



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

OSANA DINIZ FERREIRA

**RADIOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO COM ^{99m}Tc
(TECNÉCIO-99m) PARA ESTUDOS DE SANGRAMENTOS GASTROINTESTINAIS
E CARDIOPATIAS**

Recife

2020

OSANA DINIZ FERREIRA

**RADIOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO COM ^{99m}Tc
(TECNÉCIO-99m) PARA ESTUDOS DE SANGRAMENTOS GASTROINTESTINAIS
E CARDIOPATIAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Mestre em Ciências.

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

Orientadora: Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

- F383r Ferreira, Osana Diniz.
Radiomarcção de células do sangue periférico com ^{99m}Tc (Tecnécio-99m) para estudos de sangramentos gastrointestinais e cardiopatias / Osana Diniz Ferreira – Recife, 2020.
71 f.: figs., tabs., abrev. e siglas.
- Orientadora: Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira.
Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2020.
Inclui referências e anexo.
1. Tecnologias Energéticas e Nucleares. 2. Radiofármaco. 3. ^{99m}Tc . 4. Células. 5. Radiomarcção. 6. SPECT/CT. I. Oliveira, Mércia Liane de (Orientadora). II. Guimarães, Fabiana Farias de Lima. III. Título.

UFPE

621.4837 CDD (22. ed.)

BCTG / 2020-254

OSANA DINIZ FERREIRA

**RADIOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO COM ^{99m}Tc
(TECNÉCIO-99m) PARA ESTUDOS DE SANGRAMENTOS GASTROINTESTINAIS
E CARDIOPATIAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 28/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira (Orientadora) – CRCN/NE

Dra. Edvane Borges da Silva (Examinadora Externa) – CAV/UFPE

Dra. Mariana Esposito Mendes (Examinadora Interna) – LBD - CRCN/NE

—

Dra. Simey de Souza Leão Magnata (Examinadora Externa) – CAV/UFPE

Dedico o meu Tudo a Deus, pois sem Ele, nada faria sentido.

Obrigada, Aba.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar vida e esperança de um amanhã melhor.

Aos meus pais, pelo amor e carinho. Para eles, a motivação sempre é o primeiro passo para seguir em frente.

Aos amigos, pelos sorrisos e pela paciência.

À Mércia pela oportunidade e pelos ensinamentos diários.

À Dra. Fabiana Guimarães pela coorientação e apoio.

À Raquel, por me ouvir e me assegurar que tudo sempre acaba bem. Sou grata a Deus pela sua existência.

Um obrigada em especial a Mari e a Naty pela ajuda de sempre. Vocês são uns amores.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) e ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE), pelo apoio institucional.

À Divisão de Pesquisa, Desenvolvimento, Inovação e Ensino do CRCN/N por disponibilizar as ferramentas necessárias para realização deste trabalho.

Não sou tudo quanto deveria ser; porém estou concentrando todas as minhas energias para insistir nesta única coisa: esquecendo o passado e aguardando esperançoso aquilo que está à frente, esforço-me para chegar ao fim da corrida e receber o prêmio.

Paulo. Carta aos Filipenses.

RESUMO

Na medicina moderna, o diagnóstico preciso e precoce é uma estratégia eficaz no combate a doenças, tornando-se a chave para o sucesso do tratamento clínico, viabilizando assim, a cura. No ramo da medicina nuclear, o ^{99m}Tc (Tecnécio-99m) é o radionuclídeo mais comumente usado para diagnóstico, avaliação e monitoramento por imagens. Das propriedades que possibilitam sua vasta utilização está o tempo de meia-vida de 6 horas, emissão gama de 140 keV e suas características físico-químicas, que permitem a produção de complexos diferenciados de fácil marcação. Na modalidade SPECT/CT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único) a aquisição de imagens a partir da marcação de células do sangue periférico total tem se mostrado uma ferramenta promissora para o diagnóstico dinâmico de doenças do *pool* sanguíneo, permitindo a caracterização e visualização dos processos patológicos a nível celular. Para tanto, são necessários esforços contínuos para o estabelecimento de metodologias de baixo custo e alta reprodutibilidade, a fim de, assegurar a eficácia e segurança dos procedimentos propostos. Neste contexto, o objetivo deste estudo é desenvolver protocolos de síntese de biomoléculas a partir do isolamento e radiomarkação de hemácias obtidas do sangue periférico total com ^{99m}Tc no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE). Para a implementação do protocolo de síntese das hemácias radiomarcadas com o ^{99m}Tc , foi testado o pré-tratamento das amostras de sangue (coletadas com anticoagulante EDTA) com o agente redutor (SnCl_2). O percentual da eficiência de marcação obtido para os volumes testados foi $\geq 74\%$. O estudo de estabilidade do radiofármaco em salina foi realizado em amostras com volumes distintos por 5h consecutivas nas condições de temperatura igual a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de $68 \pm 2^\circ\text{C}$. Para o volume testado de 0,5 ml a biomolécula marcada apresentou estabilidade de 4 horas. Para o volume de 3 ml, o percentual da eficiência de marcação não apresentou redução se mantendo em 94% nas cinco horas do estudo. A esterilidade do radiofármaco foi comprovada por meio da inoculação direta em meio de cultura específicos e as amostras não apresentaram contaminação. Os resultados obtidos estão de acordo à literatura e motivam a utilização da biomolécula radiomarcada no diagnóstico precoce de doenças de fase aguda, como nos casos de hemorragias gastrointestinais e cardiopatias. Contudo, é de fundamental importância a realização de estudos futuros como ensaios pré-clínicos e estudos *in vivo* para avaliação e confirmação da eficácia e segurança do radiofármaco produzido.

Palavras-chave: Radiofármaco. ^{99m}Tc . Células. Radiomarkação. SPECT/CT.

ABSTRACT

In modern medicine, accurate and early diagnosis is an effective strategy to fight diseases, becoming the key to the success of clinical treatment, thus enabling a cure. In the field of nuclear medicine, ^{99m}Tc (Technetium-99m) is the radionuclide most commonly used for diagnosis, evaluation and image monitoring. Among the properties that enable its wide use is the half-life of 6 hours, gamma emission of 140 keV and its physical-chemical characteristics, which allow the production of differentiated complexes that are easy to mark. In the SPECT / CT (Computed Tomography by Single Photon Emission) modality, the acquisition of images from the marking of peripheral whole blood cells has shown to be a promising tool for the dynamic diagnosis of blood pool diseases, allowing the characterization and visualization of pathological processes at the cellular level. Therefore, continuous efforts are needed to establish low cost and high reproducibility methodologies in order to ensure the effectiveness and safety of the proposed procedures. In this context, the aim of this study is to develop protocols for the synthesis of biomolecules from the isolation and radiolabeling of red cells obtained from ^{99m}Tc whole peripheral blood at the Regional Center for Nuclear Sciences of the Northeast (CRCN-NE). For the implementation of the ^{99m}Tc red cell synthesis protocol, pre-treatment of blood samples (collected with EDTA anticoagulant) with the reducing agent (SnCl_2) was tested. The percentage of marking efficiency obtained for the volumes tested was $\geq 74\%$. The stability study of the radiopharmaceutical in saline was carried out on samples with different volumes for 5 consecutive hours under conditions of temperature equal to $20 \pm 2^\circ \text{C}$ and humidity of $68 \pm 2^\circ \text{C}$. For the tested volume of 0.5 ml, the marked biomolecule showed stability of 4 hours. For the 3ml volume, the percentage of marking efficiency did not show reduction, remaining at 94% in the five hours of the study. The sterility of the radiopharmaceutical was proven through direct inoculation in specific culture medium and the samples showed no contamination. The results obtained are in accordance with the most current literature and motivate the use of the radiolabeled biomolecule in the early diagnosis of acute phase diseases, as in the cases of gastrointestinal hemorrhages and heart diseases. However, it is of fundamental importance to carry out future studies such as pre-clinical trials and in vivo studies to evaluate and confirm the efficacy and safety of the radiopharmaceutical produced.

Keywords: Radiopharmaceutical; ^{99m}Tc ; Cells; Radiolabelling; SPECT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Visão geral da fisiopatologia do IAM.....	20
Figura 2 -	Gráfico de incidência para Infarto Agudo do Miocárdio.....	21
Figura 3 -	Princípio do PET.....	26
Figura 4 -	Esquema dos componentes da gama câmara.....	28
Figura 5 -	Esquema do sistema gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	30
Figura 6 -	Esquematização do decaimento do $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	32
Figura 7 -	Via intracelular de marcação de hemácias com $^{99\text{m}}\text{Tc}$	38
Figura 8 -	Meios de cultura líquidos TSB e Tioglicolato.....	41
Figura 9 -	Sequência da realização da metodologia para radiomarcção das hemácias.....	44
Figura 10-	Ilustração da aplicação da amostra em placa para CCD.....	45
Figura 11 -	Estudo de estabilidade para o volume de 0,5ml.....	51
Figura 12 -	Estudo de estabilidade para o volume de 3ml.....	52
Figura 13 -	Cromatograma para CQ das amostras de 0,5 e 3ml em butanona.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Tipos de sangramento gastrointestinal e suas principais etiologias..	18
Tabela 2-	Vantagens e desvantagens das técnicas de diagnóstico para suspeita de sangramentos gastrointestinais.....	19
Tabela 3-	Lista dos biomarcadores cardíacos e suas funções.....	22
Tabela 4-	Emissores de pósitrons produzidos em cíclotrons utilizados na medicina nuclear.....	27
Tabela 5-	Radiofármacos SPECT/CT complexados ao ^{99m}Tc para avaliação diagnóstica de infecções e perfusão miocárdica.....	37
Tabela 6-	Medidas em CPM e percentual de atividade para amostra de 0,5ml no dia 1.....	47
Tabela 7-	Medidas em CPM e percentual de atividade para amostra de 0,5ml no dia 2.....	48
Tabela 8-	Medidas em CPM e percentual de atividade para amostra de 3ml no dia 1.....	48
Tabela 9-	Medidas em CPM e percentual de atividade para amostra de 3ml no dia 2.....	48
Tabela 10-	Determinação do % de ligação do radionuclídeo às frações solúveis e insolúveis das amostras analisadas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP	British Pharmacopeia
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPM	Contagens Por Minuto
CRCN-NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
CTA	Angiografia Tomográfica Computadorizada
CTMD	Tomografia Computadorizada com Múltiplos Detectores
DIPRA	Divisão de Produção de Radiofármacos
EANM	Associação Europeia de Medicina Nuclear
EC	Captura Eletrônica
ECG	Eletrocardiograma
EM	Eficiência de Marcação
EP	European Pharmacopeia
et al	E outros
FDG	Fluordesoxiglicose
FI	Fração Insólúvel
FS	Fração Sóluvel
HPGE	Detector de Germânio Hiperpuro
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
Ig	Imunoglobulinas
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
keV	Kiloeletrovolt
MBq	Megabequerel
mL	Mililitro
MN	Medicina Nuclear
Nacl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
PET	Tomografia Emissão por de Pósitron
pH	Potencial Hidrogênionico
RF	Fator de Retenção

RM	Ressonância Magnética
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SPET	Tomografia por Emissão de Pósitron Único
T½	Tempo de Meia-Vida
TC	Tomografia Computadorizada
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato Gastrointestinal
TSB	<i>Caldo Caseína de Soja</i>
USP	United States Pharmacopeia
µm	Micrómetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	SANGRAMENTOS GASTROINTESTINAIS.....	17
2.2	DOENÇAS CARDIOVASCULARES – INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM).....	20
2.3	MEDICINA NUCLEAR	23
2.3.1	PET/CT.....	25
2.3.2	SPECT/CT	28
2.3.3	Tecnécio-99m (^{99m} Tc)	29
2.3.4	Controle de qualidade dos radiofármacos marcados com ^{99m} Tc	32
2.3.5	Radiofármacos marcados com ^{99m} Tc para avaliação diagnóstica sangramentos gastrointestinais e doenças cardiovasculares	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	MATERIAIS	40
3.2	MÉTODOS.....	40
3.2.1	Controle de qualidade: caracterização do eluato	41
3.2.1.1	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	41
3.2.1.2	Avaliação da esterilidade do eluato	41
3.2.2	Isolamento e radiomarcção das hemácias com o ^{99m} Tc.....	42
3.2.3	Avaliação do percentual de ligação do ^{99m} Tc às proteínas plasmáticas: precipitação por TCA 5%	43
3.2.4	Estudo de estabilidade da biomolécula Hemácia- ^{99m} Tc.....	44
3.2.6	Análise Estatística.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	CONTROLE DE QUALIDADE DO ELUATO: DETERMINAÇÃO DO PH E AVALIAÇÃO DA ESTERILIDADE....	47
4.2	ISOLAMENTO E RADIOMARCAÇÃO DAS HEMÁCIAS COM O ^{99m} TC.....	47
4.3	AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE LIGAÇÃO DO ^{99m} TC ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS: PRECIPITAÇÃO COM TCA A 5%	50
4.4	ESTUDO DA ESTABILIDADE DA BIOMOLÉCULA HEMÁCIA- ^{99m} TC	51
5	CONCLUSÃO.....	54
6	PERSPECTIVAS.....	55

REFERÊNCIAS	56
ANEXO A.....	67

1 INTRODUÇÃO

Devido às limitações das técnicas atuais para detecção de sangramentos pontuais ativos e focos inflamatórios de fase aguda, a Medicina Nuclear (MN) tem atraído cada vez mais pesquisas que buscam consolidar alternativas diagnósticas aprimoradas, capazes de delinear de forma eficaz e precoce estas lesões, tornando possível a adequação dos procedimentos terapêuticos ideais para o paciente.

Ainda no ramo da MN, uma metodologia promissora que atua como ferramenta relevante no diagnóstico precoce de doenças do *pool* sanguíneo, como hemorragias gastrointestinais, cardiopatias, como o IAM (infarto agudo do miocárdio), e infecções aguda de origem desconhecida, é a radiomarcagem de células humanas autólogas com o ^{99m}Tc (tecnécio-99 metaestável) (YOUMANS *et al.*, 1983; PAHO, 2012). A partir desta técnica é possível detectar células metabolicamente ativas envolvidas nos processos patológicos, bem como definir a extensão das lesões iniciais (quando presentes) antes e após o tratamento (ERBA *et al.*, 2014).

Utilizado para fins de diagnóstico por imagem e, sobretudo na modalidade SPECT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único), o radionuclídeo ^{99m}Tc , quando destinado à marcação de hemácias, atua como dispositivo de elevada sensibilidade e especificidade para investigação não invasiva e individualizada de processos inflamatórios e locais com sangramentos ativos extensos (IAEA, 2015). Neste caso, o alvo diagnóstico são os tecidos ou estruturas lesadas, locais onde as células autólogas ficarão retidas.

No que diz respeito à sua farmacocinética, o radiofármaco Hemácia- ^{99m}Tc possui biodistribuição rápida pelo organismo sendo captado por estruturas vasculares como coração, fígado e baço. Cerca de 75% da radioatividade injetada permanece no *pool* sanguíneo nas primeiras 3 horas após a administração, favorecendo a aquisição de imagens de excelente qualidade; a eliminação do radionuclídeo é primariamente urinária, não apresentando atividade farmacodinâmica ou toxicidade (IPEN, 2015).

Embora o ^{99m}Tc seja bastante difundido na literatura possuindo uma vasta lista de carreadores, ligantes biomoleculares e nanoparticulados acoplados a sua estrutura, a marcação *in vitro* de células autólogas humanas com o radionuclídeo continua sendo um desafio para a pesquisa moderna na MN (JAHANGIRIAN *et al.*, 2017; PORTILHO, 2019).

Devido às dificuldades em se extrapolar os resultados obtidos experimentalmente *in vitro* para os organismos vivos e dificuldades durante o processo de separação e marcação celular (por estes sofrerem modulações externas negativas), no tocante à eficiência de

marcação, observa-se particularmente elevada complexidade na obtenção de altos rendimentos (CALLAHAN, 2006; LOVELESS, 2009).

Cumpra ressaltar também que, a técnica de radiomarcagem de hemácias com o ^{99m}Tc é reconhecida e mundialmente descrita. Contudo, as metodologias publicadas *in vitro* e modificadas *in vivo*, não definem o volume amostral de sangue a ser coletado e radiomarcado para administração no paciente, permitindo inferências por parte dos laboratórios de pesquisa científica e clínicas de medicina nuclear, sobre qual o volume adotado é o mais recomendável ou viável para obtenção de uma eficiente marcação celular com o radionuclídeo (DAM *et al.*, 2014).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos de síntese de biomoléculas a partir do isolamento e radiomarcagem de hemácias com o ^{99m}Tc , no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), bem como, realizar testes de controle da qualidade da biomolécula ^{99m}Tc -célula produzida para verificação da segurança do radiofármaco.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Realizar o controle de qualidade do radionuclídeo (^{99m}Tc) a partir da determinação do potencial hidrogeniônico e esterilidade do mesmo;
- ✓ Avaliar o rendimento de marcação em função da metodologia utilizada;
- ✓ Quantificar o percentual de ligação do radionuclídeo às proteínas plasmáticas por meio da técnica por precipitação com ácido tricloroacético;
- ✓ Realizar o estudo de estabilidade a fim de determinar o prazo de validade do radiofármaco;
- ✓ Atestar esterilidade do radiofármaco ^{99m}Tc -Célula.

Assim, com a síntese e o controle da qualidade desse novo radiofármaco, busca-se contribuir para o diagnóstico de cardiopatias e doenças hemorrágicas do trato gastrointestinal por meio do SPECT, em hospitais de Recife e região, oferecendo novas estratégias que assegurarão eficácia no tratamento destas patologias e, conseqüentemente, maior qualidade de vida aos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Como embasamento teórico, a seguir são detalhados temas correlacionados com a presente dissertação, a fim de permitir melhor compreensão a cerca do assunto.

2.1 SANGRAMENTOS GASTROINTESTINAIS

Sangramentos gastrointestinais são a causa mais comum de internações emergenciais em hospitais de todo o mundo. Trata-se de episódio único ou recorrente de perda de sangue a partir de porções distintas do trato gastrointestinal (TGI), podendo variar de distúrbios hemorrágicos autolimitados à sistêmicos com risco de morte (PAI, 2017; FARRAR, 2018; KAMBOJ *et al.*, 2019).

A doença apresenta-se em escala mundial com altas taxas de morbimortalidade em todas as faixas etárias, com incidência de aproximadamente 100 casos a cada 100.000 habitantes, representando indiscutivelmente um problema de saúde pública (GAIANI *et al.*, 2018).

