IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

EDITAL INTERNO Radiofarmácia - IPEN Nº 3/2016

Chamada para Seleção de Projetos

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE RADIOFÁRMACOS PRODUZIDOS PELO CENTRO DE RADIOFARMÁCIA PARA ATENDIMENTO A RESOLUÇÕES DA ANVISA

Palavras Chaves: Radiofármacos, Ensaios Pré-Clínicos, Regulamentação e Registro.

Coordenador:

_____

Carlos Roberto Jorge Soares, PhD
Gerente do Centro de Biotecnologia

Pesquisadora Responsável:

Fabiana Medeiros da Silva, PhD, Centro de Biotecnologia / Biosintesis

Pesquisadores Colaboradores:

Daniel Perez Vieira, PhD, Centro de Biotecnologia

Elaine Bortoleti de Araujo, PhD, Centro de Radiofarmácia

Maria Tereza Colturato, PhD, Centro de Radiofarmácia

Flavia Valgôde, PhD, Centro de Biotecnologia / Biosintesis

Priscila Passos, Especialista em BPL, Centro de Biotecnologia / Biosintesis

Centros:

Centro de Radiofarmácia (CR) - IPEN

Centro de Biotecnologia (CB) - IPEN

Laboratório Biosintesis P&D Ltda – (Convenio nº 01342000115/2015-81)

OUTUBRO DE 2016

RESUMO

Este projeto é parte integrante do Convênio para Inovação Tecnológica – Processo nº 01342000115/2015-81 entre o IPEN-CNEN e o Laboratório Biosintesis P&D do Brasil Ltda.

A área de avaliação de estudos biológicos para avaliação de segurança e eficácia surge em um contexto de crescente preocupação internacional com a qualidade de produtos e serviços oferecidos a populações nos programas nacionais de assistência à saúde. O presente projeto visa avaliar os possíveis efeitos tóxicos de radiofármacos como por exemplo Ubiquicidina-99m Tc, HYNIC-Octreotídeo-99m Tc, PSMA-68 Ga (PSMA-11), PSMA-177 Lu (PSMA-617), Colina – 18F (Flúor Colina) MAG3, entre outros. Serão avaliados somente os peptídeos utilizados como matéria prima para o desenvolvimento do radiofármaco. Estes ensaios serão utilizados para a montagem de dossiês toxicológicos e de biocompatibilidade juntamente com os demais estudos in vitro que serão conduzidos paralelamente, a fim de registrar tais produtos junto à ANVISA. O Laboratório de Estudos Biológicos in vitro instalado no CB em parceria com a BIOSINTESIS é o primeiro e, atualmente, único no Brasil reconhecido para estudos in vitro em condições BPL pelo INMETRO (BPL 043) e ANVISA (REBLAS 123). Este pioneirismo é de fundamental importância no cenário brasileiro, uma vez que estes estudos, desenvolvidos com estes requisitos de qualidade, só estavam disponíveis no exterior. Apesar das peculiaridades relacionadas à produção e controle de qualidade de radiofármacos em função da presença do elemento radioativo em sua composição, os mesmos devem ser produzidos de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e qualificados de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL). Assim, o impacto de internalizar estas tecnologias por meio do projeto de inovação proposto entre o CB/IPEN e a BIOSINTESIS a fim de qualificar a produção, pesquisa e desenvolvimento de radiofármacos no Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN-CNEN/SP promoverá a médio e longo prazo inestimável diferencial competitivo para o país.

1. INTRODUÇÃO

A estimativa de casos de câncer para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer (INCA, 2016), mostrando a necessidade de investimento em novos medicamentos para diagnóstico e tratamento.

Radiofámarcos são um tipo de preparação farmacêutica associados a radionuclídeos que são sabidamente uma excelente ferramenta contra o câncer. Possuem uma finalidade diagnóstica, realizada pela medicina nuclear em exames de diagnóstico por imagem e uma finalidade terapêutica, como nos casos de tratamento de tumores em que se utiliza a radioterapia (Tavares, 2015). O Centro de Radiofarmácia, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) é a principal unidade produtora responsável pela produção de 38 radiofármacos diferentes (CNEN, 2016).

