



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO DE MARCAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS
IOR-CEA-1 E IOR-EGF/R3 COM ^{99m}Tc**

CARLA ROBERTA DE BARROS RODRIGUES DIAS

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

**Orientador:
Dr. João Alberto Osso Júnior**

**São Paulo
2005**

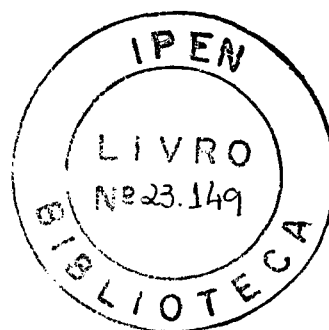
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
“Autarquia associada à Universidade de São Paulo”

ESTUDOS DE MARCAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS IOR-CEA-1 E
IOR-EGF/R3 COM ^{99m}Tc

CARLA ROBERTA DE BARROS RODRIGUES DIAS

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Aplicações.

Orientador:
Dr. João Alberto Osso Júnior



São Paulo
2005

“Este trabalho é dedicado aos meus pais José Carlos e Elide, aos meus avós maternos Carlos e Marlene e aos meus avós paternos José e Catarina (em memória).”

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça da vida.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Dr. João Alberto Osso Júnior que, além de orientador é um grande amigo, minha gratidão é inenarrável. Agradeço pelos ensinamentos transmitidos, pelo profissionalismo e competência, pela sincera amizade, sempre me encorajando e me ajudando, pelo apoio, orientação e confiança a mim depositada e por ter me proporcionado um crescimento profissional.

A Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva, pela oportunidade concedida, tendo me recebido no IPEN de braços abertos, para realização da iniciação científica.

A MSc. Marycel Rosa F. F. de Barboza, minha orientadora da iniciação científica, por ter me apresentado a radiofarmácia, pela ótima convivência profissional e todos ensinamentos que só me enriquece cientificamente, pela colaboração técnico-científica no Mestrado, pela experiência transmitida e, principalmente, pela amizade.

À equipe de controle de qualidade do CR, pela paciência e grande colaboração na utilização dos equipamentos.

A Dra. Emiko Muramoto, pelo apoio e colaboração fornecidos na realização das imagens e pelos ensinamentos e conselhos durante a execução do trabalho.

Aos funcionários do CR que contribuíram de alguma maneira na realização deste trabalho, principalmente ao Pires, Adriano, Rosana, Edson, Alberto e Cláudia Castanheira por tarefas prestadas no laboratório.

Aos colegas de pós-graduação do IPEN e bolsistas do CR pelas palavras de incentivo e pela ajuda nas dificuldades encontradas.

As grandes amigas do curso de Pós-Graduação, Vanessa Moraes e Barbara Szot Marczewski, pela ajuda em muitos momentos difíceis, compartilhando idéias, sugerindo alternativas, criticando e incentivando, obrigada pelo apoio, companheirismo e amizade incondicional.

Aos meus pais José Carlos e Elide, pelo amor, carinho, compreensão e incansável apoio ao longo de toda minha vida. Muito obrigada por terem me proporcionado condições para chegar até aqui.

Aos meus familiares, pelo apoio e incentivo constante.

Aos meus amigos, por compartilharem esta fase tão importante da minha vida, ajudarem em muitos momentos difíceis e terem compreendido a minha ausência entre eles enquanto desenvolvia este trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste trabalho, quero expressar o meu mais sincero e profundo agradecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que proporcionou a execução deste trabalho pela concessão de uma bolsa de estudo.

"Quem teve a idéia de cortar o tempo em fatias, a que se deu o nome de ano, foi um indivíduo genial. Industrializou a esperança, fazendo-a funcionar no limite da exaustão.

Doze meses dão para qualquer ser humano se cansar e entregar os pontos. Aí entra o milagre da renovação e tudo começa outra vez, com outro número e outra vontade de acreditar que daqui para diante vai ser diferente."

(Carlos Drummond de Andrade)

ESTUDOS DE MARCAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS IOR-CEA-1 E IOR-EGF/R3 COM ^{99m}Tc

Carla Roberta de Barros Rodrigues Dias

RESUMO

A Medicina Nuclear é uma especialidade que utiliza radioisótopos ou radiotraçadores para o diagnóstico ou tratamento de doenças e é considerada uma das melhores ferramentas entre as modalidades diagnósticas para detecção de câncer. O tecnécio-99 metaestável é um dos principais isótopos utilizados para marcação de anticorpos e um dos mais utilizados em Medicina Nuclear em função de suas características físicas adequadas, disponibilidade e baixo custo. Anticorpos monoclonais radiomarcados tem se mostrado promissores para o diagnóstico e terapia de câncer e seu uso trouxe um grande avanço experimental e clínico no campo da oncologia. As principais aplicações clínicas da imunocintilografia com anticorpos monoclonais são o estadiamento e a avaliação das recidivas tumorais. Os anticorpos utilizados neste trabalho foram: ior-CEA 1, um anticorpo monoclonal murino, que age diretamente contra o CEA expressado em diferentes neoplasias especialmente aquelas do trato gastrointestinal (câncer colorretal) e o ior-EGF/R3, um anticorpo monoclonal murino, que liga-se ao domínio externo do EGF-R e tem sido usado no diagnóstico de tumores de origem epitelial. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver e aperfeiçoar os processos de redução e purificação, as técnicas da radiomarkação, os procedimentos de controle de qualidade (radioquímico, imunorreatividade e desafio a cisteína) e o estudo de imagem dos anticorpos monoclonais ior-CEA 1 e ior-EGF/R3, utilizando o método simples, rápido e eficiente de marcação direta de anticorpo com ^{99m}Tc . O resultado final foi a definição das melhores condições de preparação de conjuntos de reativos liofilizados do ior-CEA 1 e ior-EGF/R3 para uma eficiente aplicação diagnóstica em Medicina Nuclear. A formulação mais adequada foi: 1 mg de Ac, 29 μL de MDP, 3,0 μg de Sn^{2+} , 1 mL de ^{99m}Tc e 30 min. de reação. Nessas condições o rendimento de marcação foi sempre maior que 95% e a atividade máxima para marcação foi cerca de 2220 MBq (60 mCi). A comprovação da eficácia e qualidade dos métodos utilizados foram as imagens obtidas com camundongos infectados com células tumorais injetados com os anticorpos marcados com ^{99m}Tc .

STUDIES OF MONOCLONAL ANTIBODIES IOR-CEA-1 AND IOR-EGF/R3 LABELLED WITH ^{99m}Tc

Carla Roberta de Barros Rodrigues Dias

ABSTRACT

Nuclear Medicine is a speciality that uses radioisotopes for the diagnosis or treatment of diseases and it is considered one of the best tools among the diagnostic modalities for detection of cancer. ^{99m}Tc is one of the main isotopes for labelling antibodies and in Nuclear Medicine in general, due to its adequate physical properties, availability and low cost. Labelled monoclonal antibodies have shown promising results for diagnosis and therapy of cancer and their use has brought great experimental and clinical advances in the field of oncology. The main clinical applications of immunoscintigraphy with monoclonal antibodies are staging and evaluation of tumoral recidives. The antibodies employed in this work were: ior-CEA 1, a murine monoclonal antibody that acts directly against CEA expressed in several neoplasies in particular those from the gastrointestinal tract (colorectal cancer) and ior-EGF/R3, a murine monoclonal antibody that binds to the external domain of EGF-R and it has been used in the diagnosis of tumors of epithelial origin. The objectives of this work were the development and optimization of the reduction and purification processes, the radiolabelling techniques and quality control procedures (radiochemical, immunoreactivity and cistein challenge) and imaging studies of monoclonal antibodies ior-CEA 1 and ior-EGF/R3, using the simple, fast and efficient method of direct labelling of the antibody with ^{99m}Tc . The final results was the definition of the best conditions for the preparation of lyophilized reactive kits of ior-CEA 1 and ior-EGF/R3 for an efficient diagnostic application in Nuclear Medicine. The most adequate conditions for the labelling of the antibodies were: 1.0 mg Ab, 29 μL MDP, 3.0 μg Sn^{2+} , 1 mL of ^{99m}Tc and 30 min. reaction time. With these conditions the labelling yield was allways higher than 95% and the maximum activity of ^{99m}Tc was about 2220 MBq (60 mCi). The evidences of the efficiency and quality of the methods here employed were the images obtained with mices infected with tumoral cells and injected with antibodies labelled with ^{99m}Tc .

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Desenvolvimento de radiofármacos.....	13
1.2 Aplicações de radiofármacos na oncologia.....	13
1.2.1 Terapia de câncer.....	13
1.2.2 Imagem de câncer.....	14
1.3 Terapia com fontes de radiação.....	14
1.3.1 Teleterapia.....	14
1.3.2 Braquiterapia.....	15
1.3.3 Aplicadores.....	15
1.3.4 Injetáveis (Medicina Nuclear).....	15
1.3.5 Radioimunoterapia (Medicina Nuclear).....	16
1.4 Medicina Nuclear.....	16
1.4.1 Técnicas de diagnóstico em Medicina Nuclear.....	18
1.4.1.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET).....	18
1.4.1.2 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT).....	20
1.5 Tecnécio-99 meta estável (^{99m}Tc) e uso clínico.....	21
1.5.1 Marcação de proteínas com ^{99m}Tc	22
1.5.1.1 Marcação direta.....	23
1.5.1.2 Marcação indireta.....	24
1.6 O anticorpo e o sistema imune.....	25
1.7 Aplicação de anticorpos monoclonais em Medicina Nuclear.....	28
1.7.1 Anticorpo policlonal versus anticorpo monoclonal.....	32
1.7.2 Anticorpo ior-CEA-1.....	32
1.7.3 Anticorpo ior-EGF/R3.....	33
1.8 Revisão Bibliográfica: Marcação de anticorpos monoclonais com ^{99m}Tc	35
1.9 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN): Situação atual no IPEN.....	39
2 OBJETIVOS.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42

3.1 Infraestrutura e Equipamentos.....	42
3.2 Lista de Reagentes.....	43
3.3 Preparo das soluções.....	44
3.3.1 Tampão fosfato salina (PBS) 0,1 mol/L pH 7,4.....	44
3.3.2 Tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0 e 0,4 mol/L pH 7,0.....	44
3.3.3 Soluções de cisteína.....	44
3.3.4 Reagente de Ellman.....	44
3.4 Procedimento Experimental.....	45
3.4.1 Processo de redução e purificação dos anticorpos.....	46
3.4.2 Controle da pureza dos anticorpos reduzidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	47
3.4.3 Avaliação da concentração protéica dos anticorpos reduzidos.....	47
3.4.4 Determinação do nº de grupos –SH reduzidos.....	47
3.4.4.1 Construção da curva padrão de cisteína.....	48
3.4.5 Marcação da formulação sem liofilização.....	49
3.4.6 Preparação e liofilização da formulação dos anticorpos reduzidos.....	50
3.4.6.1 Liofilização.....	50
3.4.6.2 Procedimento de liofilização dos anticorpos.....	51
3.4.7 Marcação da formulação liofilizada (kit).....	51
3.4.8 Controle de qualidade dos anticorpos marcados.....	52
3.4.8.1 Determinação da pureza radioquímica.....	52
3.4.8.2 Imunorreatividade.....	53
3.4.8.3 Desafio a cisteína.....	55
3.4.9 Estabilidade dos kits.....	55
3.4.10 Estudos de imagem com os anticorpos marcados com ^{99m} Tc.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
4.1 Processo de redução e purificação dos anticorpos.....	57
4.2 Controle da pureza dos anticorpos em CLAE.....	58
4.3 Avaliação da concentração protéica dos anticorpos reduzidos.....	61
4.4 Determinação do nº de grupos –SH reduzidos.....	62
4.5 Marcação dos anticorpos.....	64

4.5.1 Marcação sem liofilização: ior-CEA 1.....	64
4.5.2 Preparação e liofilização da formulação do anticorpo ior-CEA 1 reduzido.....	68
4.5.2.1 Marcação dos kits: ior-CEA 1.....	69
4.5.3 Marcação sem liofilização: ior-EGF/R3.....	74
4.5.4 Preparação e liofilização da formulação do anticorpo ior-EGF/R3 reduzido.....	78
4.5.4.1 Marcação dos kits: ior-EGF/R3.....	78
4.6 Estabilidade dos kits.....	81
4.7 Imunorreatividade.....	83
4.8 Desafio a cisteína.....	84
4.9 Estudos de imagens com os anticorpos marcados com ^{99m} Tc.....	86
5 CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. O uso de agentes de contraste de imagem.....	31
Tabela 2. Diferenças entre anticorpo policlonal e monoclonal.....	32
Tabela 3. Tumores que expressam o receptor EGF-R.....	34
Tabela 4. Determinação do R_f dos produtos nos três tipos de solventes.....	53
Tabela 5. Relação entre a massa de Ac, tempo de redução e rendimento de marcação.....	57
Tabela 6. Número de grupos sulfidrilas endógenos gerados por redução com 2-ME....	62
Tabela 7. Efeito da variação da atividade de ^{99m}Tc no rendimento de marcação.....	67
Tabela 8. Composição usada na preparação dos lotes dos anticorpos ior-CEA 1.....	69
Tabela 9. Rendimento de marcação dos kits do Lote C.....	71
Tabela 10. Rendimento de marcação dos kits do Lote D.....	72
Tabela 11. Rendimento de marcação dos kits do Lote F.....	73
Tabela 12. Estabilidade da marcação do anticorpo ior-EGF/R3.....	77
Tabela 13. Composição usada na preparação dos lotes do anticorpo ior-EGF/R3.....	78
Tabela 14. Comparação do rendimento de marcação com a variação do volume de ^{99m}Tc	79
Tabela 15. Rendimento de marcação em relação a altas atividades de ^{99m}Tc	79
Tabela 16. Comparação do kit a vácuo e sem vácuo.....	80
Tabela 17. Rendimento de marcação em relação ao tempo usado na redução do anticorpo.....	80
Tabela 18. Estabilidade dos kits do Lote A' (ior-EGF/R3) após estocagem dos kits por diferentes períodos.....	81
Tabela 19. Estabilidade dos kits do Lote B (ior-CEA 1) após estocagem dos kits por diferentes períodos.....	82
Tabela 20. Estabilidade dos kits do Lote D (ior-CEA 1) após estocagem dos kits por diferentes períodos.....	82
Tabela 21. Estabilidade dos kits do Lote E (ior-CEA 1) após estocagem dos kits por diferentes períodos.....	83
Tabela 22. Porcentagem (%) de dose captada no tumor em relação ao corpo inteiro....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Equipamento de Tomografia por Emissão de Pósitrons – PET/CT (Gemini/Philips).....	19
Figura 2. Exemplo de um exame de câncer de cólon realizado em um PET/CT.....	19
Figura 3. Equipamento de Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único – SPECT.....	20
Figura 4. Estrutura geral de uma molécula de anticorpo.....	27
Figura 5. Fragmentos resultantes da clivagem do anticorpo intacto com proteases.....	27
Figura 6. Esquema da preparação de anticorpos policlonais e monoclonais.....	29
Figura 7. Fluxograma da metodologia aplicada.....	45
Figura 8. Esquema de redução das pontes dissulfídicas com 2-ME.....	46
Figura 9. Esquema de marcação do anticorpo com ^{99m}Tc	49
Figura 10. Determinação da porcentagem da fração imunorreativa.....	54
Figura 11. Equipamento usado para mapeamento dos camundongos.....	56
Figura 12. Cromatogramas: (A) Solução Salina; (B) 2-ME, (C) PBS e (D) kit MDP... ..	58
Figura 13. Cromatogramas: (a) CEA nativo, (b) EGF/R3 nativo e (c) EGF/R3 reduzido antes da purificação.....	59
Figura 14. Cromatograma das frações 2, 3, 4, 5, 6 e 7.....	60
Figura 15. Cálculo da recuperação da proteína reduzida.....	61
Figura 16. Curva padrão de cisteína construída para determinação dos grupos –SH....	62
Figura 17. Relação entre o no de grupos -SH endógenos e a eficiência de marcação para o anticorpo ior-EGF/R3.....	63
Figura 18. Eficiência de marcação em relação à variação do volume do kit de MDP e a massa de estanho correspondente.....	65
Figura 19. Eficiência de marcação em relação a massa de anticorpo usada.....	66
Figura 20. Rendimento de marcação com relação à variação do volume de ^{99m}Tc	67
Figura 21. Variação do rendimento de marcação em relação ao tempo pós-adição do ^{99m}Tc	68
Figura 22. Rendimento de marcação dos kits do Lote A.....	69
Figura 23. Rendimento de marcação dos kits do Lote B.....	70
Figura 24. Rendimento de marcação dos kits do Lote E e sua estabilidade.....	72
Figura 25. Rendimento de marcação dos kits do Lote G.....	73
Figura 26. Eficiência de marcação em relação à variação do volume do kit de MDP e a massa de estanho correspondente.....	75
Figura 27. Eficiência de marcação em relação a massa de anticorpo usada.....	75
Figura 28. Efeito da variação da atividade de ^{99m}Tc no rendimento de marcação.....	76
Figura 29. Variação no rendimento de marcação (%) em relação ao tempo.....	77
Figura 30. Rendimento de marcação em relação à variação do tempo de incubação....	78
Figura 31. Desafio a cisteína.....	85
Figura 32. Fotos dos camundongos usados no estudo: (a) camundongo sadio e (b) camundongo com tumor localizado no dorso (indicado pela seta).....	86
Figura 33. Posicionamento realizado para aquisição das imagens.....	86

Figura 34. Imagem de gama-câmara do camundongo normal (esquerda) e com tumor (direita) após 24 horas de injeção iv com o anticorpo ior-CEA 1 marcado com ^{99m}Tc . Tumor (T), tireóide (Ti), glândulas salivares (Gs) e fígado (F) foram visualizados..... 87

Figura 35. Imagem de gama-câmara do camundongo normal (esquerda) e com tumor (direita) após 24 horas de injeção iv com o anticorpo ior-EGF/R3 marcado com ^{99m}Tc . Tumor (T), tireóide (Ti), glândulas salivares (Gs) e fígado (F) foram visualizados..... 87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento de radiofármacos

Um radiofármaco consiste basicamente de um radionuclídeo e um composto ligante. O uso do radiofármaco é ditado pelas características dos dois componentes. As considerações gerais quando se projetam novos radiofármacos são: fácil viabilidade; baixo custo; meia-vida ótima do radionuclídeo; meia-vida efetiva do radiofármaco, emissão de fótons do radionuclídeo e tipo de decaimento favoráveis ao tipo de aplicação e alta razão alvo:não alvo. À parte destas considerações gerais, uma idéia do mecanismo de localização do radiofármaco em diferentes órgãos proporciona informações para o desenvolvimento do agente designado para o órgão ou caminho específico. Os fatores que devem ser considerados antes, durante e após a preparação dos radiofármacos são especificidade, compatibilidade, estequiometria, carga e peso da molécula, solubilidade, estabilidade, cinética inerte *in vivo* e capacidade de ligação à proteína [1].