De etiologia e sintomatologia variada, os episódios hemorrágicos são ocasionados por fatores anatômicos e fisiopatológicos idiopáticos, isto é, não definidos. Em sua classificação, os sangramentos são divididos com base na localização (superior e inferior) e perda de sangue (manifesto/visível, oculto e obscuro) (KIM *et al.*, 2014). Na tabela 1 estão dispostos os dois tipos de sangramentos gastrointestinais mais comuns e as principais etiologias associadas.

Tabela 1 – Tipos de sangramento gastrointestinal e suas principais etiologias.

Etiologia	Classificação do Sangramento
Úlcera Peptídica	Sangramento situado na porção superior do TGI
Gastrite	
Varises Esofágica	
Varises Gástrica	
Lesões Vasculares	
Úlcera Esofágica	Sangramento situado na porção inferior do TGI
Neoplásias	
Doença Diverticular	
Doença Inflamatória Intestinal	
Hemorróidas	
Colite (isquêmica ou infecciosa)	
Fissuras Anais	
Cancros Intestinais	

Fonte: Modificado de Nable & Granham, 2016.

Clinicamente, o paciente com suspeita de sangramento gastrointestinal geralmente apresentará hematêmese (vômito com sangue ocasionado por hemorragias pontuais no esôfago, estômago e intestino delgado), melena (eliminação de fezes com sangue devido ao sangramento no esôfago ou na região proximal do intestino delgado), isquêmica miocárdica e hipovolemia. Segundo Nable & Granham (2016), quase 80% destes casos se resolvem espontaneamente e, embora os outros 20% necessitem de intervenção médica cirúrgica, cerca de um terço destes chegam à óbito devido às lesões instauradas decorrentes do diagnóstico tardio.

Para diagnóstico e tratamento eficaz da doença é requerida uma abordagem multidisciplinar envolvendo várias áreas da medicina (cirúrgica, emergencial e radiológica) (AOKI *et al.*, 2019). Como primeira escolha para diagnóstico, a colonoscopia e endoscopia são frequentemente utilizadas para verificação de mucosas com sangramentos pontuais, sendo esta última a mais indicada por possuir sensibilidade e especificidade de aproximadamente 100%. Além das técnicas mencionadas anteriormente, a angiografia por cateter é indicada para pacientes emergenciais e instáveis, com contra-indicação para endoscopia (WORTMAN *et al.*, 2017).

No que diz respeito à medicina nuclear, o diagnóstico ocorre por meio da cintilografia com hemácias radiomarcadas com o ^{99m}Tc (tecnécio-99 metaestável) (OHMIYA *et al.*, 2015; WHITEHURST, 2018). A radiomarcação é bem descrita para sangramentos gastrointestinais, com precisão já relatada superior a 75%, elevada sensibilidade na detecção de sangramentos lentos ($\geq 95\%$) e facilidade nas repetições dos exames – quando necessário – em 48h após a reinjeção da suspensão radiomarcada no paciente (TABIBIAN *et al.*, 2013; WORTMAN *et al.*, 2017; WHITEHURST, 2018).

Além da cintilografia com hemácias radiomarcadas, outras modalidades radiológicas podem ser consideradas como exames adicionais para o diagnóstico de sangramentos gastrointestinais, como a Tomografia Computadorizada com Múltiplos Detectores (CTMD) e a Angiografia Tomográfica Computadorizada (CTA), ambas as técnicas permitem a varredura precisa de pontos hemorrágicos permitindo distinguir e determinar a etiologia do sangramento (SHAH *et al.*, 2018). Na tabela 2 estão descritas as vantagens e desvantagens da utilização das principais modalidades diagnósticas mais utilizadas em casos de suspeita de sangramento gastrointestinais.

Tabela 2- vantagens e desvantagens das técnicas de diagnóstico para suspeita de sangramentos gastrointestinais.

	Endoscopia	Imagens com Hemácias-^{99m}Tc	Angiografia com cateter
Vantagens	Altamente sensível e específica, provando suspeita de malignidade.	Não- invasiva; Detecção de baixas taxas de sangramento.	Alta resolução espacial. Injeção de vesículas seletivas e específicas.
Desvantagens	Visualização limitada do sangramento ativo quando há hemorragias.	Demorado; Não utilizada no sangramento agudo; Exposição à radiação.	Detecção de alta taxa de sangramento; Invasivo; Demorado; Exposição à radiação.

Fonte: Modificado de WORTMAN *et al.*, 2017.

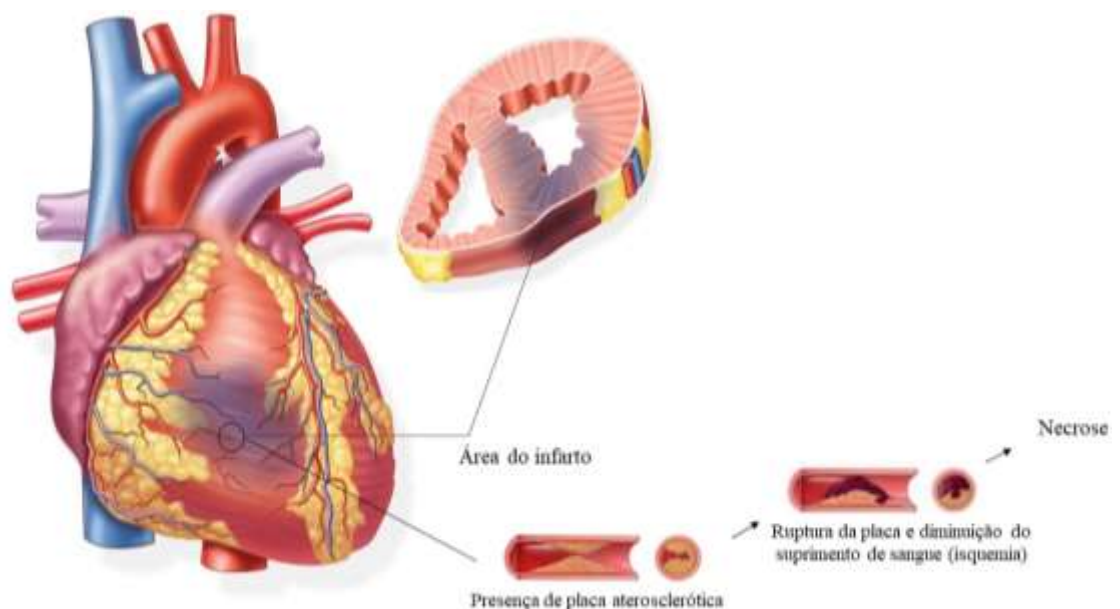
2.2 DOENÇAS CARDIOVASCULARES – INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

Globalmente, cerca de 80% dos casos de morte são por IAM e suas variantes. Estima-se que somente na Europa, 100.000 das internações anuais são ocasionadas por esse tipo de cardiopatia (CHENG *et al.*, 2019). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, desde 2010 o país é líder em casos de mortes por doenças cardiovasculares, e dentre elas, o IAM é a principal causa (BRASIL, 2019).

Define-se como infarto agudo do miocárdio, o evento de morte tecidual (necrose) resultante da instalação consistente de um quadro de isquemia ocorrido em, pelo menos, uma das artérias coronarianas (ANDERSON; MORROW, 2017; REED *et al.*, 2017).

Sua fisiopatologia é referida primariamente pela ruptura da placa aterosclerótica com formação de microtrombos capazes de obstruir a artéria. A diminuição do aporte sanguíneo dentro do vaso leva à ausência de oxigênio (isquemia) em todo o tecido, fazendo com que as células locais, os cardiomiócitos, sofram necrose (Figura 1). Em geral, a sintomatologia resume-se inicialmente a angina, dores epigástricas, náuseas, vômitos, palpitações e mal-estar generalizado (SIERVULI *et al.*, 2014; ANDERSON; MORROW, 2017).

Figura 1- visão geral da fisiopatologia do IAM.

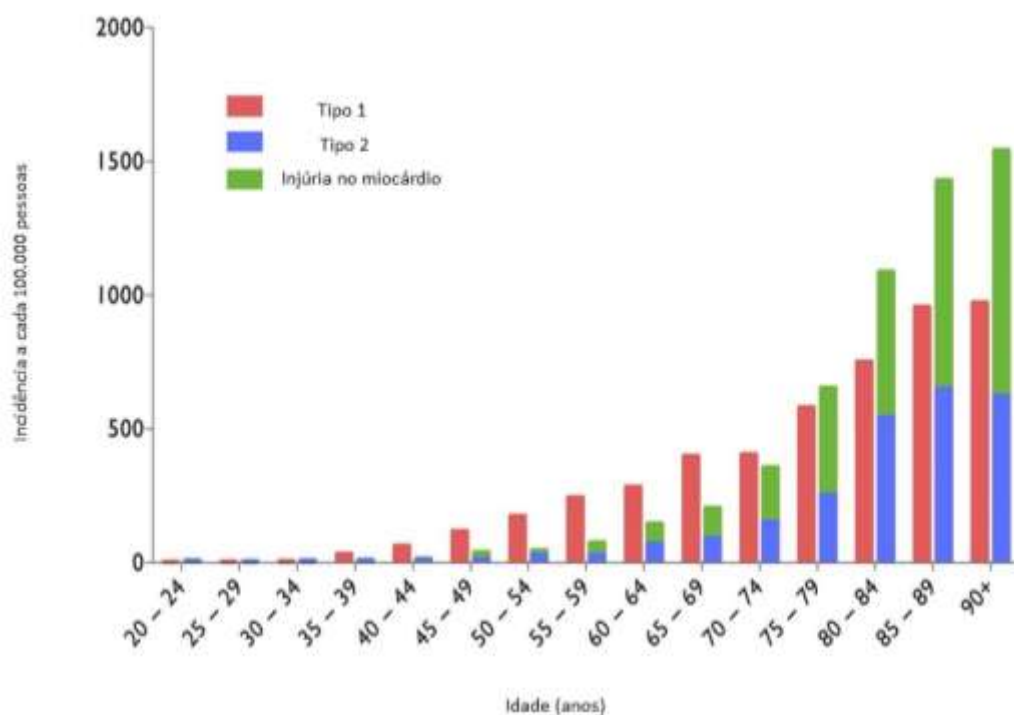


Fonte: a autora, 2020.

Quanto à classificação, há pelo menos 5 tipos de IAM clinicamente registrados: tipo 1 (infarto resultante da aterotrombose com isquemia da coronariana), tipo 2 (isquemia por

diminuição da oferta de oxigênio), tipo 3 (morte súbita), tipo 4a (infarto em associação à intervenção percutânea da coronariana), tipo 4b (associação à trombose do *stent*) e tipo 5 (quando o infarto está associado à alterações na vascularização do miocárdio) (CRANE *et al.*, 2017). Dos tipos citados acima, o IAM classificação 1 e 2 são reportados na literatura como os de maior incidência global, considerando os fatores genéticos e idade como predisponentes, como mostrado a Figura 2 (CHAPMAN *et al.*, 2017).

Figura 2- gráfico de incidência para infarto agudo do miocárdio por idade.



Fonte: Modificado de Chapman *et al.*, 2017.

Os fatores de risco relacionados à doença podem ser intrínsecos ao indivíduo ou não. O histórico familiar, a genética e o sexo são ditos como fatores não modificáveis, aqueles nos quais intervenções médicas ou mudanças no estilo de vida não seriam suficientes para solucioná-los. Tabagismo, obesidade, diabetes mellitus, hipertensão, sedentarismo e condição nutricional são ditos como condições modificáveis, isto é, passíveis de serem tratados ou reparados (CHAPMAN *et al.*, 2017; LANGOWISKI, 2017).

Componentes intracelulares (moléculas biologicamente ativas) como quando superexpressos, isto é, produzidos em quantidades acima do habitual, geralmente estão relacionados com casos de patologias. Na prática clínica esses componentes, também

chamados de biomarcadores, são utilizados para prognóstico, diagnóstico e acompanhamento de pacientes com suspeita de IAM e desempenham papéis críticos na detecção e avaliação de eventos cardíacos independentes (CHEN *et al.*, 2019).

Uma ampla variedade de rastreadores biológicos têm sido propostos como candidatos com potencial para se tornarem novos marcadores. Segundo Aydin *et al.* (2019), um marcador cardíaco ideal seria aquele capaz de detectar o dano ainda em seu estágio inicial, possuir elevada especificidade para as células do músculo cardíaco, capacidade de diferenciar danos permanentes dos reversíveis e informar a gravidade da lesão ocasionada pelo processo isquêmico (AYDIN *et al.*, 2019).

Contudo, poucos biomarcadores já encontrados foram trazidos para a rotina clínica (MARTINEZ *et al.*, 2019). Este fato, está relacionado a incompletude das características mencionadas acima em uma só molécula, além do curto período entre a elevação e diminuição do biomarcador no plasma humano (MYTHILI; MALATHI, 2015). A lista dos biomarcadores já utilizados, porém obsoletos, os destinados ao uso padrão (estabelecidos) e em quadros emergenciais é mostrada na tabela 3.

Tabela 3 – lista de biomarcadores cardíacos e suas funções.

Tipos	Biomarcadores	Funções
Obsoleto	Aspartato Aminotransferase (AST)	
	Creatinoquinase (CK Total)	Detecção da lesão cardíaca
	Lactato Desidrogenase (LDH)	
Estabelecido	Troponina T	
	Troponina I	
	Mioglobina	Detecção da lesão cardíaca
Emergencial	Fração Miocárdica da CK	
	Proteína cardíaca de ligação à ácidos graxos (hFABP)	
	Albumina modificada para isquemia	Detecção da isquemia antes da instalação da necrose
	Peptídeo natriurético com fragmento N-terminal inativo (BNP/NT-proBNP)	
	Fator de diferenciação de crescimento 15 (GBF-15)	Detecção do IAM ocasionado por estresse mecânico

Copeptin	
Proteína A associada à	Detecção de eventos
gravidez	isquêmicos

Fonte: Modificado de MYTHILI & MALATHI, 2015.

Como exame auxiliar para monitoração do IAM, a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) recomenda a realização do ECG (Eletrocardiograma) contínuo, para detecção de eventos de arritmias ventriculares súbitas e ou fatais (PIEGAS *et al.*, 2015). Além da monitoração, o diagnóstico da doença na fase aguda ou leve pode ser realizado por meio de cintilografia com marcação de hemácias com o ^{99m}Tc ou com o uso de kits como ^{99m}Tc -Sestamibi e ^{99m}Tc -Tetrofosmin (PIEGAS *et al.*, 2015).

Por meio do exame cintilográfico, busca-se avaliar a adequação e viabilidade da irrigação sanguínea no miocárdio. Para tanto, é realizada uma análise indireta e não-invasiva da perfusão sanguínea e reservas de sangue presentes no músculo cardíaco após a administração intravenosa do radionuclídeo (HILGEMBERG *et al.*, 2018; SMANIO; SCHMIDT, 2017). As indicações para realização da cintilografia miocárdica são: pacientes antes da alta hospitalar classe 1 (onde o quadro geral é conclusivo) e pacientes onde há suspeita de revascularização no músculo cardíaco e o procedimento médico nuclear servirá como laudo complementar (SMANIO *et al.*, 2016).

2.3 MEDICINA NUCLEAR

Entende-se por medicina nuclear como a especialidade das ciências médicas ligada à radiobiologia que emprega compostos radioativos ou moléculas marcadas com radionuclídeos, os radiofármacos, para fins terapêuticos e diagnósticos. Nas últimas décadas, este ramo da medicina tem se mostrado como uma ferramenta acurada na avaliação do funcionamento de órgãos específicos do corpo humano, a partir da observação de metabólitos, como também, no diagnóstico e tratamento de inúmeras enfermidades (FLÔR; GELBCKE, 2009; TRENCSENYI *et al.*, 2015; FONTI *et al.*, 2019).

Pode-se dizer que, historicamente o cenário de descobertas e evoluções na medicina nuclear se dá com os estudos com raios-X de Wilhelm Conrad Roentgen, em 1895, e posteriormente com o descobrimento dos primeiros elementos naturalmente radioativos, por Marie e Pierre Curie, em 1898 (SANTOS-OLIVEIRA; CARNEIRO-LEÃO, 2008).

Quase duas décadas após, em 1913, é relatado o primeiro estudo no âmbito da radiofarmácia. O húngaro e químico George de Hevesy comprovou a gênese metodológica do princípio traçador do material radioativo utilizando nitrato de chumbo marcado com o ^{210}Pb em plantas (XAVIER *et al.*, 2007).

Em humanos, os estudos pilotos só ocorreram por volta de 1927, quando Hermann L. Blumgart e Soma Weiss realizaram pela primeira vez a medição da circulação sanguínea, logo após injeção intravenosa de solução salina contendo radônio, com o objetivo de verificar as transformações sofridas pela droga no organismo *in vivo* (OKUNO, 1996; KUBA, 2008).

A princípio, na prática clínica, havia poucos radionuclídeos sendo empregados para diagnóstico. Em geral, grande parte dos estudos se deteve na avaliação fisiológica da glândula tireoidiana, empregando radioisótopos de Iodo-128 e Iodo-131 e, apenas 20 anos mais tarde, estes foram destinados ao uso em terapia de doenças na tireóide, dando início à aplicação sistemática dos radionuclídeos na prática clínica (SOARES, 2002).

Os radionuclídeos são elementos que possuem instabilidade nuclear devido à competição da força coulombiana de repulsão entre prótons e, pela força nuclear de atração entre prótons e nêutrons, prótons e prótons e entre nêutrons (OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Na busca pelo retorno à estabilidade, o núcleo do radioisótopo sofre decaimento/desintegração nuclear, emitindo radiação ionizante, que pode ser na forma de partículas alfa (α), beta (β^-) e pósitrons (β^+), ondas eletromagnéticas (raios X e gama) ou por Elétrons Auger (TAUHATA, 2014).

Por utilizar a detecção externa da radiação emitida pelos radiotraçadores, a técnica de aquisição de imagens permite identificar precocemente muitas doenças, sendo bastante aplicada em áreas da medicina como oncologia, cardiologia, nefrologia e endocrinologia (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Quando administrados, seja por via oral ou intravenosa, as substâncias radiomarcadas seguem rotas metabólicas ou funcionais do organismo vivo e se depositam nos locais pelos quais há predileção específica, o que permite a realização de procedimentos médicos (aquisição de imagens) e confere a esta modalidade diagnóstica o caráter não invasivo, uma peculiaridade que outras não possuem (ROBILOTTA, 2006). Vale ressaltar que, o radionuclídeo – dentre outros aspectos – possui decaimento físico bem estudado e estabelecido na literatura, o que lhe permite confiabilidade quando em contato com o sistema biológico humano, onde, além das desintegrações devido à sua meia-vida física, o radionuclídeo será eliminado do organismo por diferentes vias: pela urina (via excreção urinária), pelo suor (glândulas sudoríparas) ou pelas fezes (metabolização). A junção destes

dois parâmetros (decaimento físico e eliminação por via biológica) é conhecida como tempo de meia-vida efetiva (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Outra característica importante dos exames realizados na medicina nuclear é sua alta sensibilidade e especificidade (VALLABHAJOSULA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2017), isto é, para garantia da segurança, as informações acerca das alterações biológicas são fornecidas utilizando-se concentrações dos radionuclídeos na ordem de nano ou picomolares, repercutindo em uma mínima dose administrada no paciente (CARVALHO, 2014).