Com a crescente demanda de novos radiofármacos e a importância de se estabelecer o gerenciamento de risco destes medicamentos, se faz iminente a elaboração de uma estratégia rápida e eficaz para o cumprimento dos requisitos exigidos para regulamentação dos radiofármacos. Visando estabelecer os requisitos mínimos para o registro de radiofármacos no país, bem como garantir a qualidade, segurança e eficácia destes medicamentos, a ANVISA publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 64/2009 (RDC nº 64/2009, ANVISA; Ferreira, 2011).

Esta RDC estabelece que sejam realizados ensaios pré-clínicos que avaliem as propriedades toxicológicas para regularização dos radiofármacos. Para tanto, nossa proposta visa o uso de técnicas que cumpram esse requisito de maneira eficaz, simples e rápida. Dentre essas técnicas estão os testes de Citotoxicidade *in vitro* e o de Genotoxicidade *in vitro*.

Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* são técnicas amplamente utilizadas e aperfeiçoados para avaliação da segurança de produtos e estimativa de danos induzidos. O ensaio de citotoxicidade em células de mamífero é um teste colorimétrico que avalia a taxa de morte celular com a principal vantagem de ser relativamente rápido e eficiente na obtenção de dados permitindo a análise de várias amostras ao mesmo tempo (Cory, 1991). O ensaio se baseia na permeabilidade da membrana celular e na capacidade que as

células têm de reduzir o corante MTS na presença de um acoplador de elétrons (PMS) em um composto solúvel (formazan). Esta reação ocorre graças às enzimas que a mitocôndria produz durante seu processo de respiração. O formazan é incorporado pelas células viáveis e sua incorporação pode ser mensurada por um espectrofotômetro.

O ensaio do micronúcleo, na avaliação da genotoxicidade, por sua vez, é um teste bastante utilizado por sua alta sensibilidade e por ser um ótimo indicador biológico. A avaliação da frequência de micronúcleos em linhagens celulares se baseia na observação de fragmentos cromossômicos ou até mesmo de cromossomos inteiros, que são perdidos durante o processo de anáfase, formando um pequeno núcleo isolado do núcleo principal, apresentando cerca de 30% do tamanho de um núcleo celular. É uma técnica extensivamente utilizada na epidemiologia molecular e citogenética para determinar a presença e extensão do dano cromossômico (Fenech *et al*., 1999). Sua principal vantagem quando comparado a outros testes está na facilidade de identificação do dano e no tempo de análise, vários autores continuam trabalhando no intuito de aperfeiçoar e diminuir o tempo necessário para conclusão do teste, tais como o uso de novos corantes (laranja de acridine) (Ocampo, 2016) e a citometria de fluxo (Fenech,2014; Bryce, 2013).

Estudos realizados pela equipe executora deste projeto no 2º Edital interno da radiofármacia em 2013 demonstraram o desenvolvimento de um novo protocolo para técnica do micronúcleo, com laranja de acridine (Ocampo, 2016), que possibilitou economia de tempo e recursos, além de reduzir o volume de rejeitos. Neste novo projeto nossa proposta de inovação é aperfeiçoar ainda mais essa metodologia utilizando modificações realizadas no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro de Biotecnologia (CB) do IPEN, em conjunto com o Laboratório Biosintesis P&D do Brasil, garantindo uma redução de tempo ainda maior na obtenção dos resultados.

Conforme recomendação da ANVISA esses testes precisam ser executados em laboratórios acreditados para garantir a rastreabilidade dos estudos. O Laboratório Biosintesis tornou-se em 2014 o primeiro laboratório no Brasil a obter o reconhecimento em Boas Práticas de Laboratório (BPL) como Laboratório de Estudos *in vitro* - Reconhecimento 043, junto ao INMETRO. Este reconhecimento confere competência para a execução de estudos pertinentes à

qualificação e certificação de estudos não clínicos junto aos órgãos nacionais e internacionais.

A Biosintesis P&D do Brasil Ltda é uma empresa de Bionanotecnologia. A criação da Biosintesis está fundamentada em sua atuação por meio de um controle rigoroso de qualidade, segundo normas internacionais, no desenvolvimento, inovação e avaliação de bioprodutos. A demanda principal para o investimento caracterizou-se pela necessidade de um sistema eficiente de P&D e Patentes, novas tecnologias e reestruturação do negócio frente a um panorama mundial, principalmente no que diz respeito às normatizações e registros, com foco de impacto nacional e internacional nos setores de bio e nanotecnologia aplicados à indústria médica e de saúde.