As mais promissoras áreas de pesquisa envolvendo radiofármacos são [2]:

- ❖ Imagem de infecção;
- ❖ Imagem de câncer;
- ❖ Terapia de câncer;
- ❖ Imagem de neuro-receptor e
- ❖ Química de radiofármacos.

1.2 Aplicações de radiofármacos na oncologia [2]

1.2.1 Terapia de câncer

A terapia radionuclídica direcionada é uma possibilidade da Medicina Nuclear e atualmente tem ressurgido o interesse neste campo. A maior dificuldade nesta área de pesquisa é a falta do conhecimento básico sobre quais são os determinantes importantes para a eficácia da terapia. São poucos os agentes comercialmente disponíveis para radioterapia de câncer. Muitos anos são necessários para obter resultados que confirmem a resposta e definam os resultados terapêuticos dos radiofármacos.

1.2.2 Imagem de câncer

As possíveis áreas de aplicação dos radiofármacos no gerenciamento de pacientes com câncer incluem:

- ❖ Exame da população;
- ❖ Diagnóstico primário;
- ❖ Estágio da doença;
- ❖ Medida da resposta a terapia e
- ❖ Planejamento e identificação da melhor terapia.

Estadiamento do câncer requer uma investigação de imagem com rápida resposta, imagem de corpo inteiro, alta sensibilidade e alta especificidade.

1.3 Terapia com fontes de radiação

Radioterapia é uma das modalidades mais efetivas no tratamento do câncer [3]. Pode ser dividida em algumas classes, dependendo da sua forma de aplicação, equipamento usado e tipo de radiação.

1.3.1 Teleterapia

Radioterapia convencional ou de feixe externo (teleterapia) consiste em eliminar tumores malignos (cancerígenos) utilizando equipamentos que emitem radiação gama, raios X ou feixes de elétrons (ex: telecobalto, acelerador linear). O princípio básico é eliminar as células cancerígenas e evitar sua proliferação, e estas serem substituídas por células saudáveis. O tratamento consiste na aplicação programada de doses elevadas de radiação (doses pré-calculadas), em um determinado tempo, a uma certa distância do paciente, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível aos tecidos saudáveis intermediários ou adjacentes [4]. Este tipo de técnica tem um papel vital no tratamento de cânceres; todavia não é efetivo para tratamento secundário ou de sítios de câncer metastático fora da área de tratamento [5].

1.3.2 Braquiterapia

Trata-se de uma radioterapia localizada para tipos específicos de tumores e em locais específicos do corpo humano. O tratamento radioterápico é feito por meio de núclídeos radioativos onde a fonte de radiação fica a uma curta distância, em contato ou até mesmo implantada na região que deve receber a dose. Atualmente são utilizados ^{60}Co , ^{137}Cs , ^{125}I , ^{192}Ir e muitos outros [4]. Esses materiais são comercializados em fontes seladas, que podem ser em forma de tubos (tratamentos intracavitários, principalmente nas aplicações ginecológicas, ou em moldes para aplicações externas), agulhas (aplicações intersticiais), fios (fios de ^{192}Ir) ou sementes de ^{125}I para tratamento de câncer de próstata [6]. Sua vantagem é afetar mais fortemente o tumor, devido à proximidade da fonte radioativa, e danificar menos os tecidos e órgãos próximos.

1.3.3 Aplicadores [4]

Aplicadores são fontes radioativas emissoras beta distribuídas sobre uma superfície, cuja geometria depende do aplicador. O ^{90}Sr é um radionuclídeo muito usado em aplicadores dermatológicos e oftalmológicos. O princípio de operação é a aceleração do processo de cicatrização de tecidos submetidos a cirurgias, evitando sangramentos (operação de pterígio) e quelóides (cirurgia plástica), de modo semelhante a uma cauterização superficial. A atividade das fontes é baixa e não oferecem risco significativo de acidente sob o ponto de vista radiológico. O importante é o controle do tempo de aplicação no tratamento, a manutenção da sua integridade física e a guarda adequada dos aplicadores.

1.3.4 Injetáveis (Medicina Nuclear)

Alguns tratamentos utilizam medicamentos contendo radioisótopos, inoculados no paciente por meio de ingestão ou injeção, com a garantia de sua deposição preferencial em determinado órgão ou tecido do corpo humano, para localização de sítios específicos oferecendo a oportunidade de tratamento de doenças extremamente disseminadas. Por exemplo, isótopos do iodo para o tratamento de câncer na tireóide, ^{131}I -MIBG para tumores neuroendócrinos, ^{153}Sm -EDTMP para controle da dor de doença óssea [4]. Uma terapia

específica é desenvolvida toda vez que se encontra uma forma química que pode ser marcada com um determinado radioisótopo, que irá atuar sobre um determinado tipo de tumor. Com esse objetivo tem-se empregado diferentes radionuclídeos que podem ser emissores alfa (^{211}At , ^{213}Bi), beta (^{131}I , ^{153}Sm , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{90}Y , ^{177}Lu , entre outros) ou emissores Auger (^{111}In , ^{67}Ga), entre os quais encontram-se [5, 7, 8].

1.3.5 Radioimunoterapia (Medicina Nuclear)

Nos últimos anos tem-se avaliado a utilidade da radioimunoterapia (RIT) como alternativa viável no tratamento de tumores malignos [7]. Radioimunoterapia corresponde ao uso de anticorpos monoclonais radiomarcados na terapia do câncer [9], permitindo a irradiação específica de tecido tumoral com danos mínimos ou toleráveis aos órgãos não afetados pela doença [10]. Anticorpos monoclonais têm sido promissores no tratamento de alguns tipos de câncer [11], devido ao potencial de servir como carregador seletivo de radionuclídeos para um alvo específico *in vivo* [12]. Alguns fatores importantes e determinantes para aplicação da RIT, são: as características do anticorpo (especificidade, afinidade, avidéz, dose e imunorreatividade); o radionuclídeo (propriedades de emissão e estabilidade química do radioimunoconjugado); o antígeno alvo (localização, densidade, heterogeneidade de expressão, estabilidade e modulação) e a natureza do tumor alvo (radiossensibilidade intrínseca, porcentagem de proliferação, volume, base do tumor, etc) [13].

Os anticorpos para uso em RIT podem ser marcados com: ^{188}Re , ^{90}Y , ^{153}Sm [13]. Outros radionuclídeos de potencial terapêutico tem sido estudados incluindo os emissores- α de vida curta, como ^{212}Bi e ^{211}At e emissores β^- , como ^{67}Cu , ^{109}Pd e ^{47}Sc [12].

1.4 Medicina Nuclear [3, 14, 15]

Medicina Nuclear é uma especialidade que utiliza radioisótopos, ou radiotraçadores, para o diagnóstico ou tratamento de doenças e é considerada uma das melhores ferramentas entre as modalidades diagnósticas para detecção de câncer.

Os radioisótopos são produzidos em Reatores Nucleares ou Ciclotron e podem ser utilizados na sua forma química mais simples ou então, ligados a uma molécula ou a um composto escolhido por sua capacidade de ser captado num determinado órgão, num processo

fisiológico ou fisiopatológico. A associação do radionuclídeo com essa molécula ou esse composto é um radiofármaco.

Os requisitos básicos para os radionuclídeos serem utilizados no diagnóstico em Medicina Nuclear são:

- ❖ Propriedades radioativas: tempo de desintegração espontânea, tipos de emissão e energia de raios gama (γ);
- ❖ Disponibilidade rápida e baixo custo;
- ❖ Meia-vida física compatível com os estudos a serem realizados;
- ❖ Pureza radionuclídica, radioquímica e química adequada;
- ❖ Toxicidade baixa,
- ❖ Capacidade de serem ligados ao composto desejado.

As propriedades físicas ou químicas do composto, e não as do radioisótopo, fazem com que a captação seja específica em um determinado compartimento do corpo (p.ex. reservatório sanguíneo, fígado, medula óssea, tireóide), e eliminada do corpo por uma determinada via de excreção (renal, biliar e outros).

Os diagnósticos em Medicina Nuclear podem ser realizados por meio de dois tipos de ensaios: *in vitro* e *in vivo*.

Nos ensaios *in vitro* marca-se com substâncias radioativas uma amostra biológica extraída do indivíduo, que ao associar-se, por meio de diferentes procedimentos químicos, permitem determinar quantidades significativas, fazendo-se a medida da quantidade (atividade) de radionuclídeo presente ligado à amostra biológica (Técnica de Radioimunoensaio – RIA).

Nos ensaios *in vivo* um radioisótopo ou radiofármaco, independente da via de administração no paciente, seja por via oral, endovenosa, inalação, irá se localizar na região de interesse, conforme a especificidade do exame.

As imagens são obtidas com um detector de raios- γ (gama-câmara) posicionado sobre o corpo do paciente para quantificar e avaliar a distribuição da radioatividade.

Os exames de medicina nuclear são seguros, não-invasivos e apresentam uma ótima relação custo-benefício, pois são capazes de reunir informações importantes que de outra maneira seriam inacessíveis ou que poderiam requerer exames mais caros e com maior risco ao paciente. Uma grande vantagem da cintilografia é a sua alta sensibilidade na detecção de alterações na estrutura e funções dos órgãos podendo identificar anormalidades num estágio

muito precoce, antes desta ser aparente em outros tipos de exames (devido à possibilidade de se fazer imagens dinâmicas e a obtenção de informações da fisiologia dos órgãos ou sistemas).

1.4.1 Técnicas de diagnóstico em Medicina Nuclear

A escolha da técnica a ser utilizada no diagnóstico está relacionada com o tipo de emissão eletromagnética e corpuscular do radionuclídeo durante seu decaimento radioativo. Dentre as técnicas mais atuais estão o PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons) e o SPECT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único).

1.4.1.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET)

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) (FIG. 1) fornece imagens funcionais do metabolismo regional que podem ser mais sensíveis e acuradas que as imagens puramente morfológicas, na detecção de processos tumorais envolvendo os mais diversos órgãos, ou na detecção de patologias cardíacas e neurológicas.

A técnica está baseada na detecção, em coincidência, de dois fótons de 511 keV, emitidos em direções opostas, depois da aniquilação de um pósitron de um radionuclídeo emissor de pósitrons (β^+) e um elétron do meio [16]. Os dois fótons são detectados por dois detectores conectados em coincidência no mesmo eixo. Esta técnica permite realizar imagens com uma resolução espacial de 5 mm (8 – 10 mm para imagem cintilográfica convencional). Os dados coletados em diversos ângulos, ao longo do eixo do corpo do paciente, são utilizados para reconstruir as imagens nas projeções axial, lateral e coronal da distribuição da atividade da área de interesse [9] (FIG. 2).

As substâncias marcadas pelos radioisótopos incluem substratos do metabolismo celular, drogas, anticorpos, neurotransmissores e outras moléculas biologicamente ativas.

Os radioisótopos utilizados nesta técnica emitem pósitrons com energia baixa, taxa de emissão alta e possuem meia-vida curta. Os radioisótopos mais utilizados são: Carbono-11 (^{11}C), Nitrogênio-13 (^{13}N), Oxigênio-15 (^{15}O) e Flúor-18 (^{18}F) [17, 18].

O uso do PET na oncologia clínica teve um aumento significativo nessas últimas décadas. Isto é devido ao resultado do uso do traçador ^{18}F -FDG como uma ferramenta geral

para estudo do metabolismo e transporte da glicose em processos patológicos neoplásicos e benignos [18].

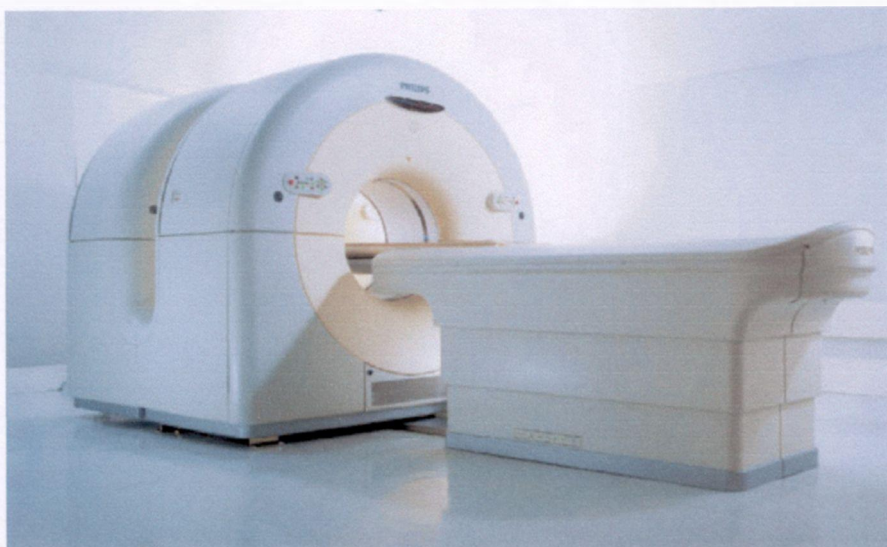


FIGURA 1 - Equipamento de Tomografia por Emissão de Pósitrons – PET/CT (Gemini/Philips) [19]

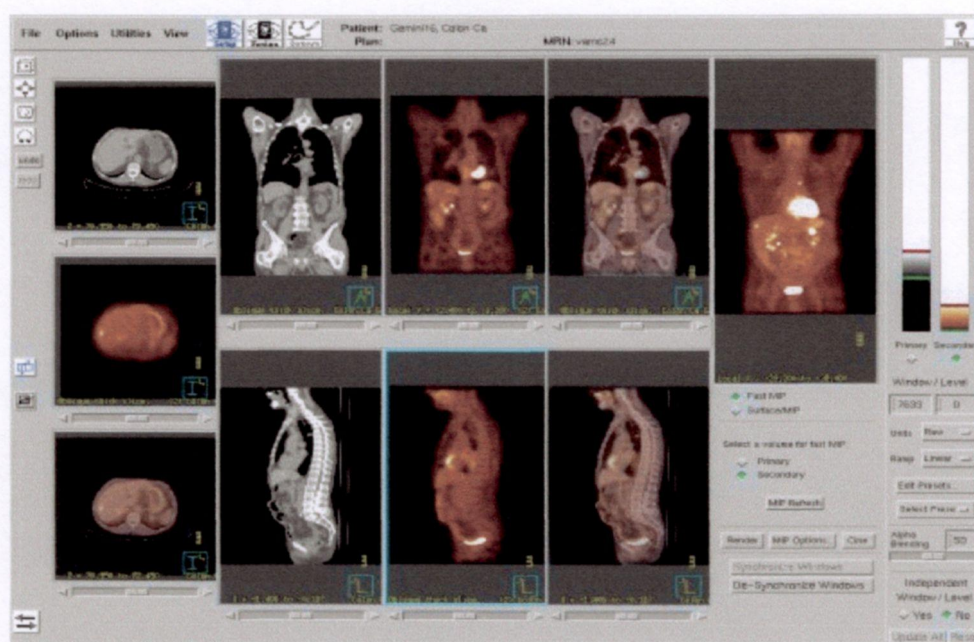


FIGURA 2 - Exemplo de um exame de câncer de cólon realizado em um PET/CT [20].