Atualmente, os estudos clínicos com radiotraçadores que envolvem a aquisição de imagens utilizando radiofármacos se baseiam em técnicas de tomografia. A escolha da técnica depende intrinsecamente do tipo de emissão do radionuclídeo durante seu decaimento radioativo. Dentre as metodologias utilizadas, destacam-se o PET (Tomografia por Emissão de Pósitron) e SPECT (Tomografia por Emissão de Fóton Único) (WERNICK; AARSVOLD, 2004).

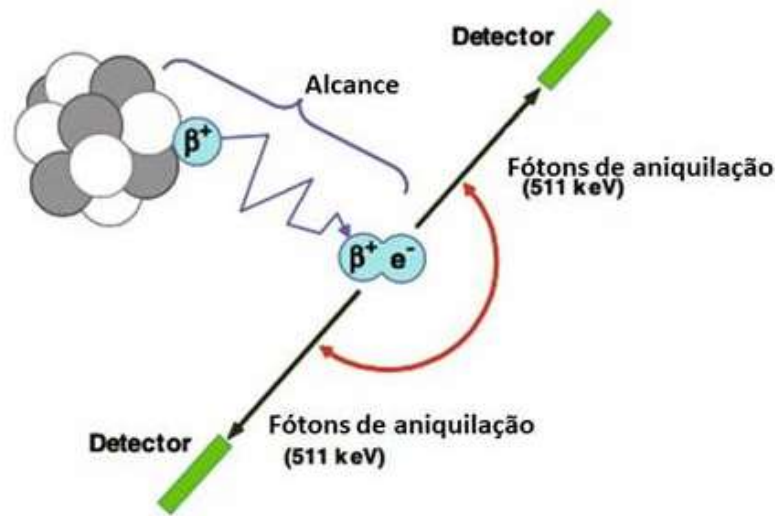
2.3.1 PET/CT

Das técnicas usualmente utilizadas para imagiologia diagnóstica com traçadores está a Tomografia de Emissão de Pósitrons aliada a Tomografia Computadorizada (PET/CT), do inglês *Positron Emission Tomography - Computed Tomography*, que fornece imagens *in vivo* de forma não-invasiva, permitindo mapear de forma segura e eficaz áreas de órgãos com supostas variações morfofuncionais, baseando-se no princípio da radiação emitida pelo isótopo radioativo e captação do radiotraçador pelo órgão alvo (SOARES JUNIOR *et al.*, 2010; HUELLNER; STROBEL, 2014).

No contexto clínico, os exames PET/CT permitem o diagnóstico molecular por imagem híbrida, com ampla indicação para detecção do câncer e, mais recentemente, para diagnóstico de doenças inflamatórias e infecciosas (CZERNIN *et al.*, 2006; BAI, 2013; JIMÉNEZ-BONILLA; BANZO, 2018).

Para aquisição da imagem, a PET se baseia no princípio da detecção coincidente de um par de fótons (emitidos em direções opostas), formados a partir da aniquilação de um pósitron com um elétron do meio (Figura 3), processo este, resultante do decaimento radioativo de um emissor β^+ (PARGHANE; BASU, 2018).

Figura 3 – Princípio do PET.



Fonte: Modificado de Lecomte, 2008.

Quando os dois fótons, cada um com energia de 511 keV, são detectados simultaneamente por um conjunto de cristais de cintilação, há conversão da radiação eletromagnética em luz visível que, posteriormente, é convertida em sinal eletrônico por um sistema de canais fotomultiplicadores; este sinal eletrônico, por sua vez, é registrado e reconstruído no sistema computacional, gerando assim a imagem PET (CHERRY *et al.*, 2012).

Como dito anteriormente, a PET utiliza radioisótopos emissores de radiação do tipo β^+ . Esta emissão ocorre em núcleos onde há desequilíbrio na relação prótons/nêutrons. Nos núcleos com excesso de prótons, a estabilidade pode ser atingida por meio da emissão de pósitrons (decaimento tipo β^+) ou por meio de captura eletrônica (EC). Para emissão β^+ , como esquematizado na equação 1, ocorre transformação do próton (${}^1_1\text{p}$) em um nêutron (${}^0_1\text{n}$), com emissão de uma partícula (${}^+_0\text{e}$) e um neutrino (ν).



Após a desintegração, o núcleo inicial (pai) ${}^A_Z\text{X}$ origina um núcleo filho que, segue com o valor de massa inalterado, porém o número atômico sofre decréscimo de menos um próton, ${}^A_{Z-1}\text{X}$ (TURNER, 2007). Sabendo-se que o núcleo filho possui menor massa que o

núcleo pai, é possível calcular a energia do processo por meio da equação de equivalência entre massa e energia de Einstein, $E = mc^2$.

O pósitron gerado do decaimento apresenta massa igual a massa do elétron ($9,109 \times 10^{-31}$ kg), porém carga de sinal oposto ($+1,602 \times 10^{-19}$ C), configurando-se então, como sua antipartícula. O resultado da colisão entre a antipartícula e sua respectiva partícula, origina o fenômeno de aniquilação.

Usualmente, os radionuclídeos emissores de pósitrons utilizados na medicina são produzidos em cíclotrons¹ que variam de acordo com a forma, podendo ser do tipo linear ou circular (LUIZ *et. al.*, 2011). Na tabela 4 estão exemplificados alguns dos radionuclídeos produzidos em cíclotrons que são utilizados na medicina nuclear via PET, mostrando características como tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) e a energia máxima ($E_{\beta+}$) do pósitron presente no meio.

Tabela 4 – Emissores de pósitrons produzidos em cíclotrons utilizados na medicina nuclear.

Radionuclídeo	$T_{1/2}$ (min)	$E_{\beta+}$ max (Mev)	Alcance máximo em água (mm)
¹¹ C	20,4	0,959	5,0
¹³ N	9,96	1,197	5,4
¹⁵ O	2,07	1,738	8,2
¹⁸ F	109,8	0,650	2,4

Fonte: modificado de Rabilotta (2006).

Existem hoje, diversos radioisótopos cíclotron-produzidos na medicina. Dentre esses, o mais amplamente utilizado e difundido é o ¹⁸F marcando o FDG (fluorodeoxiglicose). O ¹⁸F-FDG atua como um radiofármaco análogo à glicose, utilizado em exames PET e PET/CT para detecção de múltiplas patologias, como: oncogênicas e doenças inflamatórias e infecciosas (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BEADSMOORE *et al.*, 2015). Em adição, novas pesquisas estão se estabelecendo no Brasil a fim de fortalecer a produção e comercialização de novos radiofármacos marcados com ¹⁸F para diagnóstico e acompanhamento de variados tipos de tumores, como por exemplo, o ¹⁸F-Colina, ¹⁸F-FLT e o ¹⁸F-FAZA (IPEN, 2017).

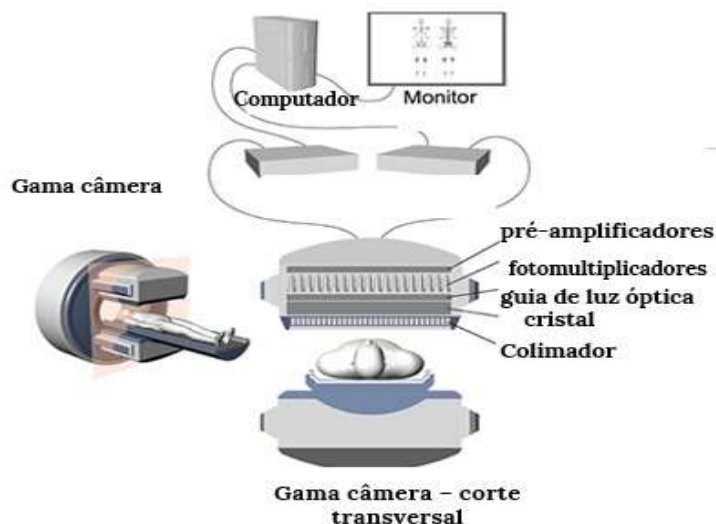
¹ Equipamento capaz de acelerar partículas carregadas, fazendo-as atingir altas velocidades, proporcionando a elevação da sua energia, a fim de, gerar como produto final matéria em grande quantidade, por meio das colisões entre os feixes de partículas.

2.3.2 SPECT/CT

Similar ao PET/CT, a Tomografia por Emissão de Fóton Único acoplada à Tomografia Computadorizada (SPECT/CT) baseia-se no princípio da utilização de um radiotraçador – geralmente, por administração intravenosa - para avaliação diagnóstica das funções fisiológicas e metabólicas dos órgãos e tecidos (VAN AUDENHAEGE *et al.*, 2015). Na modalidade SPECT/CT, os fótons emitidos em decorrência do decaimento radioativo seguem diferentes direções, contudo, apenas aquele de energia mais alta e perpendicular à superfície do detector é coletado e utilizado para criação das imagens pela gama câmera, fato este, decorrente da presença de colimadores no equipamento (KHALIL, 2010).

Basicamente, as imagens são geradas pelo dispositivo quando o fóton emitido pelo radionuclídeo chega primariamente ao colimador. Nele, ocorre produção de luz de cintilação a partir da interação fóton - cristal detector. Na sequência, um sistema de fotomultiplicação converte o sinal luminoso em sinal eletrônico, permitindo assim a formação e reconstrução das imagens por meio de um software (Figura 4) (LIVIERATOS, 2012). Para a coleta das imagens, a gama câmera gira em torno do corpo do paciente com ângulo de até 360°, obtendo imagens sobrepostas que são reconstruídas e reorganizadas pela técnica de retroprojeção (HICKS; HOFMAN, 2012; RITTS *et al.*, 2014).

Figura 4 – esquema dos componentes da gama camera.



Fonte: Modificado de REBELLO, 2019.

Para aprimorar a resolução das imagens do equipamento SPECT, atualmente, os cristais de cintilação utilizados são constituídos de iodeto de sódio, por se tratar de um material econômico capaz de converter proporcionalmente em luz no espectro do visível a energia do fóton que é depositada. Além disso, materiais semicondutores como o CZT (Telureto de Cádmio e Zinco) também estão sendo usados no sistema de conversão fóton-luz, a fim de, aperfeiçoar cada vez mais a técnica (LJUNGBERG; PRETORIUS, 2018; RITTS *et al.*, 2014).

No que diz respeito às informações clínicas fornecidas pela técnica, o sistema híbrido para obtenção das imagens devido ao acoplamento do SPECT à TC permite a obtenção de imagens morfofuncionais, mas também, permite alto desempenho na aquisição de mapas com reconstruções anatômicas que possibilitam fazer diretamente correlações com quaisquer anormalidades, aumentando a sensibilidade e especificidade da técnica cintilográfica (BUCK *et al.*, 2008; MOHAN *et al.*, 2018).

Na medicina nuclear, as aplicações para aquisição de imagens via SPECT/CT são variadas: detecção de focos de angiogênese para avaliação da viabilidade do miocárdio, artrografia das articulações, monitoramento de distúrbios músculo-esqueléticos de extremidades, avaliação da ventilação e perfusão pulmonar, detecção de tumores e afins (HUELLNER; STROBEL, 2014; BHURE *et al.*, 2018; MONTEMAGNO *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019).

Dos radionuclídeos mais comumente utilizados nos procedimentos médicos para diagnóstico via SPECT/CT, destaca-se o tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc), um isômero nuclear metaestável do tecnécio-99, obtido a partir do decaimento radioativo do molibdênio (^{99}Mo) (CHROUSTOVÁ *et al.*, 2019; GIL *et al.*, 2019).

2.3.3 Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

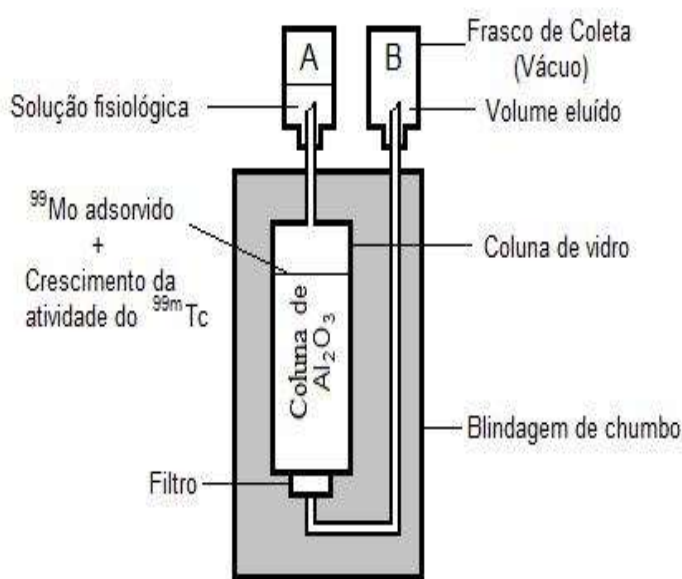
Estima-se que, cerca de 90% dos procedimentos clínicos cintilográficos dentro da média mundial, sejam realizados com o uso do ^{99m}Tc , devido a sua disponibilidade (obtenção via gerador ou, mais recentemente, por ciclotron) e propriedades físico-químicas intrínsecas ao radionuclídeo por se tratar de um metal de transição que pode atingir variados estados de oxidação facilitando à incorporação de diferentes biomoléculas (ARAÚJO, 2008; LE, 2014; GIL *et al.*, 2019; TEJERÍA *et al.*, 2019). Tal fato repercute em maior estímulo na busca por novos marcadores sintéticos ou moleculares complexados ao radionuclídeo, que sejam

capazes de aumentar a sensibilidade, especificidade e robustez dos exames SPECT/CT (BAUMEISTER *et al.*, 2018; SHAMSI *et al.*, 2018; DAS *et al.*, 2019).

Por se tratar de um elemento de número atômico 43, o Tc é um metal de transição membro da família 7B da tabela periódica, situado entre o manganês e o rênio. Esta localização permite uma elevada química de coordenação no que diz respeito aos estados de oxidação do elemento, uma vez que, ao apresentar estados redox, que variam desde o +7 ao -1, pode-se incorporar ao elemento uma matriz de radiofármacos específicos e inovadores para estudos morfofuncionais dentro da modalidade SPECT/CT (BAUMEISTER *et al.*, 2018; TEJERÍA *et al.*, 2019).

Por muitos anos, sua produção ocorreu unicamente por meio de um sistema gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. O dispositivo (Figura 5) é constituído de uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio (Al_2O_3), onde o elemento “pai”, na forma de molibdato de sódio ($^{99}\text{MoO}_4^{2-}$) é depositado e se desintegra originando o íon pertecnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$). Por possuir afinidades distintas pela coluna cromatográfica, durante o processo de eluição com solução salina, o ^{99}Mo fica retido na coluna, enquanto o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ juntamente a seu isômero não radioativo, o $^{99}\text{TcO}_4^-$, são extraídos do gerador (MARQUES *et al.*, 2001; ARAÚJO, 2008; STOTHERS *et al.*, 2019).

Figura 5 – Esquema do sistema gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

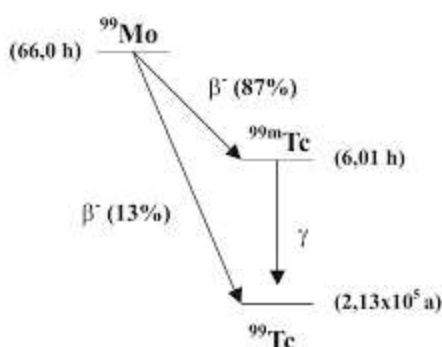


A= frasco por onde passa o eluente/ B = frasco para coleta do eluente sob vácuo.

Fonte: Andrade, 2012.

Contudo, é importante ressaltar que há, pelo menos, duas formas de desintegração para o ^{99}Mo : com tempo de meia vida de 66h este radionuclídeo pode se desintegrar originando diretamente o ^{99}Tc (não radioativo) ao emitir radiação do tipo β^- (beta), isto é, com chance mínima de 13%, ou decair (com probabilidade de 87%) por emissão β^- a $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Este por sua vez, por possuir instabilidade nuclear se desintegra emitindo radiação γ (gama) originando o ^{99}Tc (IAEA, 2008). Um resumo deste processo pode ser observado na figura 6.

Figura 6 – Esquematização do decaimento radioativo do ^{99}Mo a ^{99}Tc .



Fonte: Marques *et al.*, 2001.

Devido à escassez na disponibilidade do ^{99}Mo produzido por reatores (dependentes de urânio altamente enriquecido – ^{235}U) no mercado internacional, nos últimos anos buscou-se como alternativa rotas de produção em larga escala do tecnécio-99m (DODD *et al.*, 2002; KRIJGER *et al.*, 2013; UZUNOV *et al.*, 2018). Como resultado, a produção do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por meio de ciclotron (CPTc) foi viabilizada e tornou-se um método substituto ao modo de produção gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (HOU *et al.*, 2016; UZUNOV *et al.*, 2018). Para esta tecnologia [^{100}Mo (p, 2n) / $^{99\text{m}}\text{Tc}$], o radionuclídeo de interesse é obtido por meio de irradiação, onde um alvo de molibdênio (^{100}Mo) é bombardeado por feixes incidentes de deutérios na faixa de energia de 15 a 20 MeV (SELIVANOVA *et al.*, 2015; MARTINI *et al.*, 2016).

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ obtido tanto em gerador quanto em ciclotron, decai por meio de emissões gama em 140 keV de energia e possui tempo de meia vida de cerca de 6 horas (BÉ *et al.*, 2004; CAPOGNI *et al.*, 2018). Dos aspectos farmacológicos, a farmacocinética do radionuclídeo é rápida, após 30 min de administração intravenosa pode-se detectar níveis consideráveis do mesmo em órgãos como tireoide; a excreção é inicialmente por via urinária e com 48h têm-se eliminação via intestinal. Sua metabolização pode ocorrer via hepática ou

renal; devido a sua decomposição, há acúmulo do radionuclídeo no trato gastrointestinal (PAPAGIANNOPOULOU, 2017). Há comprovação de interação medicamentosa do tecnécio complexado com fármacos como atropina e alguns analgésicos (IPEN, 2015).