As instalações dos laboratórios estão adequadas de acordo com as mais inovadoras práticas e metodologias que envolvem tecnologias *in vitro* e métodos alternativos preconizados pelas principais organizações internacionais como a "European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing" (EURL-ECVAM), na Comunidade Europeia, e a "The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods" (ICCVAM), nos Estados Unidos. Atualmente a empresa conta com uma infraestrutura laboratorial e administrativa de aproximadamente 100m^2 na qual funcionam suas instalações com laboratório de P&D, análises bioquímicas e biológicas *in vitro* que são fundamentais para realização desses testes.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Este projeto abordará inovação no desenvolvimento e validação de estudos não-clínicos / pré-clínicos baseados em modelos experimentais in vitro para a avaliação de eficácia, segurança, P&D&I e registro de radiofármacos, dentro dos princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL), com o objetivo de se cumprir exigências regulatórias nacionais e internacionais, e posicionar competitivamente o IPEN no cenário interno e externo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência dos possíveis efeitos biológicos e/ou citotóxicos, após a exposição das substancias teste por meio do estudo de Citotoxicidade, de acordo com a OECD 129, “Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests”, 2010.
- Avaliar a ocorrência dos possíveis efeitos biológicos e/ou genotóxicos, após a exposição das substancias teste por meio do estudo de Genotoxicidade, realizado de acordo com a OECD 474, “Mammalian Erythrocyte Micronucleus”, 2016.
- Realizar testes citotóxicos e genotóxicos *in vitro,* em Boas Práticas de Laboratório (BPL) para, pelo menos, 6 radiofármacos produzidos pelo Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN-CNEN/SP, identificados como: Ubiquicidina - 99m Tc; HYNIC - Octreotídeo - 99m Tc; PSMA - 68 Ga (PSMA-11); PSMA - 177 Lu (PSMA-617); Colina - 18 F (Fluor Colina) e MAG3.
- Determinar exposição às células e doses adequadas de acordo com as características de cada radiofármaco.
- Desenvolver e validar novo protocolo de análise de frequência de micronúcleos para estudo de genotoxicidade, utilizando citometria de fluxo e analise de imagem.
- Avaliar e validar de forma comparativa os resultados obtidos pela técnica de citometria de fluxo com a técnica atual de avaliação microscópica com coloração laranja de acridine, a fim de otimizar os ensaios pré-clínicos.

3. METODOLOGIA

3.1. Radiofármacos

Serão avaliados pelo menos, 6 radiofármacos produzidos pelo Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN-CNEN/SP, identificados como:

- Ubiquicidina - 99m Tc;
- HYNIC - Octreotídeo - 99m Tc;
- PSMA - 68 Ga (PSMA-11);
- PSMA - 177 Lu (PSMA-617);
- Colina - 18 F (Flúor Colina)
- MAG3

3.2. Cultura celular

Serão utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO-K1; ATCC CCL-61), mantidas rotineiramente pelo Laboratório Biosintesis, cujo emprego em tais experimentos é amplamente aceito por organismos internacionais. Para o teste de genotoxicidade também será utilizada uma linhagem celular humana linfoblastóide, TK6, que será adquirida a partir da Americam Type Culture Collection (ATCC). As duas linhagens serão cultivadas em meios de cultura apropriados à 37º C com 5% de CO_2.

Os tempos de exposição das culturas de CHO-K1 e TK6 serão determinados em função dos tempos de meia-vida biológica de cada um dos compostos, previamente determinados por ensaios de outros grupos ou por informações em farmacopeias de destaque internacional.

3.3. Teste de citotoxicidade *in vitro* (MTS/PMS)

Serão realizados ensaios avaliando 5 concentrações de cada radiofármaco. Para tanto, as células serão semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 100.000 cel/mL e incubadas a 37ºC e 5% de CO_2, após aproximadamente 24 horas as células serão expostas à substância teste (radiofármacos) por um período pré-definido. Ao final da exposição o corante

será adicionado e após um período de 2 horas de incubação será realizada leitura em leitor de placas em um comprimento de onda de 490 nm.