1.4.1.2 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT)

Os radionuclídeos usados nas imagens emitem um único fóton com energia suficiente para não sofrer atenuação pelo corpo. Pode-se fazer uma imagem da distribuição do radiofármaco usando uma gama-câmara, que consiste de um cristal de cintilação de NaI (Tl) de área grande (geralmente 50 cm x 50 cm) acoplado a um colimador com uma série de tubos fotomultiplicadores (PMTs) para amplificar os sinais. A gama-câmara pode ser usada em uma posição estacionária para obter perspectiva planar do paciente (cintilografia planar), ou em rotação para realizar a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) [16] (FIG. 3).

Com isso, esta técnica é utilizada para obter imagens tridimensionais e dinâmicas de órgãos ou tecidos de pacientes que se submetem a diagnósticos com traçadores radioativos. Esses radioisótopos devem emitir radiação gama com energia entre 100 a 300 keV, devem decair por captura eletrônica ou transição isomérica e não devem emitir radiação corpuscular para minimizar a dose de radiação para o paciente. Devem, também, possuir meia-vida física adequada ao estudo fisiológico de interesse. Os principais radioisótopos utilizados são: Tecnécio-99m (^{99m}Tc), Gálio-67 (^{67}Ga), Iodo-123 (^{123}I), Iodo-131 (^{131}I), Tório-201 (^{201}Tl) e Índio-111 (^{111}In) [17, 21].



FIGURA 3 - Equipamento de Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) [22]

1.5 Tecnécio-99 meta estável (^{99m}Tc) e uso clínico

Perrier e Segré em 1937 descobriram o elemento de nº atômico 43, isolado pelo bombardeamento de molibdênio com deuteron. Este elemento também foi isolado em grandes quantidades dos produtos de fissão do urânio. O nome tecnécio foi criado pelo grego Paneth e significa que este foi o primeiro elemento artificial produzido pelo homem [1] (o nome tecnécio em grego significa artificial [23]), e o símbolo químico sugerido foi Tc. O isomerismo nuclear do elemento Tc e a existência do ^{99m}Tc (tecnécio-99 metaestável) foram descobertos por Seaborg e Segré [1].

Os radiofármacos de ^{99m}Tc tornaram-se, nos últimos 30 anos, importantes ferramentas para o diagnóstico de várias doenças ou disfunções de órgãos e sistemas que compõem o corpo humano [24].

O elevado índice de utilização desses compostos em Medicina Nuclear é o resultado das propriedades físicas e químicas ideais do radioisótopo. O ^{99m}Tc tem uma meia-vida física de 6 horas, decai por transição isomérica para o ^{99}Tc sem emissão de radiação corpuscular, o que permite a administração de maiores atividades ao paciente com baixa dose de radiação. Além disso, no seu decaimento o ^{99m}Tc emite um raio- γ de 140 keV com 89% de abundância, energia ideal para uso com os detectores de cintilografia planar ou pela técnica de diagnóstico denominada de SPECT, cuja faixa ótima de operação é entre 100 e 300 keV [25, 26, 27, 28, 29, 30].

A outra grande vantagem é a sua disponibilidade à classe médica na forma de um gerador comercial de molibdênio-99/tecnécio-99m (^{99}Mo - ^{99m}Tc) [31] a um baixo custo, onde o ^{99}Mo , denominado de pai, com meia-vida física de 66 horas decai para o filho ^{99m}Tc . O gerador é um sistema composto por uma coluna cromatográfica com óxido de alumínio (Al_2O_3), onde é depositado o molibdato ($^{99}\text{MoO}_4^{2-}$), que via decaimento β^- forma o ^{99m}Tc . Estas duas espécies apresentam diferentes afinidades pelo Al_2O_3 , possibilitando que o ^{99m}Tc seja coletado como um ânion tetraoxitecnetato hidratado (pertecnetato, $^{99m}\text{TcO}_4^-$) por eluição com solução fisiológica estéril, juntamente com seu isômero ou carreador $^{99}\text{TcO}_4^-$. O ^{99}Tc é considerado virtualmente estável devido sua meia-vida longa [23].

A grande versatilidade do uso do ^{99m}Tc se deve a sua disponibilização em marcar com eficiência pelo método direto uma série grande de substâncias liofilizadas, chamadas comercialmente de reagentes de radiodiagnóstico ou KITS, constituídos basicamente da

substância a ser complexada, do agente redutor e do sistema tampão, cada kit com uma aplicação diferenciada dentro do corpo humano.

Os principais usos do ^{99m}Tc em Medicina Nuclear são: marcação de proteínas; espécies coloidais e partículas; células sanguíneas e marcação de kits tais como: DMSA, MDP, DTPA e outros.

Em função de sua grande disponibilidade e baixo custo o ^{99m}Tc é considerado muitas vezes como o isótopo ideal para a marcação de anticorpos [32], através de técnicas diretas (acoplamento direto na molécula) ou indiretas (acoplamento por meio de outro composto que funciona como ponte) [33] com maior estabilidade que a marcação com ^{131}I (pouco inferior ou semelhante à marcação com ^{111}In). A estabilidade do complexo é fator preponderante para o sucesso do radiotraçador no diagnóstico *in vivo*.

1.5.1 Marcação de proteínas com ^{99m}Tc

A obtenção de proteínas marcadas com ^{99m}Tc se desenvolveu há muitos anos, logo após o aparecimento do gerador de ^{99m}Tc . As preparações iniciais não foram simples de marcar e nem deram produtos estáveis. Se o ^{99m}Tc é reduzido na presença de uma proteína, se obtém uma proteína marcada, mas o átomo de ^{99m}Tc não está necessariamente unido com uma união forte e pode dissociar-se *in vivo*.

Os desenvolvimentos neste tema se orientaram a marcar proteínas com ^{99m}Tc por união do radionuclídeo com reativos sulfúricos. Empregaram-se dois mecanismos para fornecer reativos sulfúricos nas proteínas: o primeiro foi reduzir as pontes dissulfídricas nativas incubando a proteína com íons de estanho, método de Rhodes et al. [34], ou com outros agentes redutores [35] e o segundo foi introduzir grupos que continham sulfidrilas livres incorporando quelantes bifuncionais nas proteínas [36, 37].

Com isso, a marcação de proteínas com ^{99m}Tc pode ser dividida em 2 categorias [38]:

- ❖ Método direto de marcação (uso de grupos endógenos do anticorpo);
- ❖ Método indireto de marcação (uso exógeno de um agente quelante bifuncional).

1.5.1.1 Marcação direta

A marcação com ^{99m}Tc dos grupos sulfúricos reativos da proteína, é considerada usualmente como marcação direta já que não há intermediários, tais como grupos bifuncionais. Uma das maiores vantagens do método direto é que pode resultar na produção de um reagente de diagnóstico. Esta metodologia compreende vários passos [39]:

- ❖ Reduzir os grupos dissulfúricos sem alterar as características biológicas das proteínas;
- ❖ Manter estes grupos sulfúricos reativos;
- ❖ Reduzir o íon pertecnetato a um estado de oxidação altamente reativo, estabilizando-o com a presença de um agente complexante que por sua vez o transfira aos grupos sulfúricos da proteína.

A proteína que irá ser marcada necessita conter sulfidrilas (-SH) reativas ou monossulfúricos (-S ou -S-metal). Estes grupos chamam-se tióis. Os mono e dissulfúricos são uma parte nativa da maioria das proteínas e se deve a união dos aminoácidos que contém tióis a cisteína, e é uma parte da cadeia peptídica da maioria das proteínas. Para muitas proteínas, tais como as gamaglobulinas, o estado nativo é aquele no qual a maioria dos resíduos de cisteína estão unidos a outros resíduos de cisteína formando pontes dissulfídricas intra ou intercadeias. Estas pontes tem um papel importante na manutenção da estrutura funcionante da proteína [39].

Steigman e col. [40] provaram o papel das sulfidrilas ou sulfúricos na marcação de albumina, quando desenvolveram uma coluna de Sephadex G-25 para separar e medir o rendimento da união de alta afinidade do ^{99m}Tc aos anticorpos, comprovando sua verdadeira potencialidade. Como resultado deste método de análise descobriram que era necessário uma incubação prolongada de anticorpos com íons de estanho, antes da marcação com ^{99m}Tc , para obter uma proteína marcada com alta afinidade.

Paik e col. [41] provaram a existência de sítios de alta e baixa afinidade de união medindo a quantidade de proteína marcada na presença de quantidades variáveis de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), um agente quelante forte para íons de ^{99m}Tc . Estes autores sugeriram que os sítios de alta afinidade estavam relacionados com a presença destes grupos sulfúricos.

O uso de Sn (II) para reduzir a cisteína está reconhecido há muitos anos e pode ser usado para reduzir as pontes dissulfídricas das proteínas e para protegê-las da reoxidação. Rhodes e col. [34] demonstraram esta hipótese utilizando anticorpos marcados com ^{125}I que

logo foram reduzidos e quantificaram a união em fase sólida em um gel que unia grupos tióis. Os autores encontraram que a incubação com Sn reduz as pontes dissulfídicas e estimaram em 4% esta redução. Estes valores foram achados também por outros investigadores [35].

Mather e Ellison [42] estudaram a redução de pontes dissulfídicas usando 2-mercaptoetanol e encontraram que um incremento na redução estava acompanhado por um incremento na eficiência de marcação. Usaram-se diversos agentes redutores da proteína tais como ditioneitol, mercaptoetanol, ácido ascórbico, etc. e também vários agentes redutores do ^{99m}Tc tais como ditioneitol sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), borohidreto de sódio, dimetilformamida, azida sódica em meio HCl e refluxo, entre outros.

Com respeito aos complexos intermediários do ^{99m}Tc e a marcação por transquelação tem-se usado diversos agentes tais como glucoheptonato, tartarato, pirofosfato, metilendifosfonato (MDP) e vários análogos que servem de ligantes de transferência para marcar anticorpos após a redução dos mesmos.

A principal vantagem do método direto, é sua simplicidade e a possibilidade de desenvolver formulações liofilizadas, prontas para marcar em apenas uma etapa e serem utilizadas no diagnóstico por imagens em centros de Medicina Nuclear.

1.5.1.2 Marcação indireta

Nos métodos indiretos de marcação de anticorpos o ^{99m}Tc é coordenado por meio de um agente quelante sintético, o qual pode ser conjugado a imunoglobulina, antes ou depois do processo de radiomarcação. A marcação de compostos bioativos com ^{99m}Tc requer então a conjugação a um agente quelante bifuncional. Este agente contém em sua estrutura um grupo funcional através do qual pode-se unir covalentemente a um composto bioativo, sendo as uniões de diferentes tipos por exemplo amida, tiouréia, éster ou também carbono-carbono. A segunda condição é que deve-se ter um grupo doador de átomos de tal modo a poder formar um complexo estável com ^{99m}Tc [39].

Esta técnica está sendo utilizada atualmente também para marcar peptídeos, agentes de união a receptores e outras moléculas bioativas. Utilizam-se geralmente dois esquemas de marcação: um primeiro que usa um quelato pré-formado marcado, o qual é conjugado ao composto bioativo ou um segundo esquema no qual se realiza a marcação imediata da conjugação [39].

No primeiro caso, os primeiros desenvolvimentos de marcação utilizaram o DTPA, conjugado às proteínas por meio de diversos derivados, como por exemplo o anidrido bicíclico. Também usaram derivados da bis-N-metil semicarbazona. Em ambos os casos observaram-se problemas de baixos rendimentos de marcação específica com o ^{99m}Tc e união de colóides ao anticorpo [39].

Para evitar este inconveniente Fritzberg e col. [43] desenharam a técnica de quelato pré-formado marcando um quelato do tipo N_2S_2 formando-se um complexo estável de ^{99m}Tc em um estado de oxidação +5. Posteriormente se forma um éster ativo o qual é finalmente conjugado ao anticorpo. Este processo é lento e requer purificações dos intermediários e do conjugado final marcado. Tem-se realizado modificações desta técnica, usando ligantes tipo N_3S mercaptoacetil triglicina (MAG3), ou preparando outros ésteres ativos. No entanto, dificilmente podem-se adaptar estas técnicas para usá-las em um serviço de Medicina Nuclear.

Com respeito à marcação pós-conjugação se tem desenvolvido agentes biquelantes que permitem uma marcação pós-conjugação. Estes compostos podem unir-se ao composto bioativo e logo marcar este conjugado por agregação de um complexo fraco de ^{99m}Tc tal como o ^{99m}Tc -gluconato.

Entre as técnicas que empregam este método pode-se citar a de Abrams e col. [44] no qual o quelante hidrazina-nicotinamida está unido covalentemente à proteína e o ^{99m}Tc é agregado ao sistema como um complexo com o gluconato. Usando este quelante N-hidroxisuccinimidil 6-hidrazinonicotinato (S-Hynic), geralmente através de um ligante se tem marcado anticorpos com sucesso com ^{99m}Tc , resultando em uma marcação estável tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.6 O Anticorpo e o Sistema Imune [45, 46]

O sistema imune relaciona-se à sobrevivência de qualquer organismo multicelular. Reconhece, destrói ou elimina substâncias nocivas. Tem a capacidade de reconhecer substâncias estranhas entre as quais microorganismos como vírus, bactérias, fungos, parasitas ou seus fragmentos que podem agir como antígenos. Algumas vezes um desses agentes pode invadir uma célula, causar trocas na membrana celular e se a membrana alterada for reconhecida pelo organismo e identificada como estranha desencadeará uma resposta imune. As substâncias capazes de desencadear uma reação do sistema imunológico são

denominadas antígenos. Um antígeno capaz de despertar uma resposta imune específica é chamado de imunógeno.

A resposta imune resulta na geração de moléculas de anticorpos, proteínas globulares denominadas imunoglobulinas. As imunoglobulinas são grupos de moléculas altamente heterogêneas presentes nos fluidos circulantes do corpo em estado de equilíbrio dinâmico entre compartimentos intra e extra vasculares. Existem 5 classes de imunoglobulinas (conhecidas como isotipos), cujas moléculas diferem entre si no tamanho, na composição de aminoácidos, no conteúdo de carboidratos e na carga elétrica:

- ❖ IgM – é a maior imunoglobulina sintetizada durante a exposição inicial com o antígeno, representa 5 a 10% das imunoglobulinas totais, possui 10 sítios de ligação com o antígeno e não possui subclasses. É útil no diagnóstico diferencial das infecções virais ou parasitárias agudas.
- ❖ IgG – é produzida durante a segunda e subsequente exposição com o antígeno, é a principal imunoglobulina presente na circulação dos fluidos corpóreos, respondendo por cerca de 70 a 75% do total de imunoglobulinas. É o anticorpo mais importante da resposta imune secundária. A IgG apresenta quatro subclasses distintas: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, que possuem quatro cadeias pesadas, similares, porém não-idênticas, já que apresentam diferenças em suas propriedades, tais como número de pontes dissulfídicas e seqüências de aminoácidos diferentes.
- ❖ IgA – presente predominantemente nos fluidos secretores (saliva, lágrimas, secreções nasais, colostro, leite, secreções traqueobrônquicas e gastrointestinais), tem papel importante na proteção do organismo contra microorganismos patogênicos. Representa cerca de 10 a 15% das imunoglobulinas totais. Possui duas subclasses: IgA1 e IgA2.
- ❖ IgE – encontrada na circulação dos fluidos corpóreos por apenas alguns minutos. Tem um papel importante na imunidade ativa contra parasitas e nas doenças alérgicas.
- ❖ IgD – encontrada na circulação dos fluidos corpóreos por alguns minutos. Representa menos de 1% das imunoglobulinas. Sua função biológica não é bem conhecida.

A estrutura geral de uma molécula de imunoglobulina (monômero) consiste de quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H), sempre em pares idênticos, unidas por pontes dissulfídicas formando uma proteína globular em forma de Y, como mostra a FIG. 4.

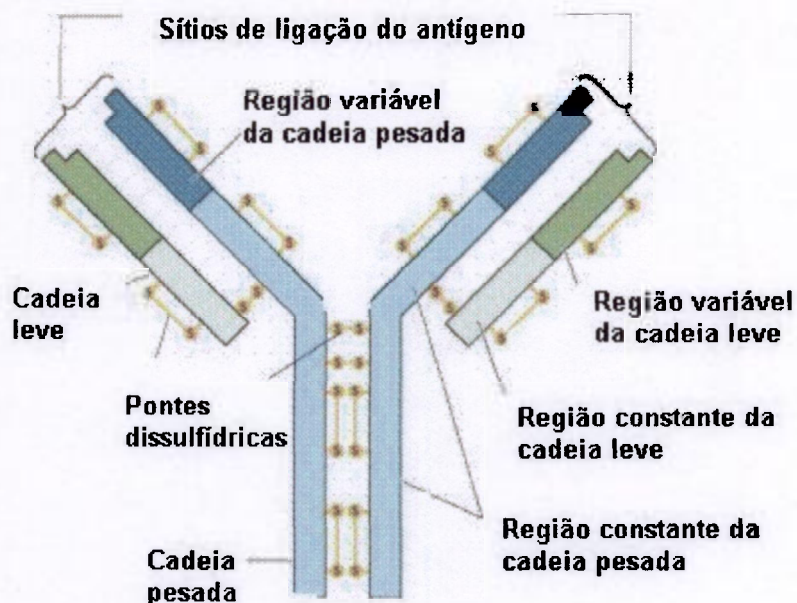


FIGURA 4 – Estrutura geral de uma molécula de anticorpo [47].

As cadeias leves (L) são menores e comuns a todas as classes de imunoglobulinas e as cadeias pesadas (H) possuem um alto peso molecular, contêm cerca de 440 aminoácidos e são maiores, com estruturas distintas em cada classe ou subclasse. Tanto as cadeias pesadas quanto às cadeias leves possuem regiões variáveis e regiões constantes. Na região variável localiza-se o sítio combinatório onde se dá a ligação antígeno-anticorpo, o qual é ligação muito específica tipo “chave-fechadura”, cada anticorpo só se liga ao antígeno correspondente. Usando tratamento enzimático a molécula de imunoglobulina pode ser quebrada em várias partes produzindo o que se convencionou chamar de fragmentos. Clivagens com proteases como papaína resulta em 2 fragmentos Fab e 1 Fc e o uso de pepsina resulta em 1 fragmento $F(ab')_2$ e 1 pFc, como mostra a FIG. 5. [48]

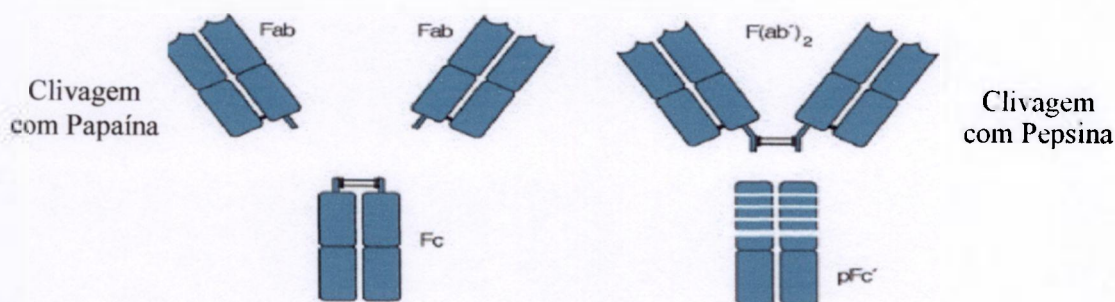


FIGURA 5 – Fragmentos resultantes da clivagem do anticorpo intacto com proteases [48].

A porção (ou fração) Fab da molécula de anticorpo é a que contém o sítio de ligação ao antígeno, possui uma cadeia leve e parte de uma cadeia pesada. A porção Fc é a responsável pela ligação do anticorpo aos receptores nas células [48].

1.7 Aplicação de anticorpos monoclonais em Medicina Nuclear

A administração de anticorpos radiomarcados com propósitos diagnósticos não é um conceito novo. Surgiu em torno de 1945 com o início da Medicina Nuclear [42]. Historicamente, o trabalho inicial de Pressman e col. [49] revelou métodos de incorporação do radioiodo dentro de anticorpos policlonais, e a subsequente utilização de antisoro policlonal radiomarcado contra sarcoma osteogênico para definir a detecção gama externa de tumor de animal foi de suma importância. Contudo a aplicação desses reagentes ficou prejudicada pela limitação de métodos imunológicos, incluindo a preparação de anticorpos, e preparação de antígenos, associados a tumor, bem definidos [50].

Em princípio a produção de anticorpos monoclonais poderia ser alcançada pelo isolamento e cultura de clone. Na prática esse processo é inviável, pois os linfócitos B são células que não se mantêm em cultura por mais de alguns dias.

Em 1975 Köhler e Milstein [51] encontraram uma forma original para contornar o problema e publicaram resultados de seu trabalho descrevendo a produção de linhagens de células de “hibridoma” capazes de produzir anticorpos monoclonais [10,52]. Em lugar de cultivar linfócitos promoveram a fusão dos linfócitos B com células neoplásicas de mieloma. O anticorpo monoclonal é produzido por um hibridoma da fusão celular entre células de baço obtidas de um camundongo imunizado e células de um mieloma de rato para dar imortalidade à linhagem de célula. A melhor linhagem de célula de anticorpo produzida no hibridoma é selecionada, como mostra o esquema representado na FIG. 6. As células híbridas resultantes, possuem as mesmas características das células parentais, sintetizam anticorpos e mantêm-se em cultura por tempo indeterminado. Este é um procedimento lento e difícil. Estes anticorpos são monoclonais, pois resultam da proliferação e secreção de um único clone de células [53, 54].

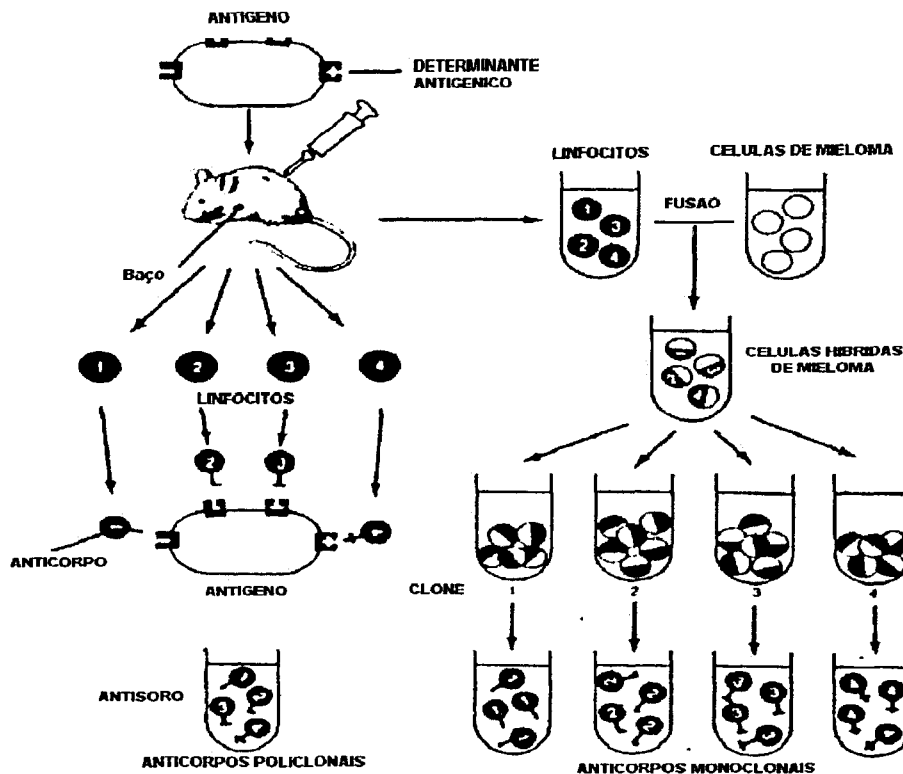


FIGURA 6 - Esquema da preparação de anticorpos policlonais e monoclonais [55].

A chegada da tecnologia de hibridoma permitiu a produção de uma grande quantidade de anticorpos monoclonais com alta especificidade para antígenos associados a tumores. A característica de poder carregar radionuclídeos especificamente para células ou órgãos, possibilitou a produção de radiofármacos altamente específicos e foi o começo de uma nova era no radioimunodiagnóstico. A vantagem do anticorpo monoclonal está na sua homogeneidade e especificidade para os antígenos imunizantes. Seu papel em oncologia depende da premissa de diferir tecidos cancerosos de tecidos normais de modo que possa ser explorado para imagem e terapia [53].

Tanto anticorpos de origem murina (anticorpos monoclonais produzidos em camundongos), quanto de origem humana tem recentemente sido desenvolvidos para reconhecer e interagir com antígenos específicos. Devido a sua diversidade, especificidade e atividade biológica, esses anticorpos são agentes potencialmente ideais para uma variedade de aplicações em doenças benignas e malignas. Por exemplo, há uma variedade usada clinicamente para teste *in vitro* (radioimunoensaio); *in vivo* para detecção precoce e estadiamento de doença; como veículo para liberação na terapia (radioimunoterapia); e para

avaliação da eficácia de intervenções (radioimocintilografia). A especificidade do anticorpo é governada pelas regiões variáveis das cadeias leves e pesadas da molécula. As funções efetuadas pelo anticorpo são determinadas pela estrutura da região constante, principalmente dentro da porção Fc da molécula [56].

O primeiro estudo clínico com anticorpos monoclonais radiomarcado foi reportado em 1981 por Mach e col. [57], que usaram anticorpos anti-CEA marcados com ^{131}I em pacientes com carcinomas de cólon e pancreático que expressavam CEA. Resultados destes e outros estudos mostraram somente sensibilidade um pouco melhor do que estudos similares com anticorpos policlonais anti-CEA. Posteriormente, Larson e col. [58] demonstraram maior sensibilidade com anticorpos anti-mieloma e fragmentos Fab, e Moldofsky e col. [59] usaram fragmentos $\text{F(ab}')_2$ marcados com ^{131}I para imagem metastática de carcinoma de cólon em linfonodos retroperitoneal que não foram detectados por outras modalidades diagnósticas tais como tomografia computadorizada [55].

Um agente específico para imagem de câncer, incluindo diagnóstico, detecção, estadiamento e avaliação da resposta à terapia, é de grande interesse. Anticorpos monoclonais radiomarcados tem se mostrado promissores para o diagnóstico e terapia de câncer [60] e seu uso trouxe um grande avanço experimental e clínico no campo da oncologia. A principal exigência desta metodologia é a disponibilidade de radiofármacos estáveis que após a marcação *in vivo* retenham a capacidade de interação específica com o antígeno definido e mantenham a sua integridade molecular. Nos estudos pós-marcação a imunorreatividade é um parâmetro crítico. É necessário o desenvolvimento de métodos seguros de avaliação da imunorreatividade, percentual de anticorpo marcado que é associado ao antígeno específico.

Radioimunodiagnóstico com anticorpos monoclonais radiomarcados tem ajudado a detectar doenças em seu estágio precoce e a reduzir a mortalidade.

As técnicas convencionais de diagnóstico: radiologia convencional (raios-X), tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética nuclear (RMN) e ultra-sonografia (US) proporcionam alta qualidade de detalhes estruturais ou anatômicos [61], detectam o tumor pelos seus atributos físicos (tamanho, forma, posição e deslocamento de outros tecidos), pois não possuem sensibilidade e especificidade para detectar algumas doenças. Já as técnicas usadas em medicina nuclear (MN) demonstram as neoplasias pelo seu metabolismo ou pelo metabolismo nos tecidos circunvizinhos [52]. A diferença dos agentes de contraste usados nas técnicas de TC, RMN e MN está exemplificada na TAB. 1.

TABELA 1 - O uso de agentes de contraste de imagem [62].

	Instrumento	Anatomia	Perfusão do tecido	Processo bioquímico
Radiofármaco	MN	Alguns casos	Sim	Sim
Contraste iodado	TC	Sim	Não	Não
Contraste paramagnético	RNM	Sim	Não	Não

Em virtude de sua alta especificidade no alvo estes anticorpos têm uma promessa considerável para a detecção de sítios de tumor primário e metastático e na imagem de várias condições benignas como por exemplo a avaliação do dano no tecido no infarto agudo do miocárdio ou lesões inflamatórias [63].

Os principais isótopos empregados para a marcação de anticorpos, para diagnóstico, são: ^{111}In , ^{131}I , ^{123}I e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A marcação com ^{111}In é feita por métodos de marcação indireta empregando quelantes bifuncionais que funcionam como uma ponte entre o anticorpo e o isótopo, proporcionando uma marcação eficiente e estável. Entretanto, além do alto custo e do fato do ^{111}In não ser produzido no Brasil, o procedimento é demorado e complexo, com freqüente necessidade de remoção de impurezas químicas ou radioquímicas após a marcação. A marcação por iodação é feita pela substituição direta do hidrogênio de aminoácidos aromáticos ou com menor freqüência pela conjugação indireta. Entretanto a marcação com iodo nem sempre é estável *in vivo*, ocorrendo dehalogenação espontânea ou por ação enzimática. Outras desvantagens estão relacionadas às características físicas dos isótopos. O ^{131}I tem maior disponibilidade e menor custo, entretanto com meia-vida física longa (8,02 dias) e, além da radiação gama com energia de 364 keV, emite radiação beta (levando a alta dose de radiação para o paciente e imagens com baixa resolução). O ^{123}I tem características físicas adequadas (meia-vida física de 13 horas e radiação gama com energia de 159 keV), que permitem menor dose de radiação e imagens de boa qualidade [27]. Devido o início relativamente recente de sua produção e seu alto custo não possui um grande alcance para a classe médica. A marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ será descrita posteriormente.

1.7.1 Anticorpo policlonal versus anticorpo monoclonal [45]

Quando anticorpos são derivados de uma população estimulada por linfócitos B e suas células plasmáticas filhas, o termo anticorpo policlonal é aplicado. Todavia, se células plasmáticas ou linfócitos individuais podem ser extraídos e clonados em cultura de tecido, cada clone terá um potencial para produzir uma espécie única de molécula de anticorpo, ou um anticorpo monoclonal.

Ambos, anticorpos poli e monoclonais, possuem propriedades específicas para uma situação particular (TAB. 2).

TABELA 2 - Diferenças entre anticorpo policlonal e monoclonal.

Item	Anticorpo Policlonal	Anticorpo Monoclonal
Origem	Soro de animal imunizado.	Células de hibridoma (linfócito-mieloma) de camundongo.
Quantidade	Relativamente pequena. Utiliza-se um grande número de animais de laboratório.	Praticamente ilimitada.
Composição	Contém mistura de anticorpos com afinidade e correlação variando de animal para animal, de sangria para sangria.	Proteína homogênea monoespecífica.
Vantagens	A sua produção é relativamente fácil.	Produzido através de hibridoma. Alto grau de confiança e reprodutibilidade.
Aplicação	Radioimunoensaio.	Imunohistoquímica, imunodeteção, imunoterapia.

1.7.2 Anticorpo monoclonal ior-CEA 1

Os tumores colorretais se encontram entre os cânceres mais freqüentes tanto em homens como em mulheres e a imunogamagrafia pode ser de grande importância em seu diagnóstico. O antígeno carcinoembriônico (CEA) tem sido estudado amplamente desde sua descoberta e é considerado como um marcador tumoral bem estabelecido para propósitos diagnósticos e terapêuticos em várias neoplasias incluindo câncer gastrointestinal [64], mama e pulmão, sendo um dos mais importantes entre os antígenos associados a tumores. Tem um importante papel no diagnóstico de recorrências e metástases destes tumores [65].

Como um antígeno associado a tumor, CEA é extensivamente expressado em mais de 95% em carcinomas coloretal, gástrico e pancreático assim como aproximadamente 70% de

câncer de pulmão de células não pequenas, 50% de câncer de mama, em carcinoma de ovário, adenocarcinoma de pênis e adenocarcinoma endometrial. Também é encontrado em câncer medular de tireóide [65, 66].

O CEA é uma glicoproteína composta [67], que foi inicialmente isolada por Gold e Freedman em 1965. Seu peso molecular é de 180 – 200 Kda [68]. Tem um alto conteúdo de carboidrato (40 - 75%) e contém múltiplos domínios de imunoglobulina. É uma molécula de adesão celular e um membro de uma larga e fechada família supergene relatada de moléculas que compartilham muitos epitopos comuns. Estudos recentes em roedores tem mostrado que CEA pode estar diretamente envolvido num processo de transformação maligna por bloquear a diferenciação terminal em mioblastos de roedores *in vitro*. CEA é super expressado em uma grande variedade de malignidades humanas, incluindo câncer de cólon [68, 69].

O anticorpo anti-CEA designado ior-CEA 1, é um anticorpo monoclonal murino, isotipo IgG1, que age diretamente contra o CEA expressado em diferentes neoplasias especialmente aquelas do trato gastrointestinal (câncer coloretal) [60].

O anticorpo é diretamente marcado com ^{99m}Tc via grupos sulfidrilas. Uma vez injetado dentro do corpo, ^{99m}Tc -ior CEA1 age como um veículo de liberação no tumor, especialmente liberando radioatividade às células do câncer que expressam CEA e permitindo que o tumor seja visualizado através de uma gama-câmara. Reage com muitos tumores do trato gastrointestinal, rins e pulmão e com todos tumores de mama. Todavia, não reage com tumores neurais humanos, derivados hematopoiéticos ou sarcomatosos ou em vários outros derivados de malignidades epiteliais [60].

1.7.3 Anticorpo monoclonal ior-EGF/R3

Apesar dos avanços na terapia antitumoral, o câncer de origem epitelial é o 1º das principais causas de morte mundial. Tem-se relatado que os tumores de origem epitelial representam mais de 80% de todas as neoplasias, tais como câncer de pulmão de células não pequenas, trato digestivo, mama e outros, e tem cem vezes mais expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) do que em tecidos normais. Este fato está relacionado com a malignidade e um pior prognóstico da doença [7].

O receptor do fator do crescimento epidérmico humano (hEGF-r) é uma glicoproteína transmembrana de 1186 aminoácidos com peso molecular de 170 Kda, o qual contém um domínio extracelular de ligação EGF, um domínio transmembrano e um domínio

citoplasmático, o qual tem atividade da tirosina kinase e recebe autofosforilação sobre a ligação do ligante [70].

A superexpressão do EGF-R tem sido encontrada em uma variedade de tumores malignos epiteliais em vários órgãos como a mama, bexiga, pulmão, cabeça e pescoço e gliomas [71]. EGF-R é expressado sobre as células derivadas de três linhagens, mas caracteristicamente sobre as células de origem epitelial, incluindo carcinomas malignos [72].

A ocorrência do EGF-R em malignidades humanas tem sido estudada extensivamente e em vários tipos de tumores o estado do EGF é um importante indicador prognóstico. Muito notavelmente, em carcinoma de mama, alta expressão do nível do receptor é associada com recorrência da doença, cirurgia reduzida e a presença de metástases. Todavia, há uma correlação inversa entre os níveis do receptor de osteogen e níveis de EGF-R. Associações similares ocorrem para carcinomas de ovário, bexiga, gástrico e escamoso de pulmão [73].

Mais de um terço de todos os tumores sólidos tem mostrado expressar EGF-R (TAB. 3). A expressão do EGF-R pode prognosticar uma sobrevivência pobre e/ou estágio mais avançado da doença. Sua presença em modelos pré-clínicos de câncer humano está freqüentemente associada com extensão metastática. Expressão do EGF-R por células de carcinoma de cólon humano tem mostrado correlação direta com sua habilidade para produzir metástases hepáticas em camundongos nude [74].

TABELA 3 – Tumores que expressam o receptor EGF-R [74].

Tipo do tumor	Média de tumores expressando EGF-R (%)
Cabeça e pescoço	80-100
Colorectal	25-77
Pancreático	30-50
Pulmão	40-80
Esôfago	71-88
Célula renal	50-90
Próstata	40-80
Bexiga	53-72
Cervical	54-74
Ovário	35-70
Mama	14-91
Glioblastoma	40-50

O anticorpo ior-EGF/R3 é um anticorpo monoclonal murino, isotipo IgG_{2a} que se liga ao domínio externo do EGF-R. Tem sido usado com sucesso no diagnóstico de tumores de

origem epitelial [71, 75]. O anticorpo reconhece um epítipo localizado no domínio extracelular do hEGF-R. A sua imunorreatividade está determinada por sua união a células tumorais malignas que expressam o antígeno contra o qual este está dirigido [76].

1.8 Revisão Bibliográfica: Marcação de anticorpos monoclonais com ^{99m}Tc

Baum et al. (1989) [77] realizaram estudos cintilográficos em 20 pacientes com diferentes tumores produzindo o antígeno (Ag) CEA usando o anticorpo (Ac) BW 431/26, que reconhece o Ag CEA, marcado com ^{99m}Tc . O kit continha 2,0 mg de BW 431/26, 1,5 mg de hidrogenofosfato disódico, 2,9 mg de ácido propano tetrafosfônico e 0,12 mg de SnCl_2 . Foi usado 1,11 GBq de ^{99m}Tc para marcação do kit e o tempo de reação foi de 5 minutos. A porcentagem de Ac marcado foi maior que 95% e a cintilografia realizada nos tempos de 1, 6, 12 e 24 horas.

Mather e Ellison (1990) [42] analisaram três tipos de Ac: H17E2 – tumor testicular e ovário, PR1A3 – estudo de câncer coloretal e SM3 – reconhece epítipo sobre a mucosa epitelial rugosa e usaram o método de marcação direta com ^{99m}Tc . Estudaram a influência do redutor 2-mercaptoetanol (2-ME), usando um excesso molar numa média de 100:1 a 2000:1 (2-ME:Ac), na formação dos grupos –SH. Determinaram que aumentando a razão do mercaptoetanol ao Ac na mistura de reação faz aumentar o n° de grupos –SH aparentes e também, a eficiência de marcação final quando preparações do Ac reduzido em solução foram marcadas com ^{99m}Tc com 10 minutos de reação. Para a razão de 1000:1 (2-ME:Ac), 90% de eficiência de marcação foi conseguida e redução de 70% dos grupos –SH.

Pak et al. (1992) [78] prepararam vários fragmentos de Ac e marcaram usando um d-glucarato como ligante de transferência. Para realização da marcação, eles adicionaram uma solução de Ac (contendo 2,0 mg/mL de Ac em fosfato de sódio 50 mM, NaCl 100 mM e EDTA 1mM em pH 6,5) a um kit de glucarato previamente marcado com ^{99m}Tc . Foram usados volumes iguais das duas soluções e a marcação feita a temperatura ambiente com 30 minutos de reação. Detectaram de 3 - 4 grupos -SH por cada isotipo de Ac. A porcentagem de ^{99m}Tc ligado à proteína no ensaio de cisteína (1 mM) após 1 hora a 37°C foi 48,50% \pm 7,78, 82,05% \pm 5,59 e 34,00% \pm 8,49 para os fragmentos, IgG1, IgG2a e IgG3, respectivamente. Estes resultados confirmaram a importância dos grupos sulfidrilas na ligação ao ^{99m}Tc .

Ferro-Flores e Lezama-Carrasco (1994) [79] reduziram o Ac monoclonal ior-CEA-1 (contra Ag carcinoembrionário) e prepararam kits usando 7,0 mg de etano-1-hidróxi-

1,1-difosfonato (HEDP) e 0,5 mg de cloreto estanoso. Concentrações equivalentes de 0, 5, 10, 15, 25, 50 e 100 µl dessa solução foram adicionados a 2 ml de solução de Ac (1,5 mg/mL) e a liofilização ocorreu por 24 horas. A estabilidade foi estudada após 0, 2, 5, 15, 20, 30 minutos e 1, 2, 3, 4 e 24 horas após reconstituição com 185 – 1480 MBq de ^{99m}Tc . Imagens planares e de SPECT foram feitas após 6-8 horas e 20-28 horas. Os autores constataram que quando pequena quantidade de solução de HEDP era usada, baixa eficiência de marcação era obtida sendo a presença de Sn e do ligante fraco insuficientes para reduzir por completo o pertecnetato e realizar a troca de ligantes respectivamente. Aumentando a quantidade de HEDP a eficiência de marcação do Ac é favorecida e a melhor eficiência de marcação obtida foi 98,8%. Durante os 30 minutos após a preparação a pureza radioquímica foi aumentada e após 4 horas permaneceu inalterada. Após 24 horas a média de Ac marcado caiu de 98,8 para 91%. Nenhuma reação adversa ou mudanças clinicamente significantes foram detectadas.

Castiglia et al. (1994) [30] usaram o agente redutor ditiotreititol (DTT) para reduzir o Ac B2C114 (contra Ag carcinoembriônico). O resultado ótimo de marcação foi obtido na razão de 800:1 e 1000:1 (DTT:Ac). O número de grupos -SH gerado nessas razões molares em 20 minutos de reação foi $3,5 \pm 2,5$. O Ac foi marcado na forma de solução com 700 – 800 MBq de ^{99m}Tc a temperatura ambiente por 20 minutos de reação. A porcentagem de ^{99m}Tc ligado à proteína foi $90 \pm 2,5\%$ com uma concentração de 7,5-9,0 µg de fluoreto de estanho (SnF_2) e 32 µg de MDP.

Gooden et al. (1995) [29] usaram os Ac HMFG1 (câncer de origem epitelial), H17E2 e PR1A3 para realização de radioimunocintilografia em 22 pacientes. A eficiência de marcação obtida na marcação dos Ac foi maior que 98%. O nível do marcado no tumor foi maior do que nos outros órgãos, com exceção do sangue.

Iznaga-Escobar et al. (1996) [80] desenvolveram um programa de computação para quantificação dos grupos -SH baseado em uma curva padrão de cisteína. Para isso reduziram os Ac ior CEA-1, ior C5 (reconhece um Ag expresso no epitélio do trato gastrointestinal) e ior egf/r3 (contra o receptor do fator do crescimento epidérmico). O nº de grupos -SH encontrado para o CEA foi $5,7013 \pm 0,0157$ -SH por molécula de anticorpo (15,3% do total), $4,4660 \pm 0,0140$ (12,5% do total) para o C5 e $7,3749 \pm 0,0149$ (22,16% do total) para o egf/r3.

Iznaga-Escobar et al. (1996) [81] analisaram várias razões molares para determinar a que formou mais grupos -SH. Os Ac ior-CEA 1 e ior-egf/r3 foram usados em solução para este estudo. O nº de grupos -SH gerados para o ior-egf/r3 foram: razão molar de 250:1 (2-

ME:Ac) - 1,12 SH/mol, 500:1 - 2,02 SH/mol, 1000:1 - 4,9 SH/mol, 2000:1 - 6,65 SH/mol, 4000:1 - 9,19 SH/mol e 8000:1 - 9,13 SH/mol. Para o ior-CEA 1 foi encontrada uma média de $5,51 \pm 0,28$ grupos SH/mol de Ac, 15,3% do total de 36 grupos SH/mol disponíveis em uma molécula de IgG, com isso a eficiência de marcação foi de 98%. Para o Ac ior-egf/r3 foi $6,65 \pm 0,69$, 18,5% do total de grupos disponíveis, obtendo 98,2% de rendimento de marcação.

Karube et al. (1996) [82] realizaram um estudo cintilográfico em camundongos nude atímicos com tumor para comparação dos Ac F11-39 (Ac monoclonal) e ChF11-39 (Ac quimérico) contra Ag carcinoembriônico. Adicionaram 55,5 MBq de ^{99m}Tc à solução de Ac e incubaram por 10 minutos. As imagens foram obtidas em uma gama-câmara equipada com um colimador de alta resolução posicionado no dorso do camundongo e coletada usando um computador digital. Foi necessária uma razão de 3000:1 de 2-ME para uma eficiência de marcação maior que 95%. Durante uma hora de incubação com cisteína, $8,8 \pm 2,5\%$ de ^{99m}Tc -F11-39 e $22,2 \pm 3,8\%$ de ^{99m}Tc -ChF11-39 foram removidos por cisteína. Com uma projeção posterior após 9 horas foi visto na imagem o tumor, fígado e coração e após 19 horas o tumor, fígado e bexiga.

Stalteri e Mather (1996) [83] marcaram os Ac PR1A3 e SM3 com ^{99m}Tc , reduzidos pelo método de fotoativação usando um reator fotoquímico. A eficiência de marcação obtida foi maior que 95%. Razões entre 11 e 32 μg de estanho por mg de Ac resultaram em uma eficiência maior que 95% de marcação. Concentrações de Ac de 0,5 mg/mL ou maior foram necessárias para boa marcação (98%). Realizando incubação do Ac marcado a temperatura ambiente, após 24 horas o rendimento foi de 95% e após 48 horas foi de 93%.

Oliva et al. (1997) [84] estudaram o caso de uma paciente com câncer de mama avançado realizando radioimunocintilografia com Ac ior-egf/r3. A massa de 3 mg desse Ac foi marcado com 2,2 GBq de ^{99m}Tc e foi administrado intravenosamente (iv) no braço oposto ao sítio do tumor. Imagens precoces e tardias foram obtidas do tumor mamário e cérebro 10 minutos e 18 horas depois da injeção. O estudo mostrou o tumor mamário principal e uma metástase cerebral desconhecida.

Morales Morales et al. (1998) [85] estudaram o efeito da concentração do Ac ior-egf/r3 (usado em solução) e a relação da quantidade do número de grupos -SH reduzidos com a variação da quantidade de agente redutor 2-ME. Verificaram que com a menor razão molar de 2-ME:Ac usada (250:1) o número de grupos -SH gerado foi de $1,12 \pm 0,17$ e para a maior

(8000:1) foi de $9,13 \pm 0,32$. Em relação à concentração de Ac, demonstraram que, quanto maior a concentração usada (2000 μg), maior foi a eficiência de marcação (99,5%).

Iznaga-Escobar et al. (1998) [86] marcaram kits do Ac humanizado R3, realizaram controle de qualidade e estudos de biodistribuição em camundongos e extrapolaram o resultado obtido para humanos. O kit continha 3 mg de Ac reduzido, 10 mg de glicose e 150 μL de MDP (50 μg), 3,4 μg de fluoreto estanoso e 20 μg de ácido p-aminobenzóico e foi reconstituído com 185 – 370 MBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, com 20 minutos de reação a temperatura ambiente. A eficiência de marcação obtida foi de $98,5 \pm 1,5\%$, com menos de 2% de colóide. A maior acumulação do produto marcado foi nos rins ($2,21 \pm 0,4\%$). Os resultados foram extrapolados para um humano de 70 kg e durante as primeiras 4 horas verificaram que a porcentagem de dose injetada por grama nos pulmões foi $2,087 \pm 0,250\%$, no fígado $1,080 \pm 0,050\%$ e nos rins $1,836 \pm 0,120\%$.

Morales Morales et al. (1999) [87] realizaram a redução do Ac ior-egf/r3 com um excesso molar de 2-ME de 2000:1 (2-ME:Ac), formularam kits contendo diferentes aditivos como glicose, sorbitol, manitol, sucrose, inositol e trehalose, e determinaram a eficiência de marcação em relação a estocagem e aos tipos de aditivos usados. Após a redução do Ac encontraram um n° médio de grupos $-\text{SH}$ (determinado pelo método de Ellman) de $6,65 \pm 0,69$ grupos por molécula de Ac. A eficiência de marcação encontrada ficou na média de 98,7% para o Ac reduzido e 98,5% para o kit. Em relação ao uso dos aditivos esses valores foram: $90,8 \pm 0,79\%$ (manitol), $92,5 \pm 2,11\%$ (sorbitol) e 97,5% (trehalose, glicose, sucrose e inositol). Com relação ao tempo de estocagem tiveram uma eficiência de marcação de 80% durante estocagem de 3 meses e o kit com glicose analisado após 1 ano teve 90% de rendimento.

Ramos-Suzarte et al. (1999) [76] fizeram estudos cintilográficos com o Ac ior-egf/r3 em solução marcado com 1,85 GBq de pertecnetato em 148 pacientes, sendo 126 com tumores do tipo carcinoma epidermóide, adenocarcinoma, carcinoma ductal, lobular, astrocitoma, glioma e outros tumores de origem epitelial e 22 negativos. Administraram uma dose de 3mg de Ac marcado com 1,85 GBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ com uma pureza radioquímica maior que 90%, que foi considerada satisfatória. A eficiência de marcação foi de $98,5\% \pm 2,1\%$, com 1,2% de tecnécio livre e menos de 1,5% de colóide. A radioimunocintilografia identificou 106

dos 126 pacientes com tumor e 22 dos 22 pacientes verdadeiro-negativo. A resposta HAMA detectada não foi significativa e foi uma condição transitória.

Morales-Morales et al. (2000) [27] compararam três tipos de Ac sendo eles o ior egf/r3 e ior C5 (monoclonais) e H-R3 (humanizado). Prepararam kits contendo 3 mg de Ac, 15 mg de glicose, 50 µg de MDP, 3,4 µg de estanho e 20 µg de ácido p-aminobenzóico que foram marcados com 1110 MBq de ^{99m}Tc a temperatura ambiente com 10 minutos de reação. O n° médio de grupos -SH foi $6,46 \pm 0,07$, $5,28 \pm 0,06$ e $6,08 \pm 0,02$ para egf/r3, H-R3 e C5, respectivamente. A eficiência de marcação foi de $99,35 \pm 0,35$, $99,21 \pm 0,42$ e $99,62 \pm 0,28$ para egf/r3, H-R3 e C5, respectivamente.

Perera et al. (2003) [7] marcaram o Ac h-R3, que tem afinidade pelo receptor do fator do crescimento epidérmico, usando o radionuclídeo ^{188}Re e comparando-o com ^{99m}Tc e avaliaram sua estabilidade *in vivo* e *in vitro*. Usaram 0,5 mg de Ac em solução para marcação com 185 – 222 MBq de ^{188}Re durante 3 horas de incubação e 1,0 mg de Ac em solução para marcação com 740 – 925 MBq de ^{99m}Tc durante 10 minutos de incubação, ambos marcados a temperatura ambiente. A pureza radioquímica dos radiofármacos foi maior que 97%.

1.9 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN): Situação atual no IPEN

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), órgão da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), é o centro no Brasil responsável pela produção e distribuição de radioisótopos e radiofármacos para uso em diagnóstico e terapia dentro da especialidade de Medicina Nuclear.

Em 1959 houve interesse da classe médica brasileira em utilizar o ^{131}I para diagnóstico da função tireoidiana e apesar da baixa potência de operação do reator IEA-R1, iniciou-se a produção deste importante radioisótopo. Novos produtos viriam posteriormente a ser lançados, tais como: ^{32}P , para tratamento da Policitemia Vera; ^{198}Au coloidal, para estudo do sistema retículo-endotelial e terapia de lesões malignas de grandes cavidades (peritoneal e pleural); ^{51}Cr , para marcação de eritrócitos e proteínas séricas, como também a produção de ^{35}S , ^{82}Br , ^{24}Na e ^{42}K .

A Medicina Nuclear no país teve grande desenvolvimento quando se iniciou em 1981 a produção de geradores de ^{99}Mo - ^{99m}Tc e foram preparados os primeiros conjuntos de reativos para marcar com ^{99m}Tc .

A existência de um ciclotron CV-28 instalado no final da década de 1970, possibilitou a partir de 1987 a produção de ^{67}Ga e a partir de 1992 a produção de ^{123}I . Em 1995 iniciou-se a produção rotineira de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ usado para alívio das dores causadas por metástases ósseas.

A instalação de um ciclotron com energia de prótons de 30 MeV, em 1998, permitiu a produção de ^{201}Tl (para estudos do miocárdio) e a produção regular de $^{18}\text{F-FDG}$ que vinha sendo preparado experimentalmente no ciclotron CV-28 desde 1997.

Iniciou-se em 2000 a produção de parte da demanda nacional de ^{131}I e a produção de ^{123}I ultrapuro, útil para obtenção de radiofármacos para receptores cerebrais e de outros compostos de interesse na medicina nuclear brasileira.

O IPEN desenvolve suas atividades produzindo conhecimentos científicos, desenvolvendo tecnologias, gerando produtos e serviços e formando recursos humanos. As pesquisas que estão sendo realizadas no Centro de Radiofarmácia fazem parte do Plano Diretor do instituto e entre elas está o estudo dos anticorpos monoclonais ior-CEA-1 e ior-EGF/R3 marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ vinculado ao projeto ARCAL LII: "Producción y control de calidad de radiofármacos basados en anticuerpos monoclonales", Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) – Viena.

As principais aplicações clínicas da imunocintilografia com anticorpos monoclonais são o estadiamento e avaliação das recidivas tumorais. A maioria dos autores aponta que a sensibilidade do método imunocintilográfico é maior que os métodos padrões de diagnóstico (80:60%).

Portanto, a disponibilização para a classe médica de um radiofármaco com esta especificidade para detectar estes tipos de tumores terá um grande alcance social.

2. OBJETIVOS

Os objetivos foram desenvolver e aperfeiçoar os processos de redução e purificação, as técnicas da radiomarcção e os procedimentos de controle de qualidade (radioquímico e imunorreatividade) dos anticorpos monoclonais ior-CEA-1 e ior-EGF/R3, utilizando o método simples, rápido e eficiente de marcação direta de anticorpo com ^{99m}Tc .

O resultado final foi a definição das condições de preparação de conjuntos de reativos liofilizados do ior-CEA-1 e ior-EGF/R3 para uma eficiente aplicação diagnóstica em Medicina Nuclear.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Infraestrutura e Equipamentos

Todos os procedimentos foram realizados nos laboratórios do Centro de Radiofarmácia (CR) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). Foram utilizados:

- Balança analítica, modelo M-220: Denver Instrument;
- Placa de aquecimento: Fisatom;
- Liofilizador, modelo Supermodulyo: Edwards;
- Liofilizador: Thermo Savant;
- Calibrador de doses, modelo CRMTM-35R: Capintec;
- Contador automático tipo poço, com cristal NaI (TI), modelo D5002 cobra II: Packard-Canberra;
- Espectrofotômetro UV-VISÍVEL, modelo U-2010: Hitachi Instruments;
- Espectrofotômetro UV-VISÍVEL, modelo DMS 80: Intralab S.A.;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE): Waters;
- Ultrassom, modelo T7: Thornton Inpec Eletrônica;
- Coluna para CLAE Protein-Pak Diol (OH) 10 μm 7,5 x 300 mm: Waters;
- Coluna PD-10 de Sephadex G25 médio: Amersham Pharmacia Biotech;
- Suporte cromatográfico: ITLC-SG fibra de vidro (Gelman) e Papel Whatman 3MM (Whatman);
- Vidraria adequada e filtros;
- Estufa: FABBE;
- Pipetas automáticas de 50 – 100 μL e 1 mL com pontas estéreis: Gilson;
- Cabine de fluxo laminar,
- Suporte universal e pinças universais para segurar a coluna.

3.2 Lista de Reagentes

- Anticorpo monoclonal ior-CEA-1: CIMAB - Cuba
1 mg/mL, lote 1999.04; 2 mg/mL, lote C9901; 2 mg/mL, lote P9901; 5 mg/mL, lote D0101; 5 mg/mL lote D0301
- Anticorpo monoclonal ior-EGF/R3: CIMAB – Cuba
10 mg/mL, lote 3305 – P9901; 5 mg/mL, lote 19405; 5 mg/mL, lote 820101; 5 mg/mL lote D0301; 4,8 mg/mL, lote AC0304
- 2-mercaptoetanol (2-ME): Bio Agency e Sigma
- Solução fisiológica estéril (SFE) (NaCl 0,9%): Sanobiol e JP Indústria Farm. S.A.
- Nitrogênio gasoso (> 99,9% pureza): White Martins
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), FR: Merck
- Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), grau de pureza p.a.: Merck
- Cloreto de Sódio (NaCl), grau de pureza p.a.: Merck
- Hidróxido de sódio (NaOH): Merck
- Água bidestilada: Purificador Milli-RX 45 – Millipore
- Conjunto de reativo liofilizado de MDP: IPEN
Composição A: 5 mg de ácido metilenodifosfônico (MDP), 1 mg de cloreto de estanho II dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 2 mg de ácido p-aminobenzóico; Composição B: 5 mg de MDP e 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Composição C: 5 mg de MDP, 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg de ácido ascórbico e 20 mg de pirofosfato de sódio decahidratado
- Gerador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc : IPEN-CNEN/SP (IPEN-TEC)
- Metiletilcetona (MEC): Synth (Labsynth)
- Etanol: Merck
- Hidróxido de amônia: F. Maia
- Soroalbumina humana (SAH), Albumina humana a 20% Immuno: Baxter
- Antígeno CEA, CEA \geq 95%: Scripps Laboratories
- Antígeno R3, Epidermal growth factor: Scripps Laboratories
- Soro fetal bovino: Cultilab
- Cloridrato de cisteína ($\text{C}_3\text{H}_8\text{CINO}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$): Merck
- Reagente de Ellman , 5,5'-Ditio-Bis (Ácido 2-nitrobenzóico): Sigma

3.3 Preparo das soluções

3.3.1 Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol/L pH 7,4

Para preparo da solução (A) pesou-se 5,516 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,2 mol/L) e dissolveu-se em 200 mL de água (H_2O) bidestilada; para a solução (B) pesou-se 14,19 g de Na_2HPO_4 (0,2 mol/L) e dissolveu-se em 500 mL de H_2O bidestilada. Foram misturados 95 mL de solução A, 405 mL de solução B e 9 g de NaCl para preparo de um litro de solução. O pH foi ajustado a 7,4 com solução de NaOH (2 mols/L).

3.3.2 Tampão Fosfato 0,1 mol/L pH 8,0 e 0,4 mol/L pH 7,0

Pesou-se 5,3 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 8,7 g de Na_2HPO_4 para preparo de um litro de solução de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0. Para preparo de 200 mL de solução de tampão fosfato 0,4 mol/L pH 7,0 foi pesado 11 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 11,36 g de Na_2HPO_4 . Para ajuste do pH das duas soluções foi usado NaOH (2 mols/L).

3.3.3 Soluções de cisteína

Foi preparada uma solução mãe de cisteína com concentração de 10 mg/mL (83 mmol/L), para realização do teste de desafio a cisteína. Foi pesado 100 mg de cisteína para 10 mL de tampão fosfato 0,4 mol/L pH 7,0. Foram feitas diluições para se obter as seguintes concentrações milimolares: 8,3, 0,83, 0,083 e 0,0083.

Para o teste de Ellman preparou-se uma solução de 1,0 mmol/L, pesando 88 mg de cisteína para 500 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0. As diluições feitas para construção da curva padrão foram: 0,75, 0,5 e 0,25 mmol/L.

3.3.4 Reagente de Ellman

O reagente de Ellman foi preparado em uma concentração de 0,3 mg/mL, usando 3,0 mg de reagente de Ellman para 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0.

3.4 Procedimento Experimental

Todos os procedimentos foram baseados a princípio no protocolo modelo realizado em uma reunião dos coordenadores do projeto ARCAL LII [88] de acordo com a FIG. 7.

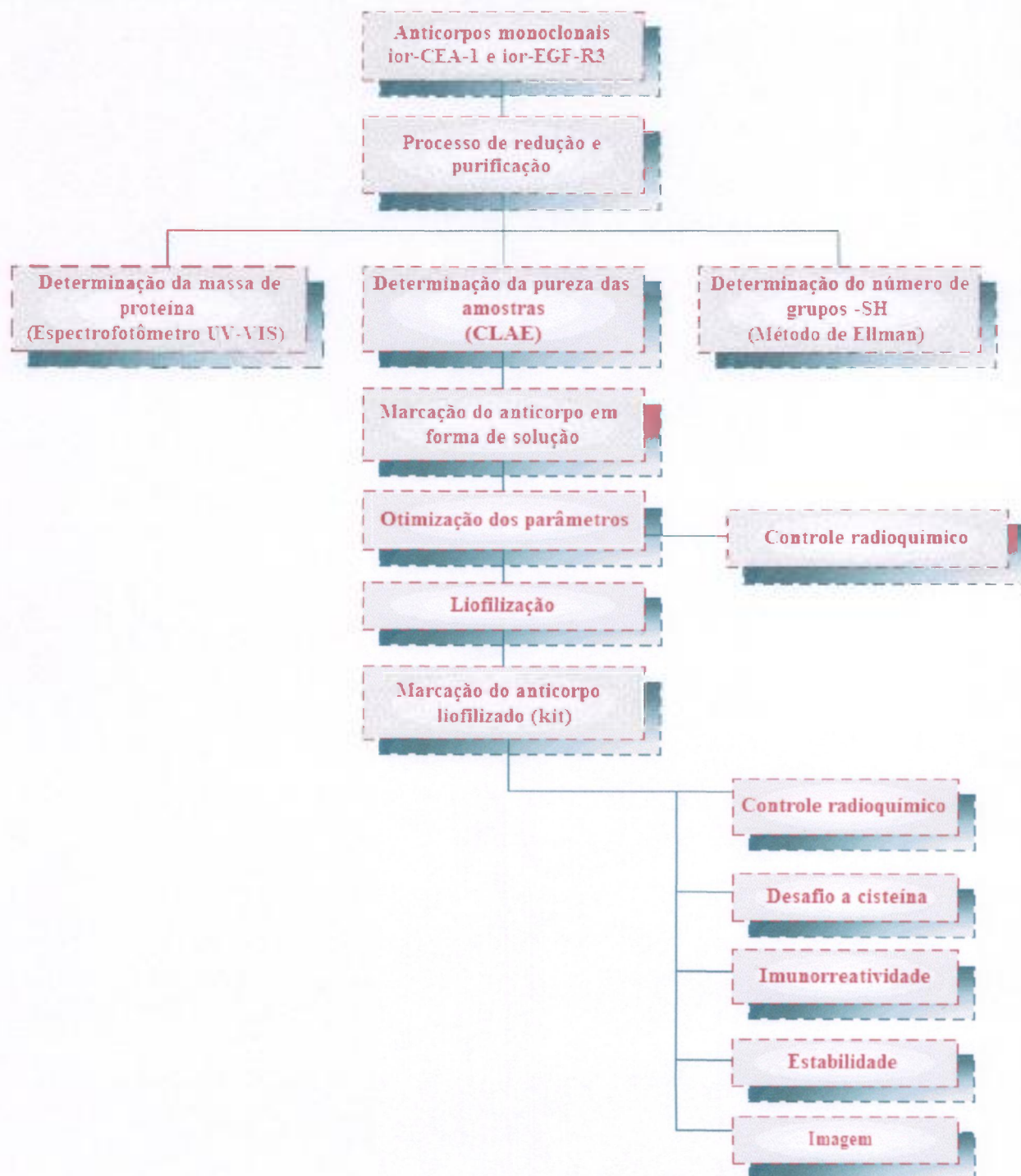


FIGURA 7 - Fluxograma da metodologia aplicada.

3.4.1 Processo de redução e purificação dos anticorpos

Um esquema geral de redução do anticorpo é mostrado na FIG. 8. Pontes dissulfídicas dentro da molécula de anticorpo foram quebradas pelo uso do agente redutor 2-ME e convertidas em grupos livres -SH. Seguindo uma purificação subsequente, o anticorpo reduzido resultante é estocado apropriadamente até seu uso [42].

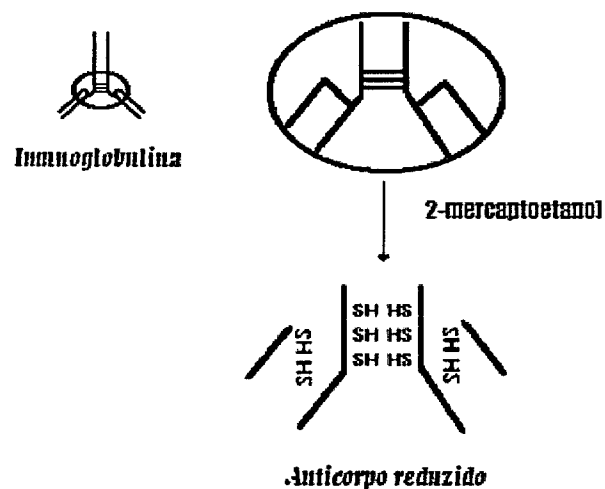


FIGURA 8 – Esquema de redução das pontes dissulfídicas com 2-ME.

O método citado a seguir foi utilizado para a redução e purificação dos anticorpos:

1. Solução de anticorpo com concentração entre 5 e 10 mg/mL.
2. Lavada a coluna de Sephadex com PBS frio nitrogenado (durante 30 minutos) com pelo menos 20 vezes o volume do anticorpo usado.
3. Adicionado 2-ME à solução de anticorpo em uma relação molar de anticorpo:2-ME de 1:1000.
4. Incubado a mistura à temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Purificado a solução (após o tempo de reação) passando-a pela coluna de Sephadex e eluído com PBS frio nitrogenado.
6. Coletadas 12 frações de 1 mL em tubos plásticos, mantidos fechados e frios.

Neste processo além do tempo de redução inicialmente usado (30 minutos), foram estudados os tempos de uma e duas horas.

3.4.2 Controle da pureza dos anticorpos reduzidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Amostras (10 μ L) foram analisadas para determinação da estabilidade dos anticorpos nativos e da pureza dos anticorpos reduzidos e purificados, perante a presença do 2-ME nas frações coletadas.

Também foi analisado um kit de MDP, o PBS, a Solução Fisiológica (SF) e o agente redutor 2-ME, para determinação do tempo de retenção de cada composto presente na formulação dos anticorpos.

As análises em CLAE foram feitas usando uma coluna Protein-Pak Diol (OH) e tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,4 como solvente. O comprimento de onda usado foi de 254 nm e o tempo de corrida de 20 minutos com um fluxo de 1 mL/min.

3.4.3 Avaliação da concentração protéica dos anticorpos reduzidos

A absorbância das frações coletadas foi medida em espectrofotômetro UV-VIS em um comprimento de onda de 280 nm. As amostras foram diluídas usando-se PBS numa proporção de 1:10 (anticorpo: PBS).

A concentração dos anticorpos reduzidos foi calculada usando a equação 1

$$\text{Proteína (mg/mL)} = A_{280} / \epsilon_{280} \quad (\text{EQ. 1})$$

Nesta equação o ϵ_{280} representa o coeficiente de extinção de IgG a 1 mg/mL e é igual a 1,4 mL/mg e A_{280} representa a absorbância lida em espectrofotômetro a 280 nm.

Juntaram-se as frações cuja concentração foi maior que 0,5 mg/mL. Esterilizou-se por membrana (Millipore 0,22 μ m) e refrigerou-se imediatamente (4 - 8 °C).

3.4.4 Determinação do nº de grupos -SH reduzidos

O método mais usado para determinação dos grupos SH é o método de Ellman's, no qual 5,5'-ditio-2 nitrobenzoato (DTNB) é usado para reagir com grupos SH para produzir

uma substância amarela com uma absorvância máxima de 412 nm [89]. Este método é simples, rápido e direto. Seguiu-se o procedimento descrito abaixo:

1. Pegou-se 50 μL do “pool” de anticorpo reduzido e purificado e adicionou-se 50 μL de reagente de Ellman com concentração de 0,3 mg/mL em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0
2. Esta solução foi diluída a 3,0 mL com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0
3. Incubou-se durante 15 minutos a temperatura ambiente
4. Mediu-se a absorvância em espectrofotômetro UV-VIS a 412 nm .
5. Determinou-se a concentração de grupos sulfidrilas livres (-SH) por interpolação na curva padrão de cisteína.

O número de mmol/L de anticorpo reduzido foi determinado utilizando a equação 2 e o número dos grupos -SH por molécula de anticorpo foi determinado usando a equação 3.

$$\text{mmol/L} = [(\text{mg de Ac/mL}) / \text{PM IgG}] \times 10^3 \text{ (EQ. 2)}$$

$$\text{-SH/mol de Ac} = (\text{mmol/L interpolado na curva de cisteína}) / (\text{mmol/L de Ac}) \text{ (EQ. 3)}$$

O tempo de incubação foi variado de 5 a 20 minutos. Foi feita uma varredura das amostras com comprimento de onda de 190 – 900 nm para determinação da melhor condição do equipamento de UV-VIS utilizado.

Segundo o protocolo da AIEA [88], a faixa esperada do nº de grupos -SH por molécula de anticorpo está entre 4 a 6 grupos. Alguns autores encontraram uma faixa que variou de 3 a 10 grupos -SH por molécula de anticorpo [27, 30, 42, 78, 80, 81, 85, 87].

3.4.4.1 Construção da curva padrão de cisteína

A construção da curva padrão de cisteína foi realizada com as seguintes concentrações milimolares: 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0. Amostras de 50 μL de cada solução de cisteína foram incubadas com 50 μL de solução de reagente de Ellman e 0,9 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0 por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS, com um comprimento de onda de 409 nm. Como solução de referência usou-se 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0.

3.4.5 Marcação da formulação sem liofilização

O método direto de marcação do anticorpo reduzido com ^{99m}Tc na presença de MDP desenvolvido por Schwarz e Steinstrasser (1987) e Mather e Ellison (1990) tem mostrado vantagem sobre outras técnicas. Eles reportaram um estudo sobre a marcação de anticorpos monoclonais pelo método direto utilizando uma mistura de metilenodifosfonato – estanho (MDP-Sn) obtida de um conjunto de reativos comercial onde o MDP atua como ligante fraco competitivo e o Sn^{2+} como agente redutor. Os grupos livres obtidos após a redução das pontes dissulfídricas da molécula de anticorpo por adição de 2-ME, se unem ao ^{99m}Tc formando ligações $^{99m}\text{Tc-S-}$. Dado que a introdução do ^{99m}Tc à proteína é um processo com uma cinética “lenta”, e para evitar a hidrólise e oxidação do ^{99m}Tc , utiliza-se um ligante fraco como o MDP, que estabiliza o ^{99m}Tc e acelera a cinética de marcação da proteína através de um intercâmbio de ligantes. A marcação é efetuada por redução do pertecnetato via Sn^{2+} (FIG. 9) [87].

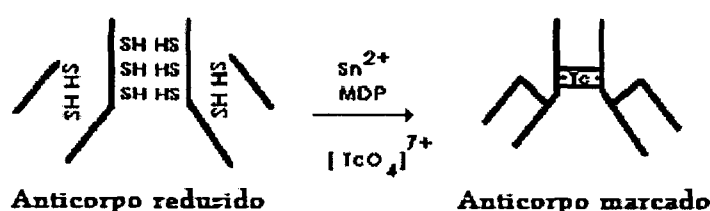


FIGURA 9 – Esquema de marcação do anticorpo com ^{99m}Tc .

A marcação dos anticorpos na forma de solução foi efetuada de acordo com as seguintes etapas:

1. Retirado do refrigerador um frasco de anticorpo reduzido e purificado (em solução) e esperado adquirir a temperatura ambiente (18 – 20°C)
2. Dissolvido um kit de MDP com 5 mL de solução fisiológica (SF).
3. Agregadas quantidades desta solução de MDP que continham entre 2 – 4 μg de Sn^{2+} por mg de anticorpo.
4. Adicionado $^{99m}\text{TcO}_4^-$ eluído de um gerador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc
5. A solução foi agitada e deixada em repouso, à temperatura ambiente, por 30 minutos para reação.

Durante o desenvolvimento do trabalho foram utilizados kits de MDP da produção rotineira do CR que sofreram modificações visando a marcação com atividades crescentes de

^{99m}Tc . O kit de MDP usado para marcação do ior-EGF/R3 foi o da composição C e para o ior-CEA 1 foram os da composição B e C.

Variáveis estudadas para o anticorpo ior-CEA 1: massa do anticorpo, volume do kit de MDP (massa de MDP e estanho), atividade e volume do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e tempo de reação. Para o ior-EGF/R3 foram estudados os mesmo parâmetros com exceção do volume de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

3.4.6 Preparação e liofilização da formulação dos anticorpos reduzidos

3.4.6.1 Liofilização [90, 91]

A liofilização é um processo de secagem pelo qual a água contida no produto é removida por sublimação, ou seja, partindo-se de um material previamente congelado e submetendo-se ao alto vácuo a água passa diretamente do estado sólido ao estado de vapor.

É uma técnica que serve para conservar preparações que serão usadas como substrato em produção ou pesquisas e o produto final terá o mesmo volume inicial com baixa densidade aparente.

As vantagens da liofilização devem-se principalmente as seguintes razões:

- ❖ O produto, após a liofilização apresenta-se com teor de umidade residual muito baixo;
- ❖ O processo é conduzido a temperaturas bem mais baixas do que aquelas exigidas pelos processos comuns de secagem, evitando-se os problemas que podem ser ocasionados pelas altas temperaturas;
- ❖ A degradação do produto por oxidação é reduzida, pois a liofilização processa-se sob vácuo.

O processo de liofilização habitualmente é dividido em três etapas:

- ❖ Congelamento inicial da solução – normalmente é realizado fora do liofilizador, utilizando-se um equipamento especialmente desenvolvido para esta operação. A água transforma-se em gelo com alto grau de pureza;
- ❖ Secagem primária (sublimação) – estando o produto convenientemente congelado, os recipientes são levados então ao liofilizador, onde, após um período de tempo necessário para a estabilização da temperatura, aplica-se ao vácuo, dando início à sublimação da água. Ao final desta etapa, consegue-se retirar do produto grande parte da água nele contida.

- ❖ Secagem secundária – a umidade que permanece no produto é então reduzida, utilizando-se uma secagem pelo calor, sob vácuo, ainda no liofilizador. A umidade residual geralmente fica abaixo de 1%. Após a finalização desta secagem secundária, os recipientes são definitivamente fechados, sob vácuo ou ainda sob atmosfera de gás inerte estéril (nitrogênio, por exemplo).

O tempo total do processo pode variar de 25 a 27 horas dependendo do liofilizador usado.

3.4.6.2 Procedimento de liofilização dos anticorpos

O procedimento citado abaixo foi utilizado para a preparação dos anticorpos a serem liofilizados. As amostras foram nitrogenadas antes da divisão das alíquotas.

1. Foi dissolvido um kit de MDP com 5 mL de SF.
2. Agregaram-se quantidades desta solução de MDP que continham entre 1 – 8 μg de Sn^{2+} por mg de anticorpo reduzido.
3. Fracionou-se 1 mL dessa solução em frascos de vidro estéril (tipo penicilina - pré-resfriados) e procedeu-se à liofilização.
4. Concluída a liofilização, os frascos foram lacrados, rotulados e conservados a 4-8 °C.

O kit de MDP usado para compor os kits do ior-EGF/R3 foi o da composição C e para o ior-CEA 1 foi o A, B e C.

3.4.7 Marcação da formulação liofilizada (kit)

1. Foi retirado do refrigerador um kit e deixado que retornasse a temperatura ambiente
2. Adicionou-se $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ eluído de um gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$
3. A solução foi agitada e incubada a temperatura ambiente.

As variáveis estudadas para os kits de ambos anticorpos foram: volume e atividade do $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e tempo de incubação após adição do $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. Para os kits do ior-EGF/R3 também foi estudada a interferência da velocidade de adição do $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, comparando kits normais e sem vácuo.

3.4.8 Controle de qualidade dos anticorpos marcados [24, 92]

A ineficiência nos processos de marcação pode dar origem a impurezas radioquímicas. A pureza radioquímica pode ser definida como a fração da radioatividade total na forma química desejada presente no radiofármaco. Estas impurezas podem ser causadas por decomposição do radiofármaco por ação do solvente utilizado, temperatura, luz, radiólise ou marcação de uma impureza com o mesmo radionuclídeo. A presença deste tipo de impureza (radioquímica) pode ocasionar padrões de biodistribuição diferentes ao esperado, produzindo em consequência: diminuição da qualidade da imagem, aumento da dose absorvida pelo paciente e dificuldades na interpretação diagnóstica, por isso sua determinação é de suma importância. Além disso, a radiomarkação pode causar alterações significativas nas propriedades biológicas e imunológicas na molécula do anticorpo, portanto a preparação foi submetida a procedimentos de controle de qualidade mais específicos do que os estabelecidos para a marcação de moléculas não biológicas com ^{99m}Tc .

3.4.8.1 Determinação da pureza radioquímica

As impurezas radioquímicas formadas decorrente do processo de marcação podem ser o próprio pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), decorrente da sua não redução; o óxido de tecnécio (TcO_2), também denominado de tecnécio hidrolisado; e reduzido (TcHR), decorrente da redução e não-complexação do metal; e outras espécies reduzidas e complexadas com arranjos diferentes do desejado [24].

O resultado da pureza radioquímica representou o rendimento de marcação, parâmetro utilizado para comparação dos resultados experimentais de marcação. A pureza radioquímica do ior-CEA 1 marcado com ^{99m}Tc deve ser maior que 90% (valor também usado para o ior-EGF/R3), como determina o Manual de Protocolos de Qualidade de Radiofármacos [93].

A principal técnica utilizada para garantir a qualidade final dos radiofármacos é a cromatografia ascendente, em que a amostra do produto é aplicada sobre um suporte (fase estacionária) e arrastada por um solvente (fase móvel). Na fase estacionária foi usado papel Whatman 3MM (1 x 10 cm) e camada fina ITLC-SG (fibra de vidro) embebida em uma solução de soro albumina humana 5% (1,5 x 10 cm). Na fase móvel usaram-se os solventes SF, MEC e etanol:amônia:água (ETOH:NH₄OH:H₂O) em uma proporção de 2:1:5 (v:v:v).

Os valores do tempo de retenção (R_f) das possíveis espécies químicas presentes após a marcação para cada sistema cromatográfico estudado estão listados na TAB. 4.

TABELA 4 – Determinação do R_f dos produtos nos três tipos de solventes

ESPÉCIE	$*R_f$		
	SS	MEC	ETOH:NH ₄ OH:H ₂ O
^{99m} Tc reduzido hidrolisado (TcO ₂)	0,0	0,0	0,0
^{99m} Tc-anticorpo	0,0	0,0	0.7-0.8
^{99m} Tc-MDP	1,0	0,0	1,0
^{99m} Tc livre (TcO ₄ ⁻)	1,0	1,0	1,0

* R_f (Fator de retenção): é a relação entre o quanto a espécie química migrou em relação à corrida do solvente.

3.4.8.2 Imunorreatividade

Dado que a principal característica dos anticorpos é sua capacidade de unir-se de forma extremamente seletiva a outra molécula, ex. um antígeno, é importante determinar se o anticorpo uma vez radiomarcado conserva suas propriedades imunorreativas. Esta medida pode ser realizada por métodos quantitativos ou qualitativos de imunoanálises [92].

A determinação da fração imunorreativa, que é a porcentagem do anticorpo radiomarcado que mantém a sua especificidade original de ligação ao antígeno, foi determinada utilizando cromatografia de afinidade em camada delgada:

Preparo das fitas cromatográficas:

1. Ativaram-se as fitas cromatográficas de fibra de vidro (1 x 10 cm) impregnadas de sílica gel (ITLC-SG) durante 30 minutos por aquecimento a 110°C.
2. Prepararam-se as fitas com antígeno positivo semeando 200 µL de antígeno (10 µg/mL) sobre as fitas de ITLC-SG ativadas, à aproximadamente 3 cm da parte inferior, deixando 20 segundos para o antígeno se impregnar na fita.
3. Submergiram-se as fitas completamente por 2 segundos em uma solução de soro albumina humano (5 mg/mL) em salina 0,9%, retirou-se as fitas e deixou a solução impregnar durante 20 segundos.
4. Enxaguaram-se as fitas com água bidestilada e secou-se com ar frio.
5. As fitas foram colocadas em uma estufa a 37 °C para secagem completa
6. As fitas com antígeno negativo foram preparadas semeando 200 µL de soro fetal bovino. Seguiu-se o mesmo tratamento dado às fitas de antígeno positivo.

Marcação do anticorpo:

- ❖ Reconstituiu-se um kit de anticorpo (1,0 mg de anticorpo / frasco) com 5 mL de solução de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e diluíram-se alíquotas de 2 μL (0,4 μg de anticorpo) em 10 μL com soro fetal bovino. Os 10 μL foram colocados sobre as fitas tanto de antígeno positivo quanto de antígeno negativo.
- ❖ A cromatografia foi desenvolvida em PBS:etanol a 4% até aproximadamente 9 cm. Cortaram-se as fitas pela metade (FIG. 10) para determinação da porcentagem da fração imunorreativa (%FI). O cálculo foi realizado utilizando a equação 4:

$$\% \text{FI} = (\text{O/T}) \times 100 - \% \text{UI} \quad (\text{EQ. 4})$$

onde:

O = Atividade na origem da tira de antígeno positivo

T = Atividade total aplicada na tira de antígeno positivo

%UI (união inespecífica) = (Atividade na origem / Atividade total) x 100, da fita de antígeno negativo.

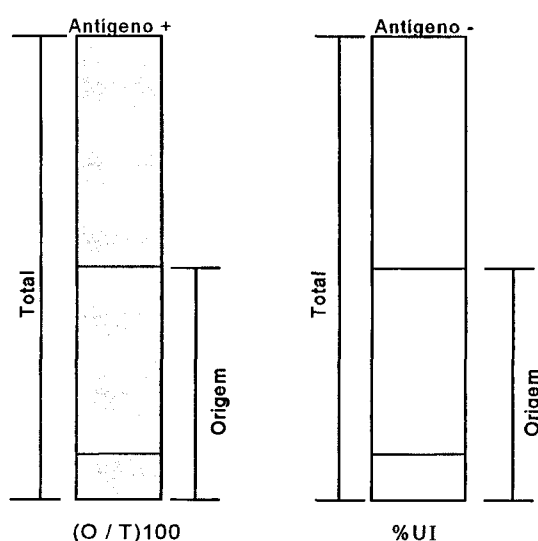


FIGURA 10 - Determinação da porcentagem da fração imunorreativa.

O soro fetal bovino foi diluído usando-se 0,5 mL de soro e 9,5 mL de SF. De acordo com o ARCAL LII [88] a %UI obtida nas fitas de antígeno negativo pode variar de 8 – 20%. No entanto, a %FI é de aproximadamente 60 – 70%.

3.4.8.3 Desafio a Cisteína

Estudos de transquelação avaliam a resistência da ligação dos complexos anticorpo- ^{99m}Tc sobre a presença de cisteína no corpo. A solução de cisteína usada para este teste foi preparada conforme descrito no item 3.3.3.

Após obtenção das seguintes concentrações milimolares de cisteína: 8,3, 0,83, 0,083 e 0,0083, realizou-se uma diluição (1:3) da solução original de um kit anticorpo- ^{99m}Tc (contendo 1 mg/mL), tomando 200 μL desta solução e agregando 400 μL de tampão 0,4 mol/L pH 7,0.

Depois foi agregado 90 μL desta solução de anticorpo a cada 12 μL de cada uma das soluções de cisteína, incluindo uma sem cisteína (branco). Estas soluções foram incubadas a 37°C durante uma hora e analisadas por cromatografia em papel Whatman 3MM, usando solução fisiológica como solvente de corrida.

3.4.9 Estabilidade dos kits

A estabilidade foi estudada em intervalos de tempo definidos após a marcação (0 – 24h) e em relação ao tempo de estocagem. O rendimento de marcação foi analisado como descrito em 3.4.8.1.

3.4.10 Estudos de imagem com os anticorpos marcados com ^{99m}Tc

Células de tumor pancreático do tipo AR42J foram implantadas no dorso de camundongos nude machos e esperou-se o crescimento do tumor para então efetuar o uso desses animais.

O estudo de imagem foi realizado com 4 camundongos nude machos: 2 com tumor e 2 sadios. Foi usado um par tumor/sadio para cada anticorpo.

A aquisição das imagens foi realizada no Centro de Medicina Nuclear em um equipamento Siemens LEM+ portátil (FIG. 11) analógico com campo de visão circular pequeno, analisador multicanal de espectro entre 15 keV e 510 keV e até 2 “janelas de energia” simultâneas, colimadores para baixa energia (até 200 keV) para imagens em projeção planar real, convergente, divergente e convergente invertida. Computador de aquisição de

imagens compatível IBM/PC Intel Pentium 133, sistema operacional Windows 98, software de aquisição de imagens PIP, placa de aquisição de dados IMAGAMMA. Equipado com o software ImageJ para processamento de imagens.



FIGURA 11 – Equipamento usado para mapeamento dos camundongos.

Os kits ior-CEA-1 e ior-EGF-R3 foram marcados com 1 mL de ^{99m}Tc com uma atividade de 470,64 MBq e 510,23 MBq (12,72 mCi e 13,79 mCi), respectivamente. Esperou-se 30 minutos para então injetar uma dose de 0,15 mL em cada camundongo. A injeção foi intravenosa (IV) pela veia lateral da cauda. Após 24 horas de injeção, os animais foram sacrificados para realização das imagens.

As imagens foram adquiridas com pinhole sem chumbo com 4 mm de abertura, foram imagens laterais estáticas de 10 minutos cada, usando uma matriz 128 e 2 bytes por pixel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Processo de redução e purificação dos anticorpos

Os anticorpos usados neste trabalho foram doados por CENTIS (Cuba) que não forneceram nenhum tipo de informação sobre pureza e validade dos mesmos.

As reduções dos anticorpos foram realizadas conforme a necessidade de uso e a disponibilidade de massa e volume de anticorpo. A massa reduzida para ambos variou de 5 a 10 mg e a quantidade de agente redutor 2-ME de 2,5 a 10 μ L.

Nos primeiros experimentos, o tempo de reação usado foi de 30 minutos, conforme citado em literatura [42, 85, 88]. Após um certo tempo de estocagem do anticorpo nativo, foi notado que esse tempo de redução talvez estivesse sendo insuficiente para reduzir as pontes dissulfídicas, devido à queda no rendimento de marcação. Portanto, o tempo de reação usado na redução foi avaliado e modificado, com a finalidade de melhorar a eficiência de marcação dos anticorpos como mostra a TAB. 5.

TABELA 5 – Relação entre a massa de Ac, tempo de redução e rendimento de marcação.

Massa de anticorpo (mg)	Tempo de redução	Rendimento de marcação (%)
5 mg de ior-CEA 1	30 minutos	96,2 (1)*
10 mg de ior-CEA 1	30 minutos	98,0 (2)
10 mg de ior-EGF/R3	30 minutos	98,8 (3)
10 mg de ior-CEA 1	30 minutos	34,4 (4)
5 mg de ior-EGF/R3	30 minutos	55,6 (5)
5 mg de ior-EGF/R3	1 hora	99,1 (6)
10 mg de ior-CEA 1	1 hora	61,5 (7)
10 mg de ior-CEA 1	2 horas	99,8 (8)
10 mg de ior-EGF/R3	2 horas	96,7 (9)

* O número entre parênteses representa a ordem cronológica em que os experimentos foram realizados.

Os dados obtidos confirmam que nos primeiros experimentos, o tempo de reação de 30 minutos foi suficiente para reduzir as pontes dissulfídicas e o rendimento de marcação ficou em torno de 97%, independentemente da massa de anticorpo usada. À medida que o

tempo foi passando, percebe-se uma queda no rendimento de marcação e a necessidade de se aumentar o tempo de reação no procedimento de redução.

Com isso, o tempo de reação foi aumentado proporcionalmente de acordo com a massa de anticorpo usada, melhorando assim o rendimento de marcação. Para 5 mg de anticorpo o tempo de reação adotado foi de 1 hora e para 10 mg o tempo foi de 2 horas.

4.2 Controle da pureza dos anticorpos em CLAE

As frações reduzidas e purificadas dos anticorpos foram analisadas em CLAE para determinação da pureza dos anticorpos nativos e verificação da presença do agente redutor 2-ME nas frações coletadas após o processo de redução e purificação. Também foram analisados todos os reagentes usados em todo o processo de formulação dos kits.

A FIG. 12 ilustra os cromatogramas dos reagentes usados no processo de redução, purificação e liofilização dos anticorpos.

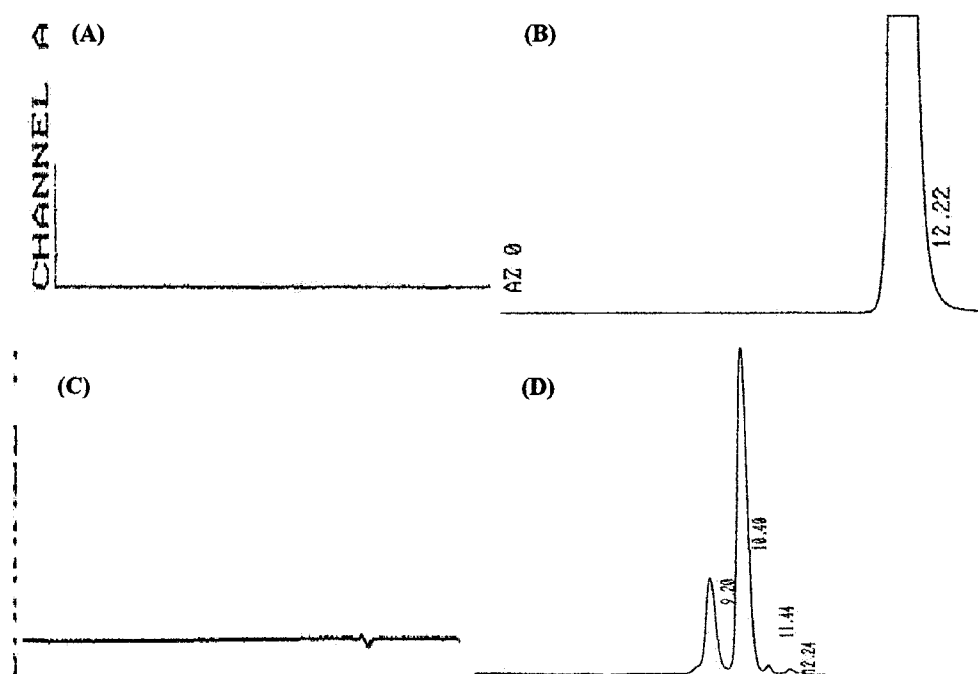


FIGURA 12 – Cromatogramas: (A) Solução Fisiológica; (B) 2-ME, (C) PBS e (D) kit MDP.

Foi determinado o tempo de retenção (R_t) para Solução Fisiológica (SF), 2-ME, PBS e kit de MDP. Na FIG. 12 (A) e (C) observa-se a ausência de picos porque a SF não tem nenhum componente que absorva no comprimento de onda estudado (254 nm) e o PBS foi

usado como solvente, sendo a linha base do sistema. Para o agente redutor 2-ME, o R_t encontrado foi 12,22 minutos. Este tempo tardio é favorável porque facilita a separação entre o redutor (considerado um contaminante pós-purificação) e o anticorpo (R_t 6,67 e 7,84, como explicado a seguir). Os valores encontrados correspondem a literatura [94]. O kit de MDP apresentou vários picos com R_t variando de 9,29 – 12,24, cada pico representa um composto pertencente ao kit.

A FIG. 13 mostra os cromatogramas UV dos anticorpos CEA nativo, EGF/R3 nativo e EGF/R3 reduzido antes da purificação.

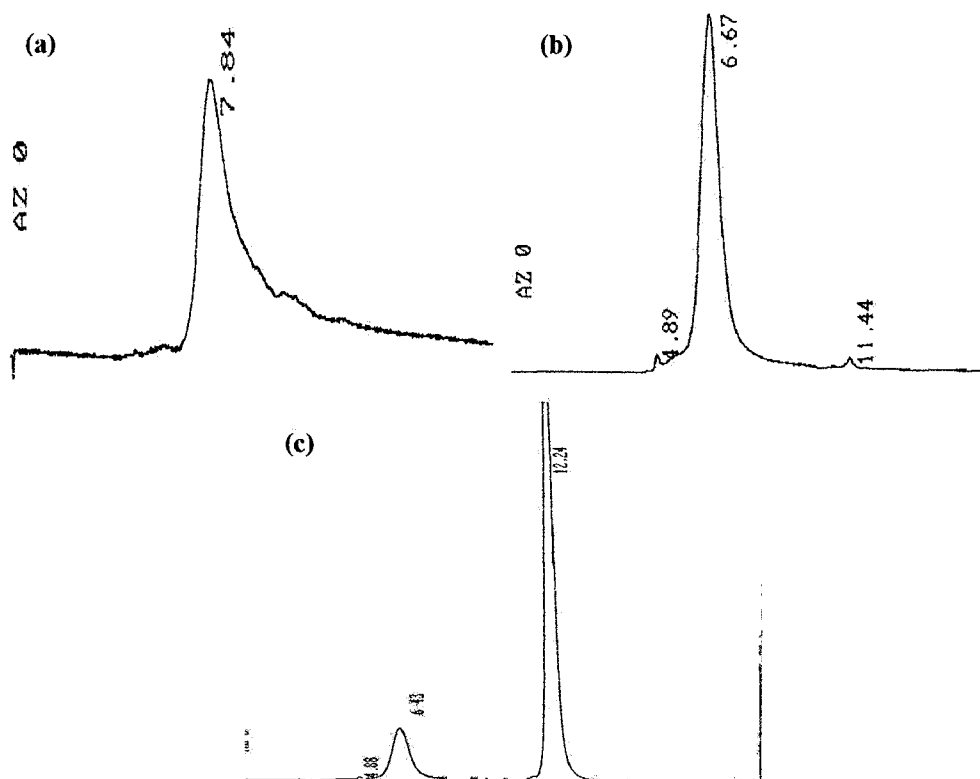


FIGURA 13 – Cromatogramas: (a) CEA nativo, (b) EGF/R3 nativo e (c) EGF/R3 reduzido antes da purificação.

Os dois anticorpos nativos apresentaram R_t muito parecido. Para o ior-CEA 1 o R_t determinado foi 7,84 minutos e para o ior-EGF/R3 foi 6,67 minutos, apesar de aparecer um pico com 4,89 e um com 11,44 minutos (estes não foram identificados). Percebeu-se que os anticorpos nativos estavam puros e até o tempo da análise não haviam sido formados grumos.

No espectro obtido para o anticorpo ior-EGF/R3 apenas reduzido antes da purificação, FIG. 13 (c), detectou-se a presença do redutor 2-ME, facilmente reconhecido pelos

tempos de retenção distintos, o que confirma a importância do processo de purificação para eliminação do mesmo.

As 12 frações dos dois anticorpos foram analisadas individualmente por CLAE, apresentando resultados semelhantes. A FIG. 14 exemplifica um dos experimentos feito com algumas frações do anticorpo ior-EGF/R3 coletadas no processo de purificação, para identificar em qual delas o 2-ME começa a surgir.

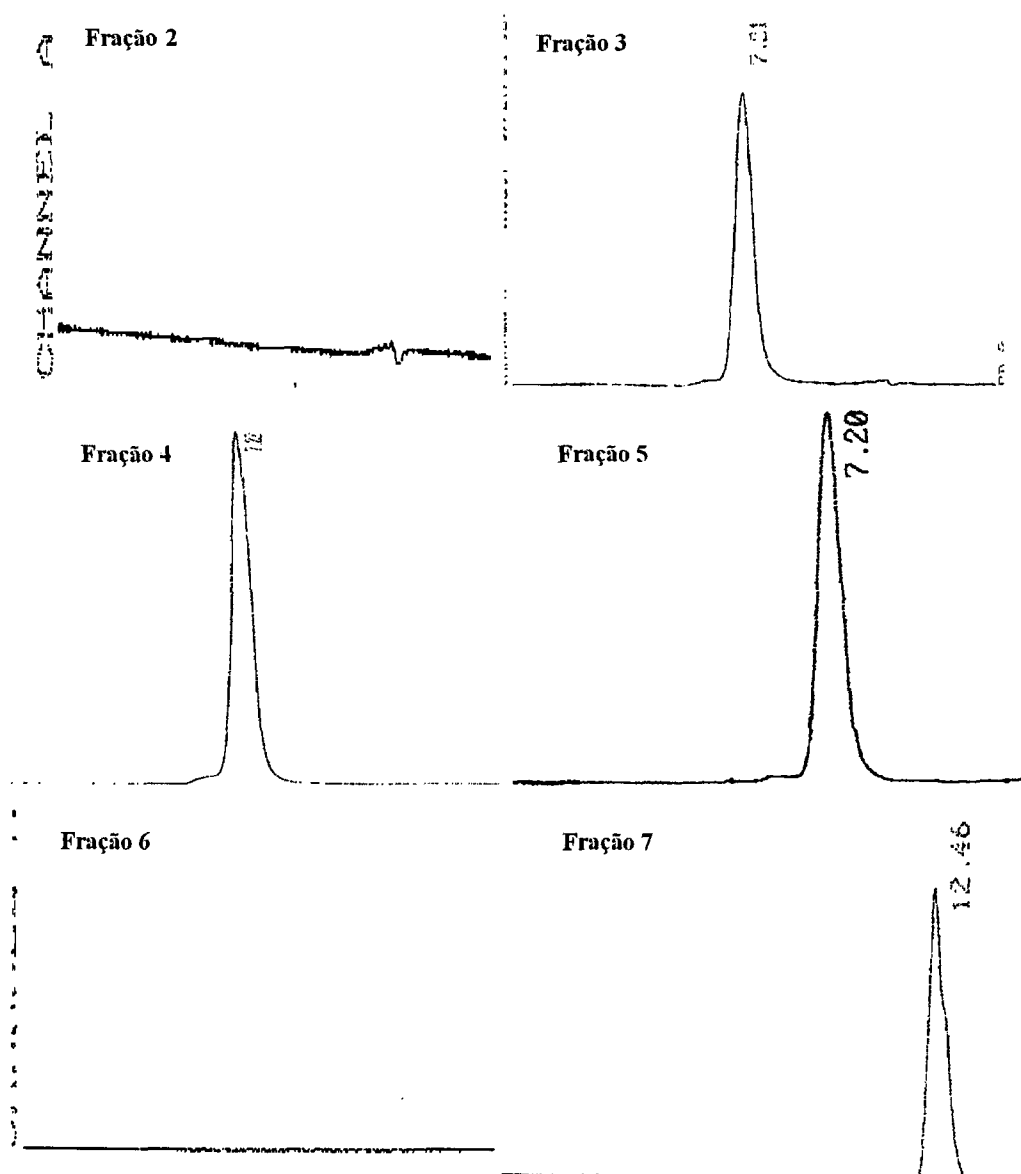


FIGURA 14 – Cromatogramas das frações 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

No protocolo da AIEA [88] é citado que o anticorpo aparece nas frações de 3 – 8. Foi percebido neste estudo, que o anticorpo reduzido começou a aparecer na fração 3 e foi até a fração 5. Algumas vezes o anticorpo também apareceu na fração 6, mas geralmente vinha acompanhado do 2-ME. A partir da fração 7 apenas o 2-ME foi coletado.

Baseando-se neste estudo para continuidade dos experimentos, apenas foram usadas as frações que continham anticorpo sem a presença de 2-ME e isso fez com que o processo fosse otimizado, não necessitando mais a coleta de 12 frações, reduzindo esse número para apenas as frações que de fato interessavam.

4.3 Avaliação da concentração protéica dos anticorpos reduzidos

Após a redução dos anticorpos ior-CEA-1 e ior-EGF-R3 com 2-ME, foram coletadas 12 frações dos anticorpos reduzidos e purificados com 1 mL cada. Para a leitura em espectrofotômetro as frações foram diluídas com PBS (100 μ L de cada fração + 900 μ L de PBS) e como solução de referência usou-se 1 mL de PBS. Foram utilizadas as frações cuja concentração protéica foi maior que 0,5 mg/mL e não continham 2-ME.

O cálculo da % de recuperação da proteína está representado na FIG. 15, para 9 experimentos de redução de ior-CEA 1 e ior-EGF/R3.

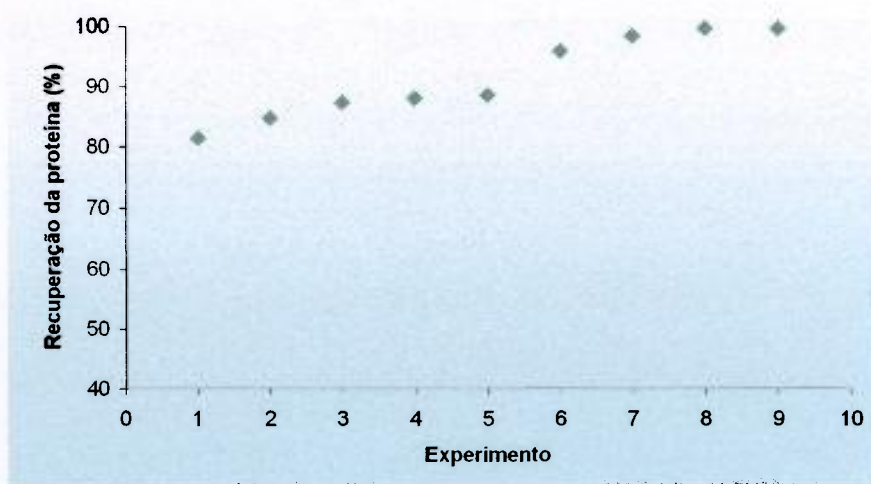


FIGURA 15 – Cálculo da recuperação da proteína reduzida.

Observou-se que os processos de redução e purificação foram eficientes, apresentando na maