela Dra. Kayo Okazaki.

RESULTADOS

Genotoxicidade

Mesmo sem a intenção de gerar um relatório técnico, é importante mostrar os resultados práticos do trabalho desenvolvido utilizando inovações inteiramente geradas pelo corpo científico do IPEN. A Tabela 2 mostra resultados quantitativos dos testes genotóxicos de DOTATATO e ubiquicidina

	DOTATATO	**Ubiquicidina**	**DOTATATO S9**	**Ubiquicidina S9**
Controle	1,75±0,07	2,00±0,18	3,04±0,21	2,07±0,43
10%	2,31±0,21	2,06±0,4	4,41±0,1	2,52±0,77
100%	2,44±0,5	2,64±0,41	2,75±0,24	2,42±0,27
1000%	2,31±0,6	3,05±0,75	2,85±0,22	2,70±0,14

Tabela 2.: Porcentagens de células binucleadas portando micronúcleos em culturas-teste expostas a concentrações entre 10 e 1000% das concentrações máximas administradas em pacientes.

Compostos-teste são considerados como agentes genotóxicos moderados caso sua administração induza frequência de micronúcleos em quantidades entre 2 a 3 vezes os valores encontrados nos controles. Caso a frequência obtida seja maior do que três vezes a encontrada nos controles, o agente é caracterizado como fortemente genotóxico. Portanto, os experimentos puderam mostrar que tanto DOTATATO quanto Ubiquicidina não são agentes que possuem genotoxicidade significativa, corroborando a noção da segurança de seu uso em pacientes.

Desta forma foi possível atestar a segurança dos dois produtos, além de atender às resoluções da ANVISA em relação ao teste de radiofármacos.

Pessoal treinado / Atividade acadêmica

Conforme descrito anteriormente, foram treinados cinco analistas que desempenham a função de realizar os testes de genotoxicidade. A metodologia clássica implica em mais tempo de leitura e o desenvolvimento de julgamento subjetivo para consideração de eventos relevantes. No passado, alunos e técnicos do laboratório precisaram de longos meses de aprendizado para atingir níveis de excelência nas análises.

Dentro do presente projeto foi possível reduzir o tempo de treinamento para seis meses ou menos, o que ampliou muito a velocidade de análise e ainda possibilita a adição de novos analistas em pouco tempo conforme a demanda aumente. A equipe do projeto vê esta vantagem como uma de suas principais realizações, uma vez que reduz tempo e custos em treinamento ao mesmo tempo em que amplia a sua capacidade de execução.

Em termos de atividade acadêmica, o trabalho em curso foitema da dissertação de mestrado da aluna Ivette Zegarra Ocampo, e dos trabalhos de iniciação científica das alunas Luma Ramirez e Camila Ayala Lira da Cruz, potencialmente aumentando a produção científica do Lab., e por consequência, do IPEN. A técnica foi publicada em trabalho aceito pelo INAC 2013 [18].

Compromisso com objetivos estratégicos do IPEN e da União

É de suma importância ressaltar que tal produção técnica e acadêmica insere-se totalmente nas áreas do conhecimento que envolvem o estudo da Energia Nuclear e suas aplicações e efeitos, reforçando o comprometimento da equipe e do CB com os objetivos do Plano Plurianual Brasileiro 2012-2015 (Objetivo estratégico "Políticas de Desenvolvimento Produtivo e Ambiental - Ciência, Tecnologia e Inovação" 2012-2015 (p.227); e objetivo estratégico "Políticas de Desenvolvimento Produtivo e Ambiental - Política Nuclear" 2012-

2015 (p.229)), e o Objetivo 0323 (p.13) do Planejamento Institucional CNEN 2012-2015

O projeto também está totalmente encapsulado pelas linhas de pesquisa do Plano Diretor do IPEN, a saber: (I) Obtenção / seleção de novos candidatos a fármacos; reagentes para uso diagnóstico; produtos de interesse da indústria farmacêutica, 2012-2018; (II) Aprimoramento das técnicas de detecção dos efeitos biológicos da radiação para dosimetria biológica, 2013-16.

CONCLUSÕES E PROJEÇÕES

A inovação proposta permitiu até agora a realização em tempo reduzido de treinamento especializado e análise de dois componentes de radiofármacos. Há a noção de redução de custos da própria análise em relação aos preços praticados por competidores, e nos custos do manejo de rejeitos, por reduzir sua geração. Foram ampliadas a capacidade de formação de recursos humanos e a possibilidade de aumento de produção científica na área Nuclear, em conformidade com os projetos, objetivos e metas institucionais do IPEN, da CNEN e da União, além de colaborar com o CR-IPEN para o grande esforço institucional em direção ao registro completo dos radiofármacos de seu portfólio.

Também foi possível sedimentar uma parceria com o Lab. Biosintesis, que amplia a cada ano sua atuação no mercado de testes *in vitro* e que possui grande potencial de formação de pessoal qualificado e de geração de empregos, constituindo um importante parceiro em projetos futuros.