O cálculo da viabilidade celular em porcentagem (VC%) é efetuado conforme a fórmula:

$$VC\% = \frac{\textit{Média das leituras da Densidade Ótica da substância teste}}{\textit{Média das leituras da Densidade Ótica do controle de células}} * 100$$

Os ensaios, bem como o preparo dos radiofármacos serão realizados de acordo com os Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório Biosintesis.

3.4. Teste do micronúcleo com laranja de acridine

Culturas de células CHO-K1 serão desenvolvidas de forma aderente em lâminas de aproximadamente 30x20mm. Esta modificação da técnica implica na eliminação da tripsinização das células e de sucessivas etapas de lavagem e centrifugação, o que pode levar a certas perdas de eventos relevantes à análise. Além disso, o cultivo diretamente no substrato de análise permite que os eventos (células binucleadas) se apresentem agrupados quando observados através do microscópio óptico, reduzindo o tempo de análise.

Todos os cultivos serão realizados em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina e mantidos em incubadora a 37ºC e 5% de CO_2. Tais condições são de uso amplamente difundido para manutenção de cultivos celulares e ensaios *in vitro*.

Será feita uma suspensão celular com 20.000 células / mL, e 300 µL desta suspensão serão depositados em lâminas estéreis dispostas em placas de 6 poços. Após 24 horas de ambientação, as lâminas serão lavadas em solução salina-fosfato tamponada (PBS) estéril, e receberão 2 mL de meio de cultura. Após mais 24 horas de incubação das placas, os radiofármacos serão diluídos em meio de cultura e as células serão expostas à estas substâncias por um período de tempo pré-definido. Todo o processo de execução do ensaio e preparo dos radiofármacos serão conduzidos conforme Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório Biosintesis.

Após o término da exposição às substâncias teste, as lâminas serão lavadas novamente com PBS. Após lavagem, as células aderidas serão expostas a uma solução de Citocalasina B por 24 horas, com o objetivo de bloquear a citocinese celular, permitindo a obtenção de células binucleadas.

Após esse período as células serão expostas por 15 minutos a solução fisiológica e fixadas por 15 minutos em formaldeído 4% preparado em PBS (temperatura ambiente). Após esse processo, o material será lavado com PBS e então deixado para secagem ao ar ambiente.

A contagem dos eventos será obtida por microscopia de fluorescência. No momento da visualização por microscopia, cada lâmina receberá em torno de 100 µL de uma solução de laranja de acridine em PBS. Este corante emite fluorescências de comprimentos de onda distintos quando encontrado no citoplasma ou no núcleo celular. As lâminas serão observadas através de microscopia de fluorescência, com filtros específicos (Ex.: 450-490nm; Em.: 515nm). Desta forma, o DNA nuclear e micronuclear aparenta cor verde brilhante, e o citoplasma vermelho vivo, tornando inequívoca a constatação de corpos micronucleares em células binucleadas. Assim, a introdução de metodologias alternativas de fixação e coloração reduzem o tempo de análise, além de melhorar a precisão dos resultados.

Serão contabilizados os micronúcleos existentes em células binucleadas, ao menos 1000 eventos por lâmina deverão ser contados.

3.5. Teste do micronúcleo por citometria de fluxo

As células TK6 serão cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro de cavalo (10%) e mantidas em incubadora a 37ºC e 5% de CO_2.

Após exposição aos radiofármacos as células, em uma densidade de $5x10^5$, serão transferidas para um tubo de 15 mL para as etapas de processamento em citômetro de fluxo. Após processo de centrifugação, o sobrenadante será retirado e as células serão novamente suspensas com 300 µL de solução de corante EMA (*ethidium monoazide bromide*). Os tubos serão imersos em gelo a uma profundidade de 2 cm e expostos a uma fonte de luz a aproximadamente 10 cm acima do nível das suspensões celulares durante 30 minutos.

Após esse período de foto-ativação, serão adicionados 3 mL de PBS gelado (± 4º C) mais 2% de soro fetal bovino em cada amostra. A partir desse ponto a exposição das amostras à luz será minimizada utilizando blindagem. As amostras serão centrifugadas e mantidas em temperatura ambiente e após 30 minutos será adicionado lentamente 500 µL de uma solução de lise, após adição

a solução será homogeneizada por 5 segundos em agitador tipo vórtex e mantidas a temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, esse procedimento será repetido utilizando uma segunda solução de lise e as amostras serão mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Ao final do processo, as células serão armazenadas a 4º C por 24 horas até a análise em citômetro de fluxo.

Para análise em citômetro as amostras serão ressuspendidas vagarosamente imediatamente antes da análise. A aquisição dos eventos será realizada com um feixe de laser a 488 nm de excitação (Accuri C6, BD Biosciences). A incidência de micronúcleos será determinada através da aquisição de pelo menos 20.000 eventos por amostra na região das células nucleadas.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda a análise será feita utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5,0) para a elaboração de gráficos e tabelas.

Para verificar as diferenças entre valores basais e diferentes substâncias, será utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-testes de Dunnett ou de Bonferroni, de acordo com a organização dos grupos experimentais e para comparação dos dados obtidos entre as médias será utilizado o teste t de *Student*, onde o valor de $p < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo.

5. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES

- Fortalecer a infraestrutura técnica, laboratorial e de recursos humanos para o desenvolvimento de tecnologias e inovações relacionadas aos processos de pesquisa, desenvolvimento, validação e registro dos radiofármacos produzidos pela DIRF / IPEN.
- Incorporar recursos humanos capacitados para realizar P&D&I em Radiofármacos e Ensaios Pré-clínicos com vista a aumentar a competitividade do Centro de Radiofarmácia, no mercado nacional e internacional, como Centro de Excelência na produção de Radiofármacos

para a aplicação nas áreas de saúde em Medicina Nuclear diagnóstica e terapêutica;

- Aumentar a capacidade laboratorial para certificação de radiofármacos, análise da qualidade e apoio ao desenvolvimento de novas tecnologias e novos produtos;
- Aprimorar os marcos regulatórios de biossegurança, segurança radiológica, propriedade intelectual e outros para adequação aos processos de inovação na área de radiofármacos.
- Fortalecer as ações e iniciativas da Biosintesis, como empresa de base tecnológica do IPEN, com os Centros de Biotecnologia(CB) e Radiofarmácia (CR). A Biosintesis mantém projetos cooperativos de inovação tecnológica com o IPEN-CNEN/SP, desde 2004. O convenio IPEN-CNEN/SP e Laboratório Biosintesis vigente refere-se ao Projeto: "Desenvolvimento, validação e acreditação de técnicas e metodologias *in vitro*, em condições de Boas Práticas de Laboratórios (BPL) aplicados à avaliação de segurança e eficácia de radiofármacos", processo nº 01342000115/2015-81.

6. IDENTIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES DO PROJETO

Nome	Função no Projeto	Qualificação
Carlos Roberto Jorge Soares	Gerente do Centro de Biotecnologia e Coordenador do Projeto	Doutor, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
Fabiana Medeiros da Silva	Pesquisadora Principal do Projeto junto ao Centro de Biotecnologia	Doutora, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
Daniel Perez Vieira	Pesquisador Colaborador do Projeto junto ao Centro de Biotecnologia	Doutor, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
Flavia Valgôde	Pesquisadora Colaboradora / Convênio IPEN BIOSINTESIS	Doutora, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
Priscila Passos	Pesquisadora Colaboradora / Convênio IPEN BIOSINTESIS	Bacharel em Ciências Biomédicas / Iniciando Curso de Mestrado no IPEN-CNEN-SP

7. ORÇAMENTO DETALHADO

A. Recursos Solicitados ao Edital

ITEM	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE	VALOR
Equipamentos e Material permanente	Incubadora de CO_2	1	R$ 50.000,00
	Freezer - 80° C (médio)	1	R$ 27.000,00
	Fluxo laminar	1	R$ 17.000,00
	Câmera Fotográfica com adaptador para microscópio	1	R$ 16.230,00
	Software de aquisição de imagem para contagem de células	1	R$ 30.000,00
Material de Consumo	Kits, reagentes, meios, material plástico descartável, vidraria, EPIs	_____	R$ 50.000,00
Serviços de Terceiros	Manutenção e Calibração de Equipamentos / Melhorias e Reformas para instalações de salas limpa / Contratação de serviços especializados para BPL	_____	R$ 30.000,00
Participação em eventos científicos (Congressos) e reuniões técnicas (ANVISA, INMETRO, ABNT)	Inscrição, passagens, diárias	2-3/ano	R$ 16.000,00
		Valor Total:	**R$ 236.230,00**

B. Recursos de Contrapartida

Convenio IPEN-CNEN/SP e Laboratório Biosintesis (Proc 01342000115/2015-81)

C. ITEM	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE	VALOR
Recursos Humanos	Custo de Pessoal e Encargos	2-3	R$ 140.000,00
	Material de Consumo	----------	R$ 15.000,00
	Equipamentos e Instalações	1	R$ 40.000,00
Serviços de Terceiros	Manutenção do Sistema de Qualidade BPL	_____	R$ 30.000,00
		Valor Total:	**R$ 225.000,00**

8. CRONOGRAMA

Atividades	Plano de Trabalho / Quadrimestre						Responsabilidades
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	
Compra de equipamentos, insumos e adequações laboratoriais para início do projeto							Coordenador, Pesquisador Principal e Equipe
Padronização das amostras de estudo, controles e sistemas testes							Pesquisador Principal e Equipe
Padronização dos testes e métodos para avaliação dos radiofármacos							Pesquisador Principal e Equipe
Condução dos Ensaios de citotoxicidade							Pesquisador Principal e Equipe
Condução dos Ensaios de genotoxicidade							Pesquisador Principal e Equipe
Elaboração de Documentação da Qualidade – Registros, verificações e padronizações estatísticas e POPs							Coordenador, Pesquisador Principal e Equipe
Acompanhamento Bibliográfico							Pesquisador Principal e Equipe
Redação de papers e/ou patentes; apresentação de resultados em congressos e eventos científicos de interesse do projeto							Coordenador, Pesquisador Principal e Equipe
Relatórios							Coordenador, Pesquisador Principal e Equipe

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bryce S. M.; Avlasevich S.L.; Bemis J. C.; Tate M.; *et. al*. Flow cytometric 96-well microplate-based in vitro micronucleus assay with human TK6 cells: protocol optimization and transferability assessment. **Environ. Mol. Mutagen**. 54 (3): 180-94, 2013.

Bryce, S.M; Bemis, J.C; Avlasevich, S.L; Dertinger, S.D; In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. **Mutation Research** 630, 78–91, 2007.

Cory, A. H.; Owen, T. C.; Barltrop, J. A.; Cory, J. G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communication**, 3 (7): 207-212, 1991.

Fenech, M.; Holland, N.; Chang, W. P.; Zeiger, E.; Bonassi, S. The Human Micronucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.** 428(1-2):271-83, 1999.

Ferreira, S.M.Z.M.D; Silva, J.B; Silveira, M.B; O registro de radiofármacos no Brasil. Brasil. **Rev. Bras. Farm**. 92(3): 104-110, 2011.

François M.; Hochstenbach K.; Leifert W.; Fenech M.F.; Automation of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay by laser scanning citometry and its potential application in radiation biodosimetry. **BioTechiniques**, 57:309-312. 2014.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA/PRO-ONCO) – Ministério da Saúde, Rio de Janeiro 2016. http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp. Acesso em 27/09/2016.

Ocampo I.Z.; de Queiroz Souza Passos P.; Ramirez de Carvalho L.; *et. al*. In vitro cytotoxic and genotoxic evaluation of peptides used in nuclear medicine (DOTATE and Ubiquicidin29-41) in CHO-k1 cells. **Cytotechnology**, 2016.

OECD 129. *Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests*. ENV/JM/MONO(2010)20 Series on Testing and Assessment, OECD Environment, Health and Safety Publications. (2010) < http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en> Acesso em 27/10/2016.

OECD 474. *Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects. (2016) < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264264762-en> Acesso em 27/10/2016.

Resolução-RDC Nº 64. Ministério Da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. De 18 De Dezembro De 2009. Brasil.

Tavares, J.A.L; Santos, M.A.P; Lira, R.F; Avaliação do controle de qualidade de radiofármacos em serviço de medicina nuclear. **Brasilian Journal of Radiation Sciences**. 2015.