Em adição, sabe-se que, diretamente sua utilização se restringe a estudos de primeira passagem, isto é, por ser administrado por via intravenosa, o ^{99m}Tc se difunde pelas membranas capilares para alcançar o espaço intersticial nos órgãos e tecidos. Entretanto, uma vez complexado a biomoléculas (como anticorpos, peptídeos e lipossomas) e outros ligantes sintéticos (a exemplo, antibióticos e análogos), suas aplicações na medicina nuclear se expandem, contribuindo assim para sua utilização nos mais variados tipos de diagnóstico na medicina nuclear (DIAS, 2015).

Cumprе ressaltar também que, além da marcação de biomoléculas naturais e sintéticas, o ^{99m}Tc tem sido empregado na radiomarkação de células humanas (leucócitos e hemácias), sendo reportado na literatura atual como radiotraçador específico no diagnóstico de infecções e inflamações, bem como, em casos de cardiopatias e doenças gastrointestinais (SILVA *et al.*, 2018; SENGÖZ *et al.*, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), estas suspensões são consideradas preparações extemporâneas estéreis, facilmente influenciadas durante o processo de manipulação celular, recomendando-se proceder de acordo com os procedimentos padrões para radiomarkação.

2.3.4 Controle de qualidade dos radiofármacos marcados com ^{99m}Tc

Sabe-se que, ao longo do processo produtivo dos radiofármacos alguns cuidados devem ser tomados para garantir seu uso diagnóstico e/ou terapêutico. Dentre os parâmetros de avaliação preestabelecidos pelas farmacopéias vigentes estão os testes de controle de qualidade (CQ) (MIRANDA *et al.*, 2019). Para o ^{99m}Tc , em particular, os testes de CQ recomendados são: pureza química, radioquímica e radionuclídica, pureza física, esterilidade, apirogenicidade, aparência (inspeção visual) e medida de pH (EP, 2005; USP, 2006; IAEA, 2008; EP, 2009; LOVELESS, 2009; USP, 2010; VRIES *et al.*, 2010; USP, 2012).

Os ensaios de controle de qualidade realizados para avaliação da integridade do eluato do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ e radiofármacos marcados com ^{99m}Tc são descritos a seguir:

- **Aparência (inspeção visual):** A aparência da solução deve ser límpida e incolor. Contudo, alguns radiofármacos complexados ao ^{99m}Tc são particulados, podendo apresentar turbidez que varia do branco ao leitoso (LOVELESS, 2009; WHO, 2017; Ph. Int., 2019).

- **pH:** Teste que busca equiparar o potencial hidrogeniônico da amostra do radiofármaco com a do meio/fluido corporal no qual será inserido. Ideal para este parâmetro o valor seja o mais próximo do pH fisiológico de 7,4, sendo aceitos valores entre 3,8 e 7,5, visto que a capacidade de tamponamento do sangue é elevada. Para medição, é recomendado utilizar pHmetro e tiras indicadoras de pH em escalas de 0,5 (EP, 2010; USP, 2010; USP, 2012; WHO, 2017).
- **Pureza Química:** Refere-se à fração do material em sua forma química desejada, isto é, trata-se da avaliação quantitativa ou qualitativa de espécies químicas indesejadas que ocasionalmente estão presentes na formulação final. Considera-se como impurezas químicas, todas as substâncias não radioativas que possam interferir na radiomarcagem, como por exemplo levar à aglutinação de Hemácias- ^{99m}Tc e causar efeitos adversos quando em contato com os sistemas biológicos. A exemplo, têm-se os íons de Al^{+3} proveniente da coluna cromatográfica existente no sistema gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. A USP (2010/2012) limita a quantidade deste íon para $10\text{ }\mu\text{g Al}^{+3} / \text{ml}$ de eluato de ^{99m}Tc (LOVELESS, 2009).
- **Pureza Radioquímica:** Indica a fração expressa em porcentagem da radioatividade do radionuclídeo estudado em sua fórmula química de interesse, em relação à radioatividade total da formulação farmacêutica. Impurezas radioquímicas surgem devido à decomposição a partir da ação de solventes, alterações na temperatura e no pH, presença de agentes redutores ou oxidantes, reações de síntese incompletas e radiólise; quando presentes, levam à diminuição da qualidade da imagem e exposição à radiação desnecessária ao paciente (IAEA, 2008; SAHA, 2010). Pelo menos três produtos podem ser detectados por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): pertecnetado livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), ^{99m}Tc -hidrolisado e ^{99m}Tc ligado à molécula de interesse. De acordo com a USP (2010/2012), para controle de qualidade do radionuclídeo, o percentual aceito deverá ser de 95%, sendo este valor estimado pelo cálculo do R_f (fator de retenção), que corresponde numericamente ao quociente da distância percorrida pela amostra pela distância percorrida pela fase móvel. Ainda segundo a farmacopéia vingente, em fase móvel constituída por solventes polares como acetona e butanona, o R_f do pertecnetado livre encontra-se entre 0,6 a 1,0, enquanto o ^{99m}Tc ligado á molécula de interesse, permanece retido no ponto de aplicação, na fase estacionária. Em paralelo, a avaliação por CLAE corresponderá ao pico principal no radiocromatograma.

- **Pureza Radionuclídica:** Teste que avalia, quantifica e discrimina se as emissões de energia da amostra de interesse correspondem ao radionuclídeo constituinte do radiofármaco sintetizado, isto por meio da verificação do espectro de emissão e do tempo de meia-vida ($T_{1/2}$), que corresponde ao intervalo de tempo para que a atividade do radionuclídeo decaia à metade do seu valor inicial. Radionuclídeos como o tecnécio-99m, que decaem por emissão de radiação eletromagnética, tem seus espectros obtidos por meio de detectores como NaI (TI) e o HPGe. Das impurezas presentes no eluato obtido via gerador, têm-se o ^{99}Mo . Segundo a farmacopéia européia e britânica (2010), o limite para presença do molibdênio varia de 0,15 a 1 kBq ^{99}Mo / 1MBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$.
- **Esterilidade:** Teste empregado para detecção de microrganismos contaminantes que supostamente podem estar presentes no radiofármaco sintetizado. De acordo com os compêndios oficiais, o teste deve ser realizado por inoculação direta, isto é, após decaimento radioativo, uma alíquota da amostra do radiofármaco deverá ser inoculada em tubos contendo meio de tioglicolato fluido para observação de promoção do crescimento (turvação do meio) de bactérias anaeróbicas e meio TSB para crescimento de fungos, leveduras e bactérias aeróbicas, produzidos de acordo com as instruções do fabricante (EP, 2010; USP, 2010; VRIES *et al.*, 2010; USP, 2012).
- **Apirogenicidade (Teste de Endotoxinas):** Endotoxinas são complexos de alto peso molecular constituintes da parede celular das bactérias Gram-Negativas com alto potencial pirogênico, podendo estar presentes em produtos farmacêuticos não esterilizados ou despirogenizados de forma inadequada. Esses complexos podem conter moléculas lipídicas, proteínas e carboidratos que, por se comportarem como pirógenos induzem alterações patofisiológicas como: febre, mudança na contagem de leucócitos, hipotensão e choque, podendo levar à morte (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). Nas formulações de injeção intravenosa, o produto não deve conter mais que 175/V unidades de endotoxinas por mL de injeção (EP, 2010; USP 2010; USP, 2012; WHO, 2017). A técnica mais reconhecida e utilizada para determinação de endotoxinas bacterianas baseia-se na avaliação cinética-cromogênica-colorimétrica com produção de turbidez, precipitação e/ou gelificação da mistura de endotoxinas bacterianas com solução lisado de amebócitos de caranguejo-ferradura, conhecido como *Limulus polyphemus*.

Além dos testes descritos acima, quando o produto final da marcação são células ligadas ao ^{99m}Tc , em termos de validação de metodologias analíticas, recomenda-se a realização de ensaios como estabilidade de cinco horas da suspensão radiomarcada, determinação do percentual de eficiência de marcação e viabilidade celular por exclusão utilizando azul de tripano, sendo a realização deste último opcional, isto é, quando a eficiência de marcação for oscilante entre o grupo amostral ou inferior a 50% (IAEA, 2008; VRIES *et al.*, 2010). Os testes estão detalhados abaixo:

- **Estabilidade:** Pode ser definida como o tempo entre a fabricação/síntese do radiofármaco e o momento em que o mesmo apresenta 10% da sua potência reduzida, de forma que sejam mantidas suas propriedades físicas, químicas, microbiológicas e terapêuticas (BRASIL, 2005; SILVA, 2009). De acordo com a RDC 64 (ANVISA, 2009), para radiofármacos de meia-vida menor que um ano, o estudo de estabilidade deve ser adaptado, com análises frequentes com cinco pontos incluindo o inicial. Para tanto, as condições do teste devem ser padronizadas no tocante à temperatura e umidade (IAEA, 2008).
- **Determinação do percentual de eficiência de marcação (%EM):** Refere-se ao percentual de radioatividade associado às células marcadas, sendo obtido por meio da razão da atividade do pellet (sedimento celular) pelo somatório da atividade do pellet e sobrenadante, ambos multiplicado por 100. Segundo o último guideline da Associação Europeia de Medicina Nuclear (EANM) (VRIES *et al.*, 2010), o limite esperado para este teste deve ser superior a 50%.
- **Viabilidade celular por exclusão com azul de tripano:** Avalia quantitativamente o número de células viáveis presentes na suspensão após o término do processo de radiomarcção. A solução corada (azul de tripano) possui capacidade de atravessar passivamente a membrana plasmática das células destruídas, enquanto as células viáveis permanecem íntegras e não coradas. Para células radiomarcadas com o ^{99m}Tc , a cada preparação o ideal é se obter uma viabilidade celular $\geq 98\%$ (VRIES *et al.*, 2010).

É válido acentuar que em simultâneo aos testes mencionados acima, a quantificação da porcentagem da radioatividade do ^{99m}Tc ligado às proteínas no plasma deve ser determinada, por se tratar de uma análise indicadora de comprometimento da ligação do radionuclídeo às células sanguíneas, isto é, devido à presença no plasma de proteínas transportadoras de alta

afinidade, a ligação do tecnécio às células pode ser inviabilizada ou diminuída. O método de precipitação de proteínas com o ácidotricloroacético (TCA) 5% é a técnica mais indicada a ser realizada. Contudo, segundo Freitas e colaboradores (2002), variações no percentual de ligação podem ser encontrados a cada estudo devido à farmacocinética e tipos de agentes de diagnóstico utilizados.

2.3.5 Radiofármacos marcados com ^{99m}Tc para avaliação diagnóstica de sangramentos gastrointestinais e doenças cardiovasculares

Nos últimos anos, muitos radiofármacos têm sido propostos na prática clínica para determinação dos focos hemorrágicos e avaliação da perfusão miocárdica (DIAS, 2015; PAPAGIANNOPOLOU, 2017; COSTA *et al.*, 2019). O princípio básico da marcação, envolve a redução do tecnécio-99m a seu menor estado de oxidação, viabilizando sua ligação à molécula de interesse (ANDRADE, 2012).

Em sua maioria, os radiofármacos a serem marcados são comercializados em kits estéreis liofilizados, contendo necessariamente um agente redutor (geralmente o cloreto estanoso – SnCl_2) e o quelante (molécula ligadora) em proporções já bem estabelecidas por seu fabricante. Funcionalmente, estes compostos se acumulam nos sítios-alvo por meio de interações específicas do radiofármaco com seu o alvo: ligação a receptores e transportadores de membrana, como ocorrem com as hemácias radiomarcadas com ^{99m}Tc (base deste estudo) e sinalizadores de inflamação (por meio da marcação de imunoglobulinas e lipossomas) (BENALI *et al.*, 2015; SHAH; ALAM, 2017; FOLLACCHIO *et al.*, 2019).

Na Tabela 5 abaixo estão apresentados de forma resumida os principais radiofármacos marcados com ^{99m}Tc utilizados na medicina nuclear para diagnóstico de infecções e avaliação cardiológica.

Tabela 5 - Radiofármacos SPECT/CT complexados ao ^{99m}Tc para avaliação diagnóstica de sangramentos gastrointestinais e perfusão miocárdica.

Radiofármacos- ^{99m}Tc	Precursor	Aplicação
^{99m}Tc -Sestamibi	Cátion lipofílico do grupo das isonitrilas	Avaliação da perfusão miocárdica
^{99m}Tc -Tetrafosmin	Fármaco da família das difosfinas	Avaliação da perfusão miocárdica
^{99m}Tc -Teboroxima	Ácido borônico	Avaliação da perfusão miocárdica
^{99m}Tc -Hemácias	Células humanas autólogas	Avaliação da perfusão miocárdica/ Diagnóstico de IAM*/Detecção de sangramentos no TGI*
^{99m}Tc - enxofre coloidal	Enxofre	Avaliação da função hepatobiliar e sangramentos no TGI inferior
^{99m}Tc -PYP (pirofosfato)	Pirofosfato tetrassódico – sintético	Avaliação da perfusão miocárdica/ marcação de hemácias/ Detecção de sangramentos no TGI

*IAM= Infarto Agudo do Miocárdio/ TGI = Trato Gastrointestinal

Fonte: a autora, 2020.

Na avaliação diagnóstica utilizando o *pool* sanguíneo, a marcação de hemácias com o ^{99m}Tc é um método indicado na medicina nuclear para detecção tecidos necróticos (em casos de cardiopatias) e sítios hemorrágicos ativos (nos sangramentos gastrointestinais) (CHOI *et al.*, 2019). Esta utilização se deve ao fato de que há relativa abundância na concentração celular e facilidade na capacidade do radiocomplexo em difundir no espaço intravascular de forma lenta e contínua, permitindo a formação de imagens de alta resolução (LIU *et al.*, 2017).

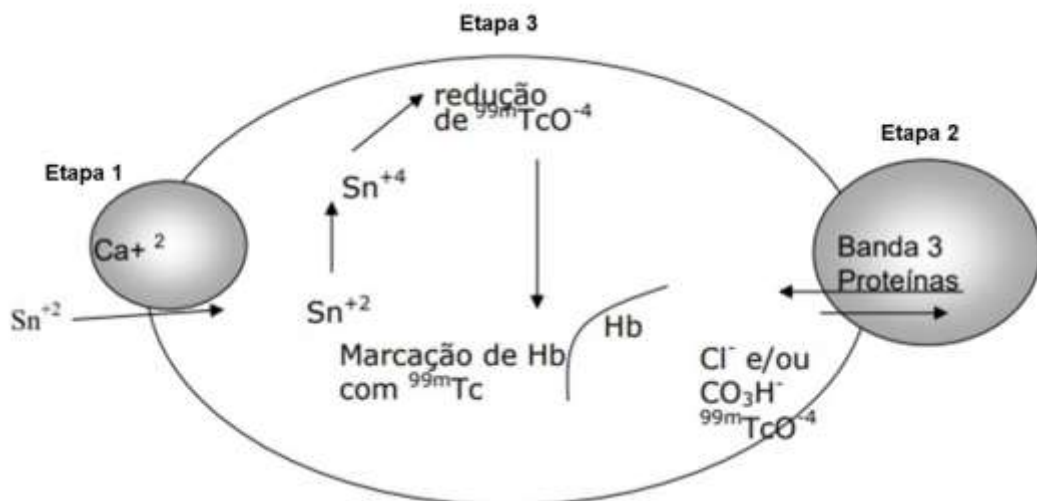
Microscopicamente, estas células apresentam-se em formato bicôncavo e anuclear, sendo essenciais para o suprimento celular de gases (O_2 e CO_2) e manutenção da homeostasia fisiológica (equilíbrio ácido-base) (FOCOSI; AMABILE, 2018). Além disso, mais recentemente tem sido reportada na literatura a participação direta dos glóbulos vermelhos na homeostase cardiovascular, por meio de reações – ainda não muito bem compreendidas - mediadas pelo óxido nítrico (NO) (BOSMAN, 2018).

Em sua estrutura, as hemácias possuem abundantemente proteínas do tipo hemoglobina (Hb), responsáveis por executar o transporte e armazenamento do O_2 dos

pulmões para os tecidos. Em sua composição quaternária com dobramento α -hélice, a Hb possui quatro grupamentos proteícos globínicos e um único grupamento prostético, chamado de heme. As cadeias de globina, são subdivididas em duas unidades α e β , ambas idênticas, com peso molecular de cerca de aproximadamente 16 kDa (COATES; DECKER, 2016).

Até os dias de hoje, não foram comprovados todos os mecanismos envolvidos no processo de marcação do radionuclídeo nas hemácias. Em resumo, sabe-se que o influxo do íon estanoso (Sn^{+2}) e o íon pertecnetato para dentro das células é mediado respectivamente, pelo transporte nos canais de cálcio (Ca^{+2}) e no sistema de proteínas banda-3 presentes na membrana plasmática das hemácias. O mecanismo de entrada e saída desses íons dependente de gasto energético (com trocas iônicas com Cl^- e CO_3H^-) com influência direta e negativa da temperatura. Uma vez no compartimento celular interno, o tecnécio é reduzido ao seu menor estado de valência ($^{99\text{m}}\text{TcO}^{-4}$) e interage por meio de ligações covalentes do tipo coordenadas e irreversíveis com a globina (porção β) das hemácias (CALLAHAN; RABITO, 1990; MEYER, 2008). Uma representação esquemática do processo de marcação é mostrada na figura 7.

Figura 7- Via intracelular de marcação de hemácias com $^{99\text{m}}\text{Tc}$.



Etapa 1: Influxo de Sn^{+2} por meio dos canais de cálcio; Etapa 2: Entrada do íon pertecnetado pelo sistema proteíco banda-3; Etapa 3: Redução do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e sua ligação à hemoglobina das hemácias (radiomarcação).

Fonte: Modificado de Oliveira Júnior, 2003.

É importante frizar que, para uma efetiva marcação, o tecnécio deve atingir o menor estado de oxidação, sendo esta redução intermediada e dependente da presença do SnCl_2 , do contrário, o tecnécio, na forma de pertecnetato de sódio circula livremente entre as células

sem que ocorra nenhuma ligação (REHANI; SHARMA, 1980). Exemplificando, assim como no método *in vitro*, na marcação direta *in vivo* e *in vitro*, ao paciente inicialmente é administrado por via endovenosa, o cloreto estanoso como forma de tratamento pré-estaninização. Com 30min o sangue é coletado e as células são isoladas e radiomarcadas para serem reinjetadas ao paciente. Assim há garantia da redução do radionuclídeo e uma vez que as células estão em suspensão em um curto espaço de tempo não há risco de ocorrência de hemólise celular (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2003; AHMAD et al., 2014).