O Lab. Biosintesis utiliza a inovação rotineiramente em suas atividades produtivas na área de testes pré-clínicos. Desde o final deste projeto em agosto de 2014, já empregou a inovação em 13 estudos bem-sucedidos. Em novembro de 2015, o laboratório recebeu o reconhecimento INMETRO para utilização da técnica em testes padronizados, com Boas Práticas reconhecidas e, portanto, aptos a avaliar de maneira oficial qualquer substância destina a consumo humano ou animal.

Desta forma, apesar do projeto já ter sido encerrado, a candidatura da inovação à III Edição do Prêmio IPEN de Inovação Tecnológica se dá pela persistência da inovação no mercado econômico. As modificações na técnica renderam uma metodologia que, além de ter sido adotada de maneira longeva por uma empresa privada, conseguiu também a avaliação positiva do INMETRO, que validou a técnica. Tal sucesso, ainda que de forma restrita ao ambiente do IPEN, é considerado pela equipe do projeto como digna de ao menos menção no histórico das inúmeras inovações que o IPEN já registrou.

Projeções futuras

- Ampliação da colaboração CB – Biosintesis - CR no sentido de se manter a via de captação de recursos e prestação de serviços internos e acelerar o registro de radiofármacos produzidos no IPEN.

- Satisfação das exigências ANVISA para o registro de produção e comercialização de radiofármacos.

- Criação de um Laboratório de Estudos de Dano Genotóxico no Centro de Biotecnologia, capaz de realizar não só estudos pré-clínicos, mas também estimativas de dose de radiações ionizantes em exposições ocupacionais, uma vez que é exigência da ANVISA a realização de técnicas de dosimetria biológica em trabalhadores nos casos em que a dosimetria física não é capaz de elucidar, ampliando assim a abrangência dos serviços prestados pelo IPEN à sociedade. Há capacidade técnico-científica suficiente entre o Lab. de Radiobiologia e o Lab. Biosintesis para não só continuar a executar a inovação do presente projeto, mas como também para a produção de outras inovações e serviços à sociedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Mengatti J. O estado da arte na produção de radiofármacos no Brasil. In: XI ENAN; 2013 Nov 26; Recife, Brasil. [citado 2014 Jun]. 31 p. Disponível em: http://www.aben.com.br/Arquivos/186/186.pdf.

[2] Organisation for Economic Co-operation and Development (2010) OECD Guidelines for the testing of Chemicals – Test 487: In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9748701e.pdf?expires=1381712350&id=id&accname=guest&checksum=352D2E5C23387C60915480F04D723DE1.

[3] World Health Organization – WHO. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparation - RADIOPHARMACEUTICALS Final text for addition to The International Pharmacopoeia (2008). http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/Radgenmono.pdf.

[4] Silberstein EB. Positron-emitting radiopharmaceuticals: how safe are they? Cancer Biother Radiopharm. 2001 Feb;16(1):13-5.

[5] Silberstein EB. Prevalence of Adverse Events to Radiopharmaceuticals from 2007 to 2011. J Nucl Med. 2014 May 29.

[6] Silberstein EB. Radioiodine: the classic theranostic agent. Semin Nucl Med.2012 May;42(3):164-70.

[7] Filgueiras S. Programa de Produção de Radiofármacos da CNEN. In: XI ENAN; 2013 Nov 26; Recife, Brasil. [citado 2014 Jun]. 31 p. Disponível em: http://www.aben.com.br/Arquivos/187/187.pdf.

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

[9] 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.

[10] 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.

[11] Heddle JA, Fenech M, Hayashi M, MacGregor JT. Reflections on the development of micronucleus assays. Mutagenesis. 2011 Jan;26(1):3-10.

[12] Celik A, Ogenler O, Cömelekoglu U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. Mutagenesis. 2005 Nov;20(6):411-5.

[13] Polard T, Jean S, Merlina G, Laplanche C, Pinelli E, Gauthier L. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. Ecotoxicol Environ Saf. 2011 Jan;74(1):144-9.

[14] Nersesyan A, Kundi M, Atefie K, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Oct;15(10):1835-40.

[15] Santos GS, Tsutsumi S, Vieira DP, Bartolini P, Okazaki K. Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with (60)Co gamma-radiation. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2014 Mar 1;762:17-23.

[16] da Silva MA, Calil Cury Guimarães MI, Yoriyaz H, Carvalho Pinto Ribela MT, Buchpiguel CA, Bartolini P, Okazaki K. Evaluation of the cytogenetic effects of (131)I preceded by recombinant human thyrotropin (rhTSH) in peripheral lymphocytes of Wistar rats. Radiat Environ Biophys. 2008 Nov;47(4):453-61.

[17] IAEA. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment - A Manual. Vienna; 2001. International Atomic Energy Agency . Technical Reports Series N°405. http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/TRS405_scr.pdf.

[18] Ocampo IZ, Okazaki K, Vieira DP. (2013) An improved in vitro micronucleus assay to biological dosimetry. 2013 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013. Recife, PE, Brazil, November 24-29, 2013.