Com base nas evidências descritas anteriormente, é perceptível que a radiomarcagem de células sanguíneas se trata de um método vantajoso e de extrema utilidade na medicina nuclear, podendo ser utilizadas como biomoléculas traçadoras no diagnóstico de tais doenças. Tendo como base este fato, as pesquisas atuais se propõem a elaborar e padronizar metodologias de fácil execução e menos onerosas, mantendo a qualidade, segurança e eficácia do método proposto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios de síntese e controle de qualidade da biomolécula ^{99m}Tc -célula foram realizados na Divisão de Produção de Radiofármacos (DIPRA) em colaboração ao Laboratório de Dosimetria Biológica (LDB), do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN/NE. Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), número do CAAE: 26306019.0.0000.5208 (Anexo A).

3.1 MATERIAIS

Foram utilizados os seguintes reagentes e utensílios: seringa de 5 e 10 ml; tubos de coleta de sangue com anticoagulante EDTA; tubo falcon estéreis de 15 e 50 ml; pipetas Pasteur de 3ml; tubos eppendorf; solução de NaCl a 0,9% estéril; Fycoll-Paque Plus; Azul de Tripiano (Trypan Blue Solution - 0,4%); Cloreto de Estanho II Dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); papel Watman 3 MM; Metil Etil Cetona (Butanona – $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_3$); Meio Fluido Tioglicolato; Caldo Caseína de Soja; Ácido Tricloroacético (TCA) a 5%.

Os principais equipamentos utilizados foram: câmara de Neubauer; microscópio óptico; centrífuga com desaceleração; estufas; capela de fluxo laminar; activímetro; detector de germânio hiperpuro HPGe, modelo CG1020, da Canberra (Meriden, Estados Unidos); TLC-Scanner, modelo Beta Detector GMC, da RayTest (Straubenhardt, Alemanha).

3.2 MÉTODOS

A metodologia de testagem foi dividida inicialmente visando comprovar a qualidade do eluato utilizado, para garantir que a radiomarcção celular não fosse comprometida. Para tanto, foram realizados os testes de determinação do potencial hidrogeniônico (pH) e avaliação da esterilidade do eluato.

Na sequência de testes, as células (hemácias) foram isoladas e radiomarcadas com o ^{99m}Tc (objetivo principal do trabalho). Em adição, como método complementare para comprovação da eficiência de marcação, foi avaliado o percentual de ligação do ^{99m}Tc às proteínas plasmáticas e realizado o teste de estabilidade de 5 horas.

3.2.1 Controle de qualidade: caracterização do eluato

Para garantia da qualidade das amostras do eluato utilizadas no estudo, optou-se por realizar o teste de determinação do potencial hidrogeniônico (pH) e esterilidade por inoculação direta. Abaixo estão descritas de forma detalhada as metodologias para cada ensaio.

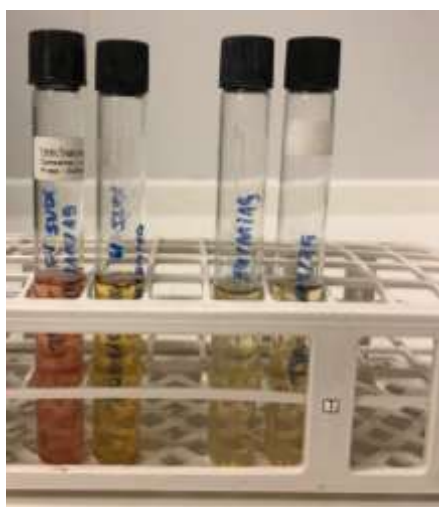
3.2.1.1 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Para aferição do pH da preparação contendo o ^{99m}Tc procedeu-se a aferição do potencial hidrogeniônico (pH) utilizando fitas de medição de pH padronizadas com intervalos de medições de 0,5. Uma alíquota da amostra foi aplicada na região teste da fita – como recomendado pelo fabricante – e após 1min comparou-se a reação colorimétrica ocorrida com o padrão presente na embalagem. Assim, como recomendado pelas farmacopeias internacionais, espera-se encontrar o pH na faixa entre 3,8 a 7,5.

3.2.1.2 Avaliação da esterilidade do eluato

Por inoculação direta, 1ml da amostra foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10ml de *Meio fluido tioglicolato*, para cultivo de bactérias anaeróbias e/ou aeróbias e em meio *Caldo caseína de soja (TSB)*, para cultura de leveduras e fungos (Figura 8).

Figura 8- Meios de cultura líquidos TSB e Tioglicolato.



Fonte: a autora, 2020.

Como recomendado pelos compêndios oficiais, a inoculação foi realizada em capela de fluxo laminar, utilizando meio, alças e seringas estéreis após decaimento radioativo de pelo menos 10 meia-vidas. Todo o procedimento foi realizado em triplicata/amostra.

As amostras foram incubadas por 14 dias em estufa a 33 ± 2 °C e 23 ± 2 °C, para cultivo em meio tioglicolato e TSB, respectivamente. O resultado é baseado na ausência de turbidez no meio de inoculação da amostra.

3.2.2 Isolamento e radiomarcção das hemácias com o ^{99m}Tc

Para isolamento e radiomarcção, foi seguido o protocolo adaptado do guia “Células autólogas radiomarcadas: métodos e padronização para uso clínico” da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2015).

Amostras de 10 ml de sangue periférico total de 4 voluntários sadios (sem sintomatologia ou quadro clínico comprovado de cardiopatia e/ou hipertensão arterial) foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA com o auxílio de seringas de 10 ml. O sangue coletado foi fracionado, obtendo-se alíquotas de 0,5 ml e 3 ml, em triplicata cada.

Às amostras de 0,5 ml, foram adicionados 500µl de Cloreto Estanhoso ($1,2 \mu\text{g/ml}$ de SnCl_2 em salina) e incubou-se por 60 min em temperatura ambiente ($23\text{-}25^\circ\text{C}$). Em seguida, 0,1ml de ^{99m}Tc ($3,7 \text{ MBq}$) na forma de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ foi acrescida à solução. Nesta etapa, procedeu-se com a aferição do pH, assim como descrito no item 3.2.1.1. De acordo com a Farmacopeia Europeia (EP, 2015), a faixa de pH recomendável para marcação de células sanguíneas com isótopos radioativos deve ser a mesma do sangue em situações de normalidade fisiológica, 7,35 a 7,45. Entretanto, pequenas variações podem ser aceitas visto que, o volume e concentração dos radiofármacos injetáveis são relativamente pequenos em relação à capacidade de tamponamento do sangue circulante.

Passados 10 min, as amostras foram centrifugadas a rotação de 1.500 rpm (aproximadamente 400G) por 15min, obtendo-se assim uma fração de plasma (FP) e células (FC) separadamente. É importante ressaltar que nesta etapa, a técnica de centrifugação é eficiente no que diz respeito ao isolamento das hemácias, por separar (devido ao tamanho e densidade) estas células das demais populações celulares. Assim, as hemácias ficam depositadas na porção inferior do tubo e na região superior encontra-se o plasma, leucócitos e plaquetas.

Para o volume de 3 ml, foram acrescentados proporcionalmente, 3 ml de SnCl_2 em salina, 0,6 ml de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ e centrifugação de 25min, procedendo de acordo com a metodologia descrita acima. Ao final, o percentual (%) da atividade de cada fração sanguínea foi contada em Contador Gama do tipo HPGe (High Purity Germanium), todas as medidas com duração de 300 seg a uma distância de 13 cm do detector.

É importante mencionar que, em simultâneo ao controle de qualidade do eluato, no teste de pureza radioquímica, replicatas ($n = 6$) das amostras de hemácias radiomarcadas com o ^{99m}Tc foram submetidas à corrida cromatográfica em salina e acetona para obtenção do valor referente ao percentual de eficiência de marcação do radiofármaco.

3.2.3 Avaliação do percentual de ligação do ^{99m}Tc às proteínas plasmáticas: precipitação por TCA 5%

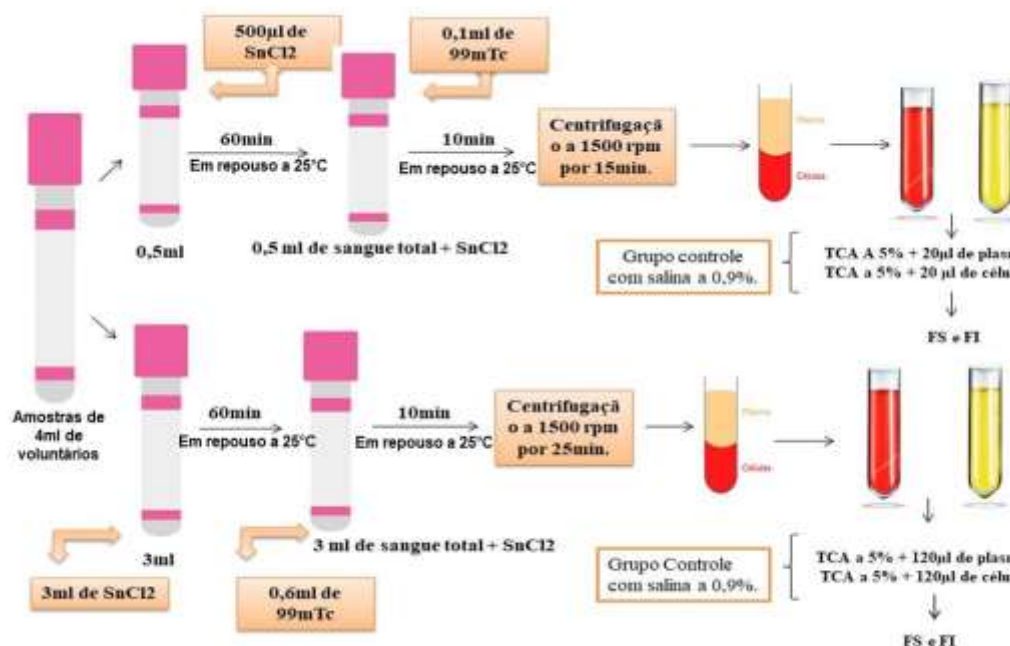
Uma vez medida o percentual da atividade, retirou-se alíquotas de 20 μl do plasma e de células (hemácias) das amostras de 0,5 ml. Estas, foram precipitadas com 1 ml de Ácido Tricloroacético (TCA) a 5% para obtenção das frações solúveis (FS) e insolúveis (FI) de ambos componentes sanguíneos.

Seguindo o mesmo protocolo, para as amostras de 3 ml foram utilizados 120 μl de TCA para o plasma e células. Como grupo controle, utilizou-se 1e 6 ml de solução salina para o volume de 0,5 e 3 ml, respectivamente. As alíquotas foram centrifugadas e em seguida, procedeu-se à contagem da radioatividade do precipitado em contador gama. A porcentagem de ligação às proteínas foi calculada de acordo com a equação 1 abaixo e a sequência da metodologia utilizada é mostrada na figura 9.

$$\% \text{ de Ligação às Proteínas} = \frac{\text{cpm precipitado}}{\text{cpm total}} \times 100 \quad (1)$$

Onde, CPM = Contagens Por Minuto / CPM total = sobrenadante

Figura 9 – Sequência de realização da metodologia utilizada para radiomarcagem das hemácias.



*FS = Fração Solúvel / FI = Fração Insolúvel

Fonte: a autora, 2020.

3.2.4 Estudo de estabilidade da biomolécula Hemácia-^{99m}Tc

Para o estudo da avaliação da estabilidade hemácia-^{99m}Tc, seguiu-se a metodologia adaptada do guia para realização de estudos de estabilidade (RESOLUÇÃO N° 01/2005, ANVISA). As modificações do protocolo original, registrado no guia citado acima, foram necessárias por se tratar de ensaios *in vitro* com amostras biológicas com tempo de vida útil reduzido quando são retiradas do sistema funcional original (corpo humano).

O ensaio consistiu na avaliação regular das características da biomolécula (célula-radionuclídeo) ressuspensa em NaCl 0,9% : medição do percentual de atividade, a cada 60 min em contador gama, durante 5 horas; inspeção visual da suspensão para certificação da ocorrência ou ausência de hemólise e, realização de cromatografia em camada delgada (CCD) com leitura em TLC-Scanner para controle de qualidade e separação do ^{99m}Tc livre e biomolécula.

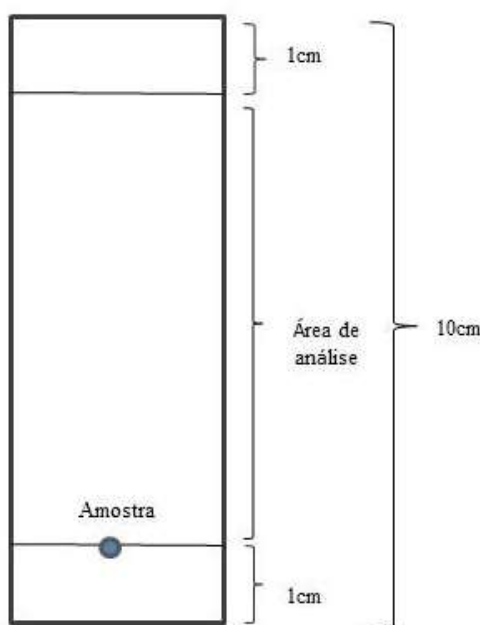
O teste foi realizado sob condições padronizadas de temperatura igual a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade igual a $68 \pm 2^\circ\text{C}$. No tempo zero (correspondente à primeira leitura), o percentual da atividade foi medido no HPGe e, na sequência, realizou-se a primeira corrida cromatográfica.

Para a realização da CCD, uma alíquota de 4 μ l da amostra foi aplicada no ponto de origem, a 1cm da base da fase estacionária, papel Waltman 3 de tamanho total 10 cm.

A área da aplicação foi seca com o auxílio de um jato de ar frio e em seguida, as placas foram acondicionadas em duas cubas específicas para corrida cromatográfica, uma contendo como fase móvel 1-2 ml de butanona, até que percorressem toda a área de análise. Posteriormente, as placas foram levadas para leitura com duração de 4 min no TLC-Scanner (LOVELESS, 2009; EP, 2010; USP, 2010). Para os tempos seguintes (2, 3, 4 e 5 h), procedeu-se com a repetição do protocolo acima. Na Figura 10 está ilustrado como foi realizada a aplicação da amostra para a corrida em CCD.

Assim como o ensaio de radiomarcção, os testes foram executados em triplicata/amostra. Após o decaimento radioativo de dez meia-vidas, o teste de esterilidade da biomolécula marcada foi executado, assim como detalhado no item 3.2.1.2, a fim de assegurar a ausência de microrganismos como fungos e/ou bactérias.

Figura 10 – Ilustração da aplicação da amostra em placa para CCD.



Fonte: a autora (2020).

3.2.5 Análise Estatística

Neste trabalho, todos os experimentos foram realizados em 3 repetições (triplicata). Assim, os mesmos foram calculados e expressos em termos de média aritmética e desvio padrão ($\pm$ DP). Para análise estatística e tratamento dos dados obtidos dos ensaios de radiomarcção (comparação das médias entre si do percentual de marcação e das médias das contagens por minuto das amostras de 0,5 ml e 3 ml), utilizou-se o software R[®] e o Teste T de Student, admitindo-se $p < 0,05$ como variação. Foi utilizado também, o software Excel 2010[®] para construção dos gráficos apresentados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção introduz os resultados obtidos pelo presente trabalho. De forma lógica, os resultados foram apresentados e discutidos seguindo-se a sequência dos ensaios realizados.

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE DO ELUATO: DETERMINAÇÃO DO PH E AVALIAÇÃO DA ESTERILIDADE

Os valores de pH medidos variaram de 6 a 7, estando de acordo com o preconizado. O ensaio de esterilidade mostrou ausência de turvação no meio, comprovando que não houve crescimento bacteriano ou fúngico nas replicatas amostrais estudadas. Dessa forma, as amostras se mantiveram isentas de contaminação ao longo dos 14 dias de incubação.

4.2 ISOLAMENTO E RADIOMARCAÇÃO DAS HEMÁCIAS COM O ^{99m}Tc

O estudo foi realizado em um total de 10 indivíduos ($n = 10$) com idade média de 29 anos (desvio padrão = 6 anos), com intervalo de 25 a 42 anos. Como resultado da implementação do protocolo de isolamento celular a partir do sangue periférico total, a metodologia para obtenção do isolado eritrocitário por meio do pré-tratamento com cloreto estanoso, seguido de centrifugação mostrou-se eficiente. A porcentagem da atividade total (atividade encontrada no plasma + atividade encontrada nas hemácias) e os valores das contagens por minuto (CPM) das amostras de 0,5 ml de um mesmo voluntário, em dias alternados, para o ensaio com hemácias radiomarcadas, estão demonstrados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Medidas em CPM e percentual de atividade para amostra de 0,5 ml da réplica do dia 1.

Amostra de 0,5ml – dia 1	Tempo de Leitura	Distância do Detector	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média	DP $\pm$
Hemácias	300seg	13cm	61675	39716,5	40803,7	47398	$1,2 \times 10^4$
Plasma	300seg	13cm	9866,41	4922,32	7175,62	7321,5	$0,24 \times 10^4$
% de atividade							
Hemácias			86,21%	88,97%	85,04%	86,62%	
Plasma			13,79%	11,03%	14,96%	13,38%	

Medidas das replicas em CPM/ % de atividade = percentual de atividade.

Fonte: a autora (2020).

Tabela 7 – Medidas em CPM e percentual de atividade para amostra de 0,5 ml da replica do dia 2.

Amostra de 0,5 ml – dia 2	Tempo de Leitura	Distância do Detector	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média	DP ±
Hemácias	300seg	13cm	178321	278925	233654	230300	5x10 ⁴
Plasma	300seg	13cm	31749	54986	53458	46731	1,2x10 ⁴
% de atividade							
Hemácias			84,89%	83,53%	81,38%	83,13%	
Plasma			15,11%	16,47%	18,62%	16,87%	

Medidas das replicas em CPM/ % de atividade = percentual de atividade.

Fonte: a autora (2020).

Nas tabelas 8 e 9 estão dispostos os valores das contagens por minuto e do percentual de atividade das triplicatas, obtidos no ensaio de marcação de hemácias para as amostras com volume de 3 ml de sangue de um mesmo doador em dias alternados.

Tabela 8 - Medidas em CPM e percentual de atividade para amostra de 3 ml replica do dia 1.

Amostra de 3 ml – dia 1	Tempo de Leitura	Distância do Detector	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média	DP ±
Hemácias	300seg	13cm	61067,5	95739	71469,1	76091,8667	1,7x10 ⁴
Plasma	300seg	13cm	24455,8	27273	23851,8	25193,53	0,1x10 ⁴
% de atividade							
Hemácias			71,40%	77,83%	74,98%	74,74%	
Plasma			28,60%	22,17%	25,02%	24,87%	

Medidas das replicas em CPM/ % de atividade = percentual de atividade.

Fonte: a autora (2020).

Tabela 9- Medidas em CPM e percentual de atividade para amostra de 3ml replica do dia 2.

Amostra de 3 ml – dia 2	Tempo de Leitura	Distância do Detector	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Média	DP ±
Hemácias	300seg	13cm	181372	132296	115865	143177,7	3,4x10 ⁴
Plasma	300seg	13cm	16089	5927	3782	8599,3	0,65x10 ⁴
% de atividade							
Hemácias			91,85%	95,71%	96,84%	94,33%	
Plasma			8,15%	4,29%	3,16%	5,67%	

Medidas das replicas em CPM/ % de atividade = percentual de atividade.

Fonte: a autora (2020).

De acordo com os resultados obtidos das análises em dias alternados com amostras coletadas de um mesmo doador, o método de radiomarcção de hemácias com o ^{99m}Tc se mostrou reproduzível. O teste estatístico T de Student, revelou o valor de $p = 0,9621$ para as análises entre os percentuais e $p = 0,5518$ para as comparações entre as contagens de atividade por minuto, comprovando assim que não há variação significativa entre as amostras testes.

O percentual de atividade encontrado para ambos os volumes, referente à eficiência de marcação, foi satisfatório e como esperado, o máximo percentual de atividade esteve nas amostras de 3 ml (94,33%). Como o limite de aceitação, segundo a EANM, deve ser superior a 50%, e para as amostras de 0,5 ml o menor percentual de eficiência de marcação foi de 83,13%, infere-se que, em termos de otimização metodológica, a marcação de hemácias na rotina clínica com este volume é viável.

Corroborando com os resultados apresentados, de acordo com o IPEN (2019), experimentalmente, a concentração máxima de até 5 ml de sangue periférico total marcado é suficiente para o radiodiagnóstico de pacientes com sangramento gastrointestinal, reafirmando que mesmo em amostras de menor volume – como utilizado neste trabalho - a marcação é eficiente e consideravelmente significativa.

É importante ressaltar, contudo, que testes envolvendo amostras biológicas estão sujeitas a variações, no que diz respeito à obtenção dos resultados. Dessa forma, condições clínicas não evidentes (como hematócrito baixo, distúrbios imunológicos e formação de anticorpos na superfície das hemácias), bem como o uso de certos tipos de medicamentos, como a ciclosporina, interferem negativamente no processo de marcação direta das células vermelhas do sangue. Sendo assim, o histórico clínico do paciente/voluntário é imprescindível para melhor compreensão e/ou esclarecimentos dos resultados obtidos durante o estudo (IAEA, 2015).

Por utilizar inicialmente o volume mínimo de sangue total de 0,5 ml, neste estudo optou-se em utilizar a concentração de SnCl_2 de 1,2 $\mu\text{g/ml}$, por ser, possivelmente, a menor concentração utilizada capaz de radiomarcar de forma eficiente as células, sem causar dano e estar de acordo com uso em estudos anteriores de marcação (OLIVEIRA, 2003; SILVA *et al.*, 2006; FRYDMAN, 2009).

4.3 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE LIGAÇÃO DO ^{99m}Tc ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS: PRECIPITAÇÃO COM TCA A 5%

O valor médio da porcentagem de ligação às frações solúveis e insolúveis presentes no concentrado de hemácias e na suspensão plasmática está disposta na tabela 10.

Tabela 10 – Determinação do % de ligação do radionuclídeo às frações solúveis e insolúveis das amostras analisadas.

Concentração de sangue (ml)	% de ligação nas hemácias	% de ligação no plasma
0,5	FI = 46 ± 11	FI = 49 ± 10
	FS = 51 ± 11	FS = 52 ± 10
3	FI = 59 ± 4	FI = 43 ± 3
	FS = 41 ± 4	FS = 58 ± 3

*FI = Fração Insolúvel / FS = Fração Solúvel

Fonte: a autora (2020),

Como pode ser observado, o percentual de ligação do radionuclídeo à FI presente nas hemácias se elevou expressivamente nas amostras com volume de 3 ml. Contudo, em simultâneo, pôde ser visualizado uma pequena elevação da captação do ^{99m}Tc na FS do plasma sanguíneo para as amostras de mesmo volume. Supõe-se que, com o aumento do volume amostral (células sanguíneas) houve também elevação na concentração protéica no plasma coletado a partir do sangue periférico total. Neste contexto, é preferível optar pelo volume de 0,5ml para radiomarcção *in vitro* das hemácias.

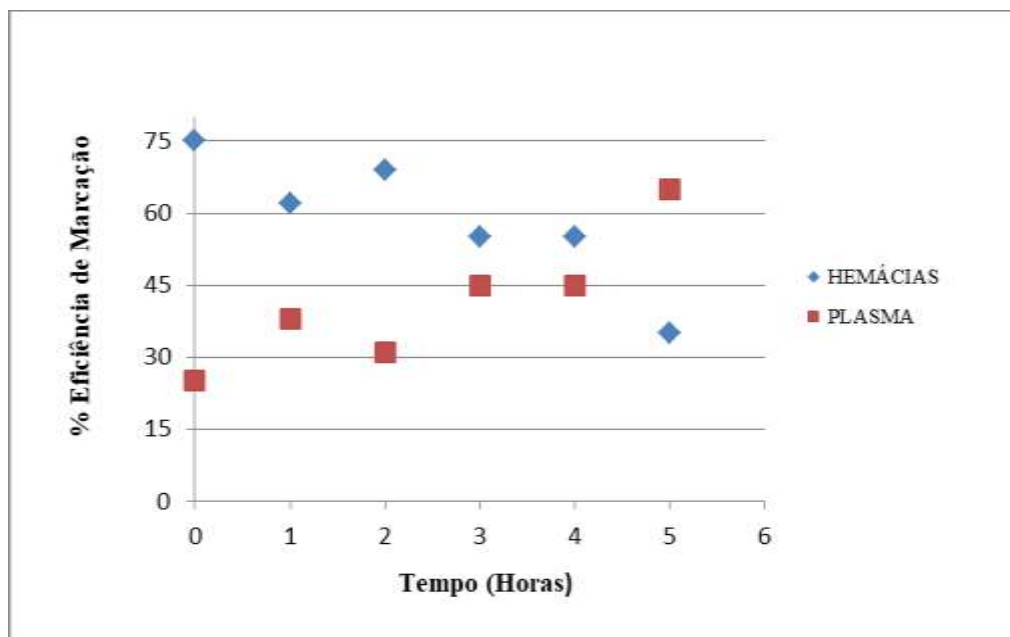
Assim como descrito por Oliveira (2003), um fato que explica a ligação do ^{99m}Tc às proteínas plasmáticas é a presença de proteínas responsáveis por executar o transporte de diversas substâncias (como fármacos e radiofármacos) pela corrente sanguínea, entre elas a de maior concentração é a albumina humana. Para que o transporte ocorra de forma eficiente, é necessária que seja estabelecida uma ligação química (reversível) entre a proteína e a substância a ser transportada. Dessa forma, o tempo de duração da ligação e a forma como ela acontece afeta indiscutivelmente a quantidade de radionuclídeo a ser associado às hemácias.

Sendo assim, é de suma importância o conhecimento acerca da capacidade de ligação/associação de qualquer radiofármaco à célula-alvo antes do seu uso, uma vez que, esta informação permitirá melhor compreensão acerca de sua biodistribuição e do possível retardamento da sua chegada até os locais sítio-específicos (MIRANDA, 2019).

4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA BIOMOLÉCULA HEMÁCIA-^{99m}Tc

Os resultados do estudo de estabilidade com as amostras de 0,5 ml estão dispostos na figura 11.

Figura 11- Estudo de estabilidade para o volume de 0,5ml.

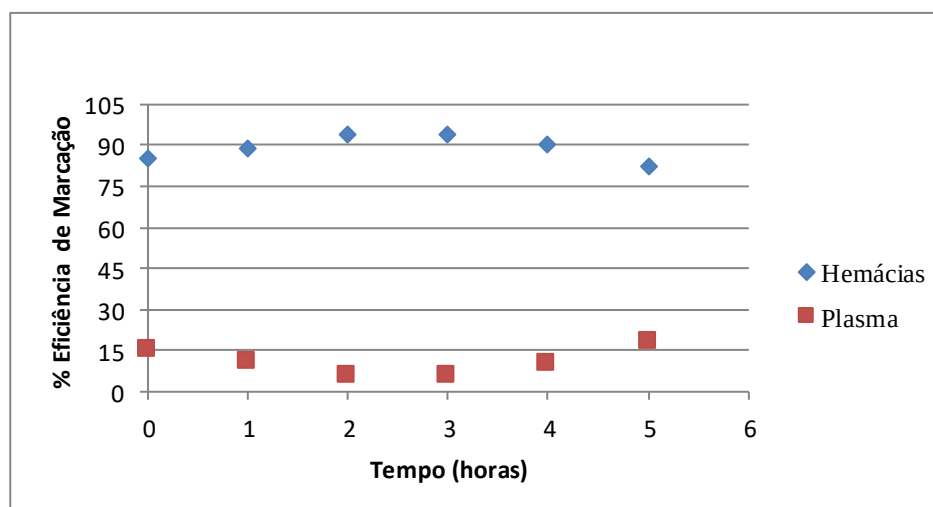


Fonte: a autora (2020).

Como pode ser observado, há diminuição gradativa das CPM no concentrado de hemácias e na captação no plasma sanguíneo. Em termos de percentual de eficiência de marcação (EM), as hemácias, apresentaram respectivamente 75, 62, 68, 55, 55 e 35% de captação do radionuclídeo durante as 5h do estudo. Sendo assim, a biomolécula radiomarcada - para o volume analisado - apresentou estabilidade de 4h.

Como mostrado na figura 12 abaixo, as contagens por minuto nas amostras de 3 ml diminuíram gradativamente, tanto para as hemácias quanto para o plasma. Contudo, em termos de percentual, a eficiência de marcação não apresentou redução expressiva, se mantendo em 94% nas cinco horas do estudo.

Figura 12 - Estudo de estabilidade para o volume de 3ml.



Fonte: a autora (2020).

Uma ressalva é válida para o valor do percentual de eficiência de marcação nas hemácias no tempo zero. Para este primeiro momento de medição, o valor obtido para o percentual de atividade do ^{99m}Tc ligado às hemácias é de 86%, isto é, minimamente abaixo da porcentagem das demais medições para este estudo, que foram de 94%. Supõem-se que, houve um equívoco de manipulação (pipetagem) ou durante o posicionamento da amostra no sistema detector do equipamento utilizado. Para as demais contagens, não foram observadas alterações.

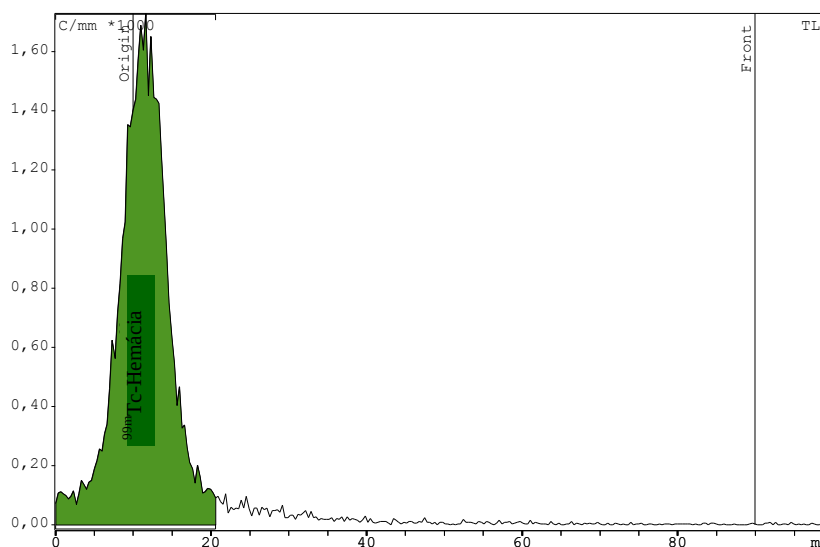
Um fato a ser mencionado especificamente para a estabilidade com amostras em concentração de 3 ml é a ocorrência de hemólise a partir da quinta hora de análise. De acordo com o IAEA (2015), este evento pode ser explicado pela competição ao longo do tempo do anticoagulante utilizado com os glóbulos vermelhos pelos íons estânicos presentes na suspensão, a exemplo da heparina de lítio e EDTA. Sendo assim, de acordo com o que foi observado neste trabalho, recomenda-se a utilização da suspensão Hemácia- ^{99m}Tc no período máximo de 5h após a radiomarkação.

Como estratégia para driblar a interferência dos anticoagulantes utilizados e alcançar maior eficiência de marcação em células vermelhas do sangue, Martiano *et al.* (2016) avaliou *in vitro* (com metodologia semelhante à utilizada neste trabalho) a influência da radiação ultravioleta em amostras sanguíneas coletadas com diferentes tipos de anticoagulantes e incubadas em um mesmo período de tempo. Como resultado, foi percebido que a heparina de lítio em conjunto com a radiação ultravioleta, induziram diretamente maior captação do ^{99m}Tc

pela cadeia beta das hemoglobinas (Hb) presentes nos eritrócitos, aumentando a interação radionuclídeo-célula.

Um exemplo do perfil de leitura da biomolécula (^{99m}Tc -Célula) no cromatograma para controle de qualidade (CQ) obtido por TLC das amostras analisadas durante as 5h no estudo de estabilidade pode ser visto na Figura 13.

Figura 13- Cromatograma para CQ das amostras de 0,5 e 3ml em butanona.



Fonte: a autora (2020).

Nele, a biomolécula radiomarcada aparece em todas as leituras no início da placa ($R_f = 0$), devido à densidade e tamanho da amostra. Em contrapartida, foi observado que o eluato, isto é, o tecnécio livre percorre todo o papel, apresentando $R_f = 0,8$. Reafirmando o que foi encontrado, Descristofaro et al. (2007) descreve que em corridas cromatográficas onde se utiliza solventes polares como fase móvel, a exemplo butanona, o R_f do tecnécio livre pode variar estreitamente entre 0,8 a 1,0.

Corroborando, Auletta e colaboradores (2019), ao realizar o controle de qualidade *in vitro* de células sanguíneas autólogas radiomarcadas com o ^{99m}Tc observaram que, ao diferenciar a fase móvel da corrida cromatográfica, o R_f da biomolécula marcada não se altera, permanecendo retida na origem onde é aplicada em conjunto com o ^{99m}Tc -hidrolisado e o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ percorre livremente toda a extensão da placa.

Finalmente, na avaliação do controle de qualidade da biomolécula marcada, ao teste de esterilidade em meio de cultura líquido apresentou resultados negativos para o crescimento microbiano, não ocorrendo viragem (turbvação) do meio.

5 CONCLUSÃO

- Os testes de pH e esterilidade asseguraram a utilização do radionuclídeo no processo de radiomarcção das hemácias com o tecnécio.
- Foi implementado o protocolo para isolamento para radiomarcção de hemácias, a partir do sangue periférico total.
- O método de radiomarcção de hemácias com o ^{99m}Tc se mostrou reprodutível, com percentual de eficiência de marcação $\geq 74\%$ para os dois volumes de sangue utilizados, sendo maior no volume de 3 ml (94%).
- A precipitação com TCA no período de incubação de 60 min mostrou captação do radionuclídeo mais expressiva nas amostras do plasma.
- O estudo de estabilidade de 5 h em salina da biomolécula radiomarcada foi realizado conforme o protocolo de estabilidade proposto e cumpriu todos os requisitos preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária N° 01/2005. Assim, as amostras de 0,5 e 3 ml apresentaram estabilidade de 4 e 5 h, respectivamente.
- O teste de esterilidade assegurou que as hemácias marcadas com ^{99m}Tc se mantiveram isentas de contaminação bacteriana durante os 14 dias de incubação em estufa.
- Para melhor compreensão da dinâmica das células radiomarcadas com o ^{99m}Tc seguindo a metodologia apresentada neste trabalho, é fundamental que sejam realizados estudos pré-clínicos *in vivo* em modelos animais.

6 PERSPECTIVAS

- Realizar estudos *in vivo* com as hemácias radiomarcadas em camundongos.
- Radiomarcas *in vitro* leucócitos mononucleares (*PBMC*) e neutrófilos com ^{99m}Tc e, posteriormente, realizar estudos *in vivo* em modelos murínicos, com inflamação e infecção experimentalmente induzidas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I *et al.* Preparation and radiochemical controlo f 99mTc labelled blood pool agent for in vivo labelling of the red blood cells. **Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research**. v. 71, n. 2, p. 245-248. 2014.
- ANDERSON, J. L.; MORROW, D. A. Acute Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**. v. 376, n. 21, p. 2053–2064. 2017. doi:10.1056/nejmra1606915.
- AOKI, T. et al. Initial management for acute lower gastrointestinal bleeding. **World. J. Gastroenterol**. v.7, n. 25(1), p. 69-84. 2019.
- ARAÚJO, E. B. A utilização do elemento tecnécio-99m no diagnóstico de patologias e disfunções dos seres vivos. **Cad. Tem. De Quim**. Nov. nº 6 – julho. 2008.
- AULETTA, S. et al. Comparison of 99mTc-UBI 29-41, 99mTc-ciprofloxacin, 99mTc-ciprofloxacin dithiocarbamate and 111In-biotin for targeting experimental Staphylococcus aureus and Escherichia coli foreign-body infections: *an ex-vivo study*. **The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging**: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR). v.63. n. 1. p. 37-47. 2019.
- AULETTA, S. et al. Labelling and Clinical Performance of Human Leukocytes Labelled with 99mTc-HMPAO Using Leukokit® with Gelofusine versus Leukokit® with HES as Sedimentation Agent. **Contrast Media & Molecular Imaging**. p.1–8. 2019. doi:10.1155/2019/4368342.
- AYDIN, S.; UGUR, K.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; YARDIM, M. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. **Vascular Health and Risk Management**, v. 15, p. 1-10. 2019.
- BAI. B.; BADING, J.; CONTI, P.S. Tumor quantification in clinical positron emission tomography. **Theranostics**. v.3, p. 787–801, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7150/thno.5629>.
- BATISTA, C. A.; JOAQUIM, A.I.; FERRARI, R. J. R. Valor adicional da fluordesoxiglicose marcada com flúor-18 na avaliação de viabilidade miocárdica. **Arq. Ciênc. Saúde**. v. 24, n. 2, p. 03-05, 2017.
- BAUMEISTER, J. E.; REINIG, K. M.; BARNES, C. L.; KELLEY, S. P.; JURISSON, S. S. Technetium and Rhenium Schiff Base Compounds for Nuclear Medicine: Syntheses of Rhenium Analogues to 99mTc-Furifosmin. **Inorganic Chemistry**. 2018. doi:10.1021/acs.inorgchem.8b02156.
- BÉ, M. M.; CHISTÉ, V.; DULIEU, C.; BROWNE, E.; CHECHEV, V.; KUZMENK, N.; HELMER, R.; NICHOLS, A.; SCHONFELD, E.; DERSCH, R. Table of Radionuclides, Monographie BIPM-5; Vol. 1-A=1 to 150; Bureau International des Poids et Mesures: Sèvres, France, 2004.

BEADSMOORE, C.; NEWMAN, D.; MACIVER, D.; PAWAROO, D. Positron Emission Tomography Computed Tomography: A Guide for the General Radiologist. **Canadian Association of Radiologists Journal**. p. 1-16, 2015.

BENALI, K. et al. Preclinical Validation of ^{99m}Tc -Annexin A5-128 in Experimental Autoimmune Myocarditis and Infective Endocarditis: Comparison with ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin A5. *Molecular Imaging*, v. 14, n. 1, 7290.2014.00049. 2015. doi:10.2310/7290.2014.00049.

BHURE U, ROOS, J.E.; PÉREZ, Lago MdS.; STEURER, I.; GRUNIG, H.; HUG, U.; et al. SPECT/CT. *Arthrography*. **Br J Radiol**. 91: 20170635. 2018.

BOSMAN, G. J. C. G. M. Disturbed Red Blood Cell Structure and Function: An Exploration of the Role of Red Blood Cells in Neurodegeneration. *Frontiers in Medicine*, 5. 2018. doi:10.3389/fmed.2018.00198.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RE nº 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. 37, de 06 de julho de 2009. Dispõe sobre Admissibilidade das Farmacopeias Estrangeiras. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 de julho de 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução RDC nº. 64, de 18 de dezembro de 2009. Dispõe sobre Registro de Radiofármacos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 dez. 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informações de Saúde (TABNET) - Estatísticas Vitais. Departamento de Informática a Serviço do SUS. 2019. [Cited in: 2019 september 18] Available from: <http://datasus.saude.gov.br/>

BUCK, A. K., NEKOLLA, S.; ZIEGLER, S.; BEER, A.; KRAUSE, B. J.; HERMANN, K.; SCHEIDHAUER, K.; WESTER, H. J.; RUMMENY, E. J.; SCHWAIGER, M.; DRZEZGA, A. SPECT/CT. **J. Nucl. Med.** v.49. p.1305–1319. 2008. DOI: 10.2967/jnumed.107.050195.

CALLAHAN, R. J. Radiolabeled Red Blood Cells: Method and Mechanisms. The University of New Tennessee Health Science Center. New México. 2006.

CALLAHAN, R. J., RABITO C. A. Radiolabeling of erythrocytes with technetium-99m: role of band-3 protein in the transport of pertechnetate across the cell membrane. *J Nucl Med*. v. 31, n.12, p.2004-10. 1990.

CAPOGNI, M.; PIETROPAOLO, A.; QUINTIERI, L.; ANGELONE, M.; BOSCHI, A.; CAPONE, M.; PIZZUTO, A. 14 MeV Neutrons for $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ Production: Experiments, Simulations and Perspectives. **Molecules**. v. 23, n. 8, 1872. 2018. doi:10.3390/molecules23081872.

CARVALHO, E. B. “Revisão dos principais radiofármacos utilizados no Brasil e suas aplicações na detecção e terapia de patologias”. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2014.

CHAPMAN, A. R; ADAMSON, P.D.; MILLS, N.L. Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice. **Heart**. 103:10–18. 2017.

CHEN, Y.; TAO, Y.; ZHANG, L.; XU, W.; ZHOU, X. Diagnostic and prognostic value of biomarkers in acute myocardial infarction. **Postgraduate Medical Journal**. 2019–136409. 2019. doi:10.1136/postgradmedj-2019-136409.

CHERRY, S. R.; SORENSON, J. A.; PHELPS, M. E. Physics in nuclear medicine. **Elsevier Health Sciences**, 2012. ISBN 1455733679.

CHOI, J.W.; BUDZEVICH, M.; WANG, S.; GAGE, K.; ESTRELLA, V.; GILLIES, R. J. In vivo positron emission tomographic blood pool imaging in an immunodeficient mouse model using 18Ffluorodeoxyglucose labeled human erythrocytes. **PLoS ONE**. 14(1). 2019.

CHROUSTOVÁ, D.; EL-LABABIDI, N.; TRNKA, J.; CERNA, L.; LAMBERT, L. Scintigraphy with 99Tc-HMPAO labeled leukocytes is still an accurate and convenient tool to rule out suspected inflammatory bowel disease in children. **Nucl Med Rev Cent East Eur**. 22 (2). 69-73. 2019. doi: 10.5603/NMR.2019.0017.

COATES, C. J.; DECKER, H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 74(2), 293–317. 2016. doi:10.1007/s00018-016-2326-7.

COSTA, B.; ILEM-ÖZDEMİR, D.; SANTOS-OLIVEIRA, R. Technetium-99m metastable radiochemistry for pharmaceutical applications: old chemistry for new products. *Journal of Coordination Chemistry*, 1–26. 2019. doi:10.1080/00958972.2019.1632838.

CRANE, H. M.; PARAMSOTHY, P.; DROZD, DR. et al. Types of Myocardial Infarction Among Human Immunodeficiency Virus–Infected Individuals in the United States. **JAMA Cardiol**. 2(3):260–267. 2017. doi:10.1001/jamacardio.2016.5139.

CZERNIN, J.; ALLEN-AUERBACH, M.; SCHELBERT, H. Improvements in cancer staging with PET/CT: literature-based evidence as of September. **J. Nucl. Med**. v.48, (Suppl 1), p. 78S–88S, 2006.

DAM, H. Q. *et al*. The SNMMI Procedure Standard/EANM Practice Guideline for Gastrointestinal Bleeding Scintigraphy 2.0. *Journal Of Nuclear Medicine Technology*. v. 42. n.4. 2014.

DAS, S.; SAKHARE, N.; MATHUR, A.; MALLIA, M. B.; MIRAPURKAR, S.; SHEELA, M.; DASH, A. *et al*. Synthesis and evaluation of 99mTc-analogues of [123/131I]mIBG prepared via [99mTc][Tc(CO)3(H2O)3]+ synthon for targeting norepinephrine transporter. **Nuclear Medicine and Biology**. 2019. doi:10.1016/j.nucmedbio.2019.01.001.

DE ANDRADE, W.G. Avaliação da qualidade de radiofármacos em serviços de medicina nuclear de estados da região nordeste. Dissertação submetida para obtenção do título de

Mestre ao Programa de PósGraduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco. Recife-Pernambuco. 2012.

DECRISTOFORO, C. et al. Quality control methods of ^{99m}Tc pharmaceuticals. In: **Technetium-99m Pharmaceuticals**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 123-150. 2007.
DIAS, L. A. P. Dissertação (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2015.

DODD, B.; DOLAN, T. J.; LARAIA, M.; RITCHIE, I. Perspectives on research reactor utilization. *Physica B*. 311. 50–5. 2002.

ERBA, P. A. et al. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 2014; 41: 615–23.

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES, European Pharmacopoeia. 5th Edition, EDQM, Council of Europe, Strasbourg, France. 2005.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, European Pharmacopoeia. ICH Topic Q3C. Impurities: Guideline for Residual Solvents. London, 2009.

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

FARRAR, F. C. Management of Acute Gastrointestinal Bleed. *Critical Care Nursing Clinics of North America*. v. 30, n.1, p.55–66. 2018. doi:10.1016/j.cnc.2017.10.005.

FLÔR, R. C.; GELBCKE, F. L. Tecnologias emissoras de radiação ionizante e a necessidade de educação permanente para uma prática segura da enfermagem radiológica. **Rev. Bras. De Enf.** v. 62, n. 5, p. 766-770, 2009.

FOCOSI, D.; AMABILE, G.; Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Red Blood Cells and Platelet Concentrates: From Bench to Bedside. *Cells*. 7, 2. 2018.

FOLLACCHIO, G. A. et al. In Vivo Microbial Targeting of ^{99m}Tc -Labeled Human β -Defensin-3 in a Rat Model of Infection. *Clinical Nuclear Medicine*, 44(11), e602–e606. 2019. doi:10.1097/rln.0000000000002713.

FONTI, R. et al. *PET/CT* in radiation oncology. *Seminars in Oncology*. 2019. doi:10.1053/j.seminoncol. 2019.07.001

FREITAS, R. S. et al. Estudo in vivo e in vitro da ligação do radiofármaco ^{99m}Tc -DMSA aos elementos sanguíneos. INDEX. INAC. 2002.

FRYDMAN, J. N. G Efeitos de um extrato aquoso de porangaba (*Cordia salicifolia*) na marcação de constituintes sanguíneos com tecnécio- 99m na morfologia de hemácias. Dissertação submetida para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2009.

GAIANI, F. et al. Clinical approach to the patient with acute gastrointestinal bleeding. **Acta Biomed**. v. 89, supplement 8, p. 12-19. 2018. DOI: 10.23750/abm.v89i8-S.7861.

GIL, N. M.; ALMARAZI, V. E. B.; OLIVÉ, K. I. Evaluation of TiO₂ nanomaterials as potential sorbents for ⁹⁹Mo/^{99m}Tc generator. AIP Conf. Proc. 2019. doi:10.1063/1.5095900.

HEXAMETILPROPILENO AMINO OXIMA: HMPAO. Guilherme Oliveira Petersen. PORTO ALEGRE, 2016. Bula HMPAO.

HICKS, R. J., & HOFMAN, M. S. Is there still a role for SPECT-CT in oncology in the PET-CT era? **Nature Reviews Clinical Oncology**. v.9(12), 712–720. 2012. doi:10.1038/nrclinonc.2012.188.

HILGEMBERG, E. C.; ROESSLER, A. C. B. A.D.; SANTOS, L. T. M.; DAMAS, A. S.; MESQUITA, C. T. Viabilidade Miocárdica em um Paciente com Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Soc. Bras. Cardiol: Imagem cardiovascular**. 31 (3). p. 215-217. 2018.

HOU, X.; TANGUAY, J.; VUCKOYI, M.; BUCKLEY, K.; SCHAFFER, P.; BÉNARD, F.; RUTH, T. J.; CELLER, A. Imaging study of using radiopharmaceuticals labeled with cyclotron-produced ^{99m}Tc. **Phys. Med. Biol.** 61 8199–213. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2018.06.007>

HUELLNER, M. W.; STROBEL, K. Clinical applications of SPECT/CT in imaging the extremities. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. v. 41 (Suppl. 1): S50–8. 2014. doi: <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2533-5>.

IAEA. Iaea Human Health Series: Radiolabelled Autologous Cells: Methods and Standardization for Clinical Use. Vienna. n. 5, 2015.

IAEA. Safety Standards Series, ISSN 1020–525X ; no. NS-R-5/STI/PUB/1336 ISBN 978–92–0–105108–0.2008.

IAEA. Safety Standards Series, ISSN 1020–525X no. NS-R-5/STI/PUB/1336 ISBN 978–92–0–105108–0.2008.

IPEN. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. “Produção e Desenvolvimento de novos radiofármacos marcados com Flúor 18 para o diagnóstico de câncer”. 2017.

IPEN. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Bula – Gerador IPEN-TEC- Gerador de ⁹⁹Mo-^{99m}Tc- pertecnetado de sódio (^{99m}Tc). Centro de Radiofarmácia. REV. 001, 2015.

IPEN. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Bula – Gerador IPEN-TEC- Gerador de ⁹⁹Mo-^{99m}Tc- pertecnetado de sódio (^{99m}Tc). Centro de Radiofarmácia. REV. 001, 2015.

IPEN. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Bula – PIRO-TEC® 10 mg - ^{99m}Tc- pertecnetado de sódio (^{99m}Tc). Centro de Radiofarmácia. REV. 003, 2019.

JAHANGIRIAN, H.; HASEMIANG, L. E.; WEBSTER, T. J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R., & ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*. v. 12, 2957–2978. 2017. doi:10.2147/ijn.s127683.

JIMÉNEZ-BONILLA, J. F.; BANZO, I. Non-oncological applications of PET/CT – Aplicaciones no oncológicas de La PET/C. **Med. Clin. (Barc)**. v. 150, n. 10, p. 387-389, 2018.

KAMBOJ, A. K. et al. Upper Gastrointestinal Bleeding: Etiologies and Management. *Mayo Clin Proc.* v.94, n. (4), p. 697-703. 2019.

KHALIL, M. M. Elements of Gamma Camera and SPECT Systems. **Basic Sciences of Nuclear Medicine**. p.155–178. 2010. doi:10.1007/978-3-540-85962-8_10.

KIM, B. S. M. et al. Diagnosis of gastrointestinal bleeding: A practical guide for clinicians. *World J Gastrointest Pathophysiol.* v.5, n.4, p. 467-478. 2014.

KRIJGER, G. C.; PONSARD, B.; HARFENSTELLER, M.; WOLTERBEEK, H. T.; NIJSEN, J.W.F. The necessity of nuclear reactors for targeted radionuclide therapies *Trends Biotechnol.* 31. 390–6. 2013.

KUBA, S. Instrumentação em Medicina Nuclear. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu. 2008.

LANGOWISKI, A. R. Guia Do Infarto Agudo do Miocárdio. Secretária de Saúde. Paraná. 2017.

LE, V. S. Tc Generator Development: Up-to-Date Tc Recovery Technologies for Increasing the Effectiveness of Mo Utilisation. **Science and Technology of Nuclear Installations**. 1–41. 2014. doi:10.1155/2014/345252.

LIU, M.; ZHAO, Z.; FANG, W.; LIU, S. A Novel Approach for ^{99m}Tc-Labeling of Red Blood Cells: Evaluation of ^{99m}Tc-4SAboroxime as a Blood Pool Imaging Agent. **Bioconjugate Chem.** DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00601. 2017.

LIVIERATOS, L. Basic Principles of SPECT and PET Imaging. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. p.345–359. 2012. doi:10.1007/978-3-642-02400-9_12.

LJUNGBERG, M.; PRETORIUS, P. H. SPECT/CT: an update on technological developments and clinical applications. **Br J Radiol.** v. 90: 20160402. 2018.

LOVELSS, V. S. Quality Control of Compounded Radiopharmaceuticals. The University of New Tennessee Health Science Center. New México. 2009.

LUIZ, L. C.; MONTEIRO, K. T. S.; BATISTA, R. T. Os aceleradores de partículas e sua utilização na produção de radiofármacos. **Rev. Bras. Farm.** v. 92, n. 3, p. 90-95, 2011.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-^{99m} e seus controles de qualidade. *Radiol Bras.* 34(4):233–239. 2001.

MARTIANO, C. R. Q. et al. Non-Ionizing Radiation Effect on The Markup of Blood Cells With ^{99m}Tc In Vitro. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. v.6(03). 2016.

MARTINEZ, P. F.; OLIVEIRA-JUNIOR, S. A.; POLEGATO, B. F.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M. P. Biomarkers in Acute Myocardial Infarction Diagnosis and Prognosis. *Arq Bras Cardiol*. 113(1):40-41. 2019.

MARTINI, P. et al. A solvent-extraction module for cyclotron production of high-purity technetium-99m. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 118, p. 302–307. 2016. doi:10.1016/j.apradiso.2016.10.002.

MEYER, P. F. Investigação sobre possíveis efeitos biológicos in vitro de agentes físicos utilizados em fisioterapia. Dissertação para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2008.

MIRANDA, A. C. C. et al. Current Approach in Radiochemical Quality Control of the ^{99m}Tc -Radiopharmaceuticals: a mini-review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol.62. e19180545. 2019.

MOHAN, H. K.; STROBEL, K.; BRUGGEN, W.; GNANASEGARAN, G.; KAMPEN, W. U.; KUWERT, T.; WYNGAERT, V.; PAYCHA, F. The role of hybrid bone SPECT/CT imaging in the work-up of the limping patient: a symptom-based and joint-oriented review. **European Journal of Hybrid Imaging**. 2:8. 2018. DOI 10.1186/s41824-018-0026-2.

MONTEMAGNO, D. *et al.* In Vivo Assessment of VCAM-1 Expression by SPECT/CT Imaging in Mice Models of Human Triple Negative Breast Cancer. *Cancers*. v.11(7), 1039. 2019. doi:10.3390/cancers11071039.

MYTHILI, S.; MALATHI, N. Diagnostic markers of acute myocardial infarction (Review). **Biomedical Reports**. 3: 743-748. 2015.

NABLE, J. V.; GRAHAM, A. Gastrointestinal Bleeding. **Emerg Med Clin**. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2015.12.001>.

OHMIYA, N. et al. Obscure gastrointestinal bleeding: Diagnosis and treatment. *Digestive Endoscopy*. v.27, p. 285–294. 2015.

OKUNO, E. YOSHIMURA, E. Física das Radiações. 2º Ed. Oficina Textos: 2010.

OKUNO, E; CALDAS, I. L; CHOW, C. Física para ciências biológicas e biomedicina. São Paulo. p. 41-55, 1986.

OLIVEIRA, A. R. J. Estudo da interação do extrato de *Salix alba* (Salgueiro-Branco) na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc e na biodistribuição em ratos Wistar. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, pelo Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2003.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 42, n. 2, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Geneva. 2015.

PAHO. RELATÓRIO PAHO SOBRE SAÚDE NAS AMÉRICAS, **Panorama regional e perfis de países**, 2012. Disponível em [HTTP://www.paho.org/saudenasamericas](http://www.paho.org/saudenasamericas).

PAI, A.K.; FOX, V. L. Gastrointestinal Bleeding and Management. *Pediatr. Clin. N. Am.* v.64, p. 543–561. 2017.

PAPAGIANNOPOULOU, D. Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 60(11), 502–520. 2017. doi:10.1002/jlcr.3531.

PARGHANE, R. V.; BASU, S. PET/Computed Tomography and PET/MR Imaging: Basic Principles, Methodology and Imaging Musculoskeletal Applications. **Pet. Clin.** v. 13, p. 459-476, 2018.

Ph. Int. The International Pharmacopoeia. Radiopharmaceuticals. Ninth Edition. 2019.
PIEGAS, L. S.; TIMERMAN, A.; FEITOSA, G. S.; NICOLAU, J. C.; MATTOS, L. A. P.; ANDRADE, M.D.; AVEZUM, A.; FELDMAN, A.; DE CARVALHO, A. C. C.; SOUZA A. C. S. *et al.* V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. **Arq Bras Cardiol.** 105(2):1-105. 2015.

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

PORTILHO, F. L. Uso de sílica mesoporosa com núcleo magnético decorada com anticorpo monoclonal (trastuzumabe) e radiomarcada com tecnécio 99 metaestável em modelo intratumoral de imageamento. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Ciência e Tecnologia Nucleares do Instituto de Engenharia Nuclear. Rio de Janeiro. 2019.

RABILOTTA, C. C. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Rev. Panam. Salud. Publica.** v.20, n. 2/3, p. 134–42, 2006.

REED, G. W.; ROSSI, J. E.; CANNON, C. P. Acute myocardial infarction. *The Lancet*, 389(10065), 197–210. 2017. doi:10.1016/s0140-6736(16)30677-8.

REHANI, M.; SHARMA, S. K. Site of ^{99m}Tc binding to the red blood cell: concise communication. **J. Nucl. Med.** v.21, p.676-678. 1980.

RITTS, P.; Sanders, J.; Kuwert, T. SPECT/CT technology. **Clin. Transl. Imaging.** v.2. p. 445–457. 2014. DOI 10.1007/s40336-014-0086-7.

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

SANTOS-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. História da radiofarmácia e as implicações da Emenda Constitucional N. 49. **Rev. Bras. de Cien. Farm. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 44, n. 3, jul./set., 2008.

SELIVANOVA, S. V.; LAVALLEE, E.; SENTA, H.; CAOUETTE, L.; SADER, J. A.; VAN LIER, E. J.; LECOMTE, R. *et al.* Radioisotopic Purity of Sodium Pertechnetate ^{99m}Tc Produced with a Medium-Energy Cyclotron: Implications for Internal Radiation Dose, Image Quality, and Release Specifications. **Journal of Nuclear Medicine**. 56(10), 1600–1608. 2015. doi:10.2967/jnumed.115.156398.

SENGOZ, T. *et al.* Aportación clínica de la SPECT/TC en la gammagrafía con leucocitos marcados con ^{99m}Tc -HMPAO en infección de prótesis de cadera y rodilla The clinical contribution of SPECT/CT with ^{99m}Tc -HMPAO-labeled leukocyte scintigraphy in hip and knee prosthetic infections. *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular (English Edition)*, Volume 38, Issue 4, July–August 2019, Pages 212-217.

SHAH, A. R.; JALA, V.; ARSHAD, H.; BILAL, M. Evaluation and management of lower gastrointestinal bleeding. **Disease-a-Month**. v.64, n.(7), p. 321–332. 2018. doi:10.1016/j.disamonth.2018.02.002.

SHAH, S. Q., & Alam, M. Synthesis of ^{99m}Tc -Rifabutin: A Potential Tuberculosis Radiodiagnostic Agent. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 17(3). 2017. doi:10.2174/1871526517666170606114650.

SHAMSI, M.; ZOLBANIN, J. M.; MAHMOUDIAN, B.; ZOLBANIN, N. M.; MALEKI, L. A.; JAFARABADI, M. A.; ISLAMIAN, J. P. A study on drug delivery tracing with radiolabeled mesoporous hydroxypatite nanoparticles conjugated with 2DG/DOX for breast tumor cells. *Nuclear Medicine Review*. 21, 1: 32–36. 2018. DOI: 10.5603/NMR.a2018.0008.

SIERVULIL, M. T. F.; SILVA, A. S.; SILVA, A.C.; MUZZI, R. A. L.; SANTOS, G. A. B. Infarto do Miocárdio: Alterações Morfológicas e Breve Abordagem da Influência do Exercício Físico. **Rev Bras Cardiol**. 27(5):349-355. 2014.

SILVA, A. F.; BOLOGNESI, L. PET com FDG-18F: Administração da dose e preparo do paciente. **Tekhne e Logos**. Botucatu- São Paulo, v.8, n.1, 2018.

SILVA, I. M. *et al.* MECANISMO DE AÇÃO E EFEITO DE UM DERIVADO TIAZOLIDINÔNICO NA RADIOMARCAÇÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS COM TC-99M. *Química Orgânica*. 2006.

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.

SMANIO, P. E. *et al.* Myocardial scintigraphy in the evaluation of cardiac events in patients without typical symptoms. **Arq Bras Cardiol**. v.105, n.2, p.112-122. 2016. doi:10.5935/abc.20150074.

SMANIO, P. SCHMIDT, A. Métodos de avaliação da perfusão miocárdica. **Rev. Soc. Cardiol.** São Paulo. 27 (2) : p. 150–62. 2017.

SOARES, J. S.; FONSECA, R. P.; CERCI, J. J.; BUCHPIGUEL, C. A.; CUNHA, M. L.; MAMED, M.; ALMEIDA, S. A. Lista de Recomendações do Exame PET/CT com 18F-FDG em Oncologia. Consenso entre a Sociedade Brasileira de Cancerologia e a Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular. **Radiol. Bras.** v.43, n. 4, p. 255–259, 2010.

SOARES, JC. Principios de Física em Radiodiagnóstico. Colégio Brasileiro de Radiologia. São Paulo. p. 12-17, 2002.

STOTHERS, L. A.; HOU, X.; VUCKOVIC, M.; BUCKLEY, K. R.; BÉNARD, F.; SCHAFFER, P.; CELLER, A. Analysis of radioactive waste generated during the cyclotron production of 99mTc. *Physics in Medicine and Biology*. 2019. doi:10.1088/1361-6560/ab00bc.

TABIBIAN, J. H. et al. Technetium-labeled erythrocyte scintigraphy in acute gastrointestinal bleeding. *International Journal of Colorectal Disease*. v.28, n.(8), p. 1099–1105. 2013. doi:10.1007/s00384-013-1658-0.

TAUHATA, L.; SALAT, I.; PRINZIO, R. D.; PRINZIO, A R. D. **RADIOPROTEÇÃO E DOSIMETRIA: FUNDAMENTOS**. Instituto de Radioproteção e Dosimetria. COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. Rio de Janeiro. 10º ED. – Revisão, 2014.

TEJERÍA, E.; GIGLIO, J.; FERNÁNDEZ, L.; REY, A. Development and evaluation of a 99mTc(V)-nitrido complex derived from estradiol for breast cancer imaging. **Applied Radiation and Isotopes**. 154, 108854. 2019. doi:10.1016/j.apradiso.2019.108854.

TURNER, J. E. Atoms, radiation and radiation protection. 3º ed. Weinheim: Wiley, 2007. UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION - USP. 33th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

TRENCSENYI, G. et al. Hibrid képkotás: klinikai evidenciák, lehetőségek. *Orvosi Hetilap*, v.156, n.52, p. 2110–2115. 2015. doi:10.1556/650.2015.30324.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. United States Pharmacopeia (USP) 25–29, USP Convention, Rockville, MD (2002–2006).

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. United States Pharmacopeia, The National Formulary 2012: USP - 35 NF 30. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, 2012.

UZUNOV, N. M.; MELENDEZ-ALAFORT, L.; BELLO, M.; CICORIA, G.; ZAGNI, F.; De NARDO, L.; ESPOSITO, J. *et al.* Radioisotopic purity and imaging properties of cyclotron-produced 99mTc using direct 100Mo(p,2n) reaction. **Physics in Medicine & Biology**. 63(18). 185021. 2018. doi:10.1088/1361-6560/aadc88.

VALLABHAJOSULA, S. Radiopharmaceuticals in oncology. In: KHALKHALI, I.; MAUBLANT, J.C.; GOLDSMITH, S.J., (Eds.). **Nuclear oncology** – diagnosis and therapy. Philadelphia: Lippincott Williams and Williams. p. 31-59, 2001.

VAN AUDENHAEGE, K.; VAN HOLEN, R.; VANDENBERGHE, S.; VANHOVE, C.; METZLER, S. D., & MOORE, S. C. Review of SPECT collimator selection, optimization, and fabrication for clinical and preclinical imaging. *Medical Physics*. v.42(8). p. 4796–4813. 2015. doi:10.1118/1.4927061.

VRIES, E. F.J.; ROCA, M.; JAMAR, F. Guidelines for the labelling of leucocytes with ^{99m}Tc-HMPAO. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. v. 37, p. 842–848. 2010. DOI 10.1007/s00259-010-1394-4.

WERNICK, M. N.; AARSVOLD, J. N. *Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT*. Elsevier, 2004.

WHITEHURST, B. D. Lower Gastrointestinal Bleeding. *Surg. Clin. N. Am.* - (2018).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Monograph for Technetium (^{99m}Tc) pentetate complex injection (Technetii (^{99m}Tc) pentetatis multiplex injectio). September. Geneva. 2017.

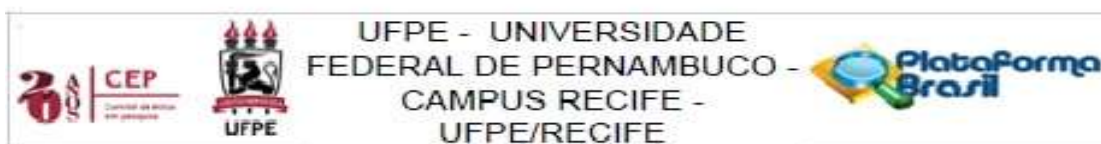
WORTMAN, J. R. et al. CT angiography for acute gastrointestinal bleeding: what the radiologist needs to know. *Br. J. Radiol.* v.90. 20170076. 2017.

XAVIER, A. M.; LIMA, A. G.; VIGNA, C. R. M.; VERBI, F. M.; BORTOLETO, G. G.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H.; BUENO, M. I. M. S. Marcos da história da radioatividade e tendências atuais. **Quim. Nova**. v. 30, n. 1, p. 83-91, 2007.

XU, Z.; TAO, B.; REN, S.; CAO, F.; LIANG, J. Identification of angiogenesis and viable myocardium using hybrid cardiac imaging. *Proc. SPIE 10951. Medical Imaging: Image-Guided Procedures, Robotic Interventions and Modeling*. 2019.

YOUMANS, G. P; PATERSON, P. Y; SOMMERS, H. M. *Bases biológicas e clínicas das doenças infecciosas*; 2ª Ed. Filadélfia, Pa, Artes médicas, 1983.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS IN VITRO DE RADIOMARCAÇÃO DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS COM O TECNÉCIO-99m: APLICAÇÕES NA MEDICINA NUCLEAR

Pesquisador: OSANA DINIZ FERREIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 26308019.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

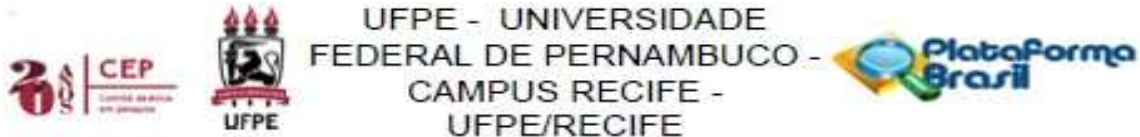
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.824.434

Apresentação do Projeto:

O projeto para Dissertação de Mestrado intitulado "Estudos in vitro de radiomarcagem de células sanguíneas com o tecnécio-99m: aplicações na medicina nuclear" foi apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, pela estudante Osana Diniz Ferreira, sob a orientação da Profa Márcia Liane de Oliveira. Pesquisa experimental (in vitro), com delineamento do tipo explicativo/analítico e de cunho quantitativo e transversal. O projeto propõe estabelecer e aperfeiçoar protocolos e procedimentos de radiomarcagem de populações celulares (leucócitos totais e hemácias) com ^{99m}Tc , a fim de, detectar precocemente sítios infecciosos e ocorrências de infarto (cardiopatias) de forma não invasiva. Para isolamento e radiomarcagem, será seguido o protocolo adaptado do guia "Células autólogas radiomarcadas: métodos e padronização para uso clínico" da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2015). Serão coletados com seringas estéreis, 18 ml de sangue periférico total, de 20 voluntários saudáveis (sem sintomatologia ou quadro clínico comprovado de cardiopatia e/ou hipertensão arterial). Realizar ensaios de isolamento (separação) e radiomarcagem in vitro das células do pool sanguíneo, a partir de amostras do sangue periférico total, a fim de constatar a eficiência de marcação, a viabilidade celular amostral e o rendimento total do estudo. Todos os ensaios de síntese e controle de qualidade da biomolécula ^{99m}Tc -célula serão realizados na Divisão de Produção de Radiofármacos (DIPRA) em colaboração com o Laboratório de Dosimetria.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600



Continuação do Parecer: 3.824.434

Biológica, do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN/NE. Aliquotas das amostras do radionuclídeo serão doadas pelo Real Hospital Português de Beneficência do Recife-PE, com o laudo de aprovação para uso, isto é, com os testes de controle de qualidade internos já realizados.

Objetivo da Pesquisa:

a. Objetivo Geral

Realizar ensaios de isolamento (separação) e radiomarcagem *in vitro* das células do pool sanguíneo, a partir de amostras do sangue periférico total, a fim de constatar a eficiência de marcação, a viabilidade celular amostral e o rendimento total do estudo.

b. Objetivos específicos

1. Padronizar a metodologia de separação das populações celulares do fluido biológico sanguíneo, adaptando técnicas já usuais.
2. Implementar a técnica de radiomarcagem celular com o radiofármaco ^{99m}Tc (tecnécio-99metaestável) no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE).
3. Estabelecer ensaios de Controle de Qualidade (CQ) a fim de assegurar a qualidade da biomolécula (^{99m}Tc -Célula) formada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

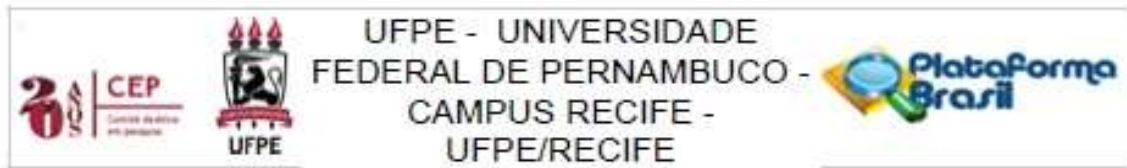
a. Riscos:

Os voluntários da pesquisa participarão apenas um único período, a coleta de sangue. O participante pode sentir algum desconforto durante a retirada de sangue se o mesmo não for coletado com eficiência, como dor leve e vermelhidão pós-coleta, para amenizar isto, será entregue ao voluntário uma bolsa de gelo a fim de aliviar a vermelhidão. Assim, o participante deverá apenas esperar que a vermelhidão e a dor leve desapareçam caso estas venha a surgir. Deve-se enfatizar também que, por envolver arquivamento de dados, existe o risco de quebra de sigilo dos dados. Para isso, os dados serão arquivados em computador de uso pessoal com acesso mediante senha de conhecimento apenas dos pesquisadores envolvidos na pesquisa.

b. Benefícios:

Por se tratar de uma pesquisa para o estabelecimento e padronização de ensaios primários, os benefícios para os voluntários desta pesquisa são inexistentes ou indiretos, isto é, sua

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



Continuação do Parecer: 3.824.434

participação apenas contribuirá para ampliação e aprofundamento do estudo acerca do assunto. Assim, com a síntese e o controle da qualidade dessa nova metodologia, busca-se otimizar o diagnóstico doenças infecciosas agudas e cardiopatias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está técnica e cientificamente no formato adequado. Todas as etapas foram apresentadas satisfatoriamente. A metodologia está coerente com as exigências da Resolução 466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto – foi apresentada.
2. Termo de Confidencialidade – foi apresentado.
3. Orçamento – o projeto demanda custos que estão discriminados no valor total de R\$ 2.874,00 reais.
4. TCLE – foi apresentado.
5. Currículos – apresentados.
6. Cartas de Anuência – foram apresentadas.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as normas da Resolução 466/12, sugiro que o projeto seja aprovado.

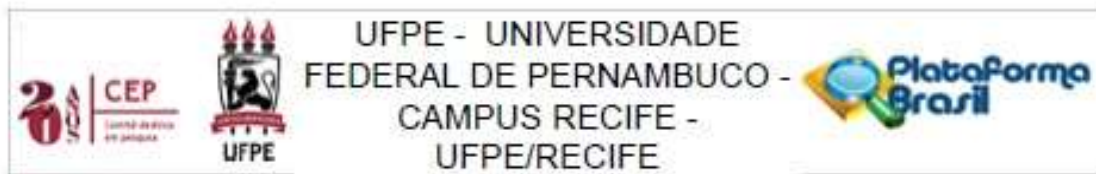
Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o 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/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,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2125-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.824.434

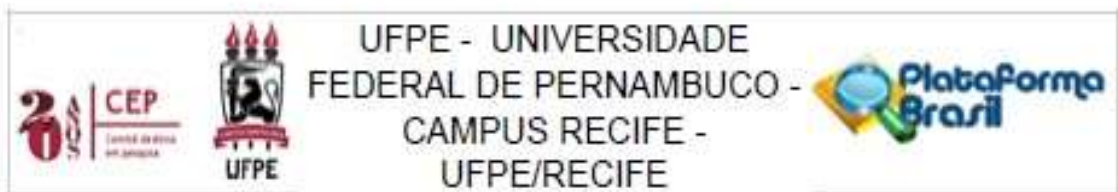
identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

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/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_BÁSICAS_DO_PROJETO_1481165.pdf	29/11/2019 09:24:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18OSANA.doc	29/11/2019 09:24:45	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	28/11/2019 21:10:34	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	DelUsodedados.pdf	28/11/2019 14:19:06	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	Confidencialidade.pdf	28/11/2019 14:13:48	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	CartadeAnuencia.pdf	28/11/2019 14:10:11	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	AnunciaUsodeDados.pdf	28/11/2019 14:09:52	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	CLattesOsanaDiniz.pdf	28/11/2019 14:08:56	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	CLattesMerciaLiane.pdf	28/11/2019 14:04:29	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	CLattesKethyllemMayara.pdf	28/11/2019 14:04:06	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	historico.pdf	28/11/2019 14:00:25	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto.doc	28/11/2019	OSANA DINIZ	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2125-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.824.434

/ Brochura Investigador	Projeto.doc	13:47:29	FERREIRA	Aceito
-------------------------	-------------	----------	----------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 06 de Fevereiro de 2020

Assinado por:

Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2125-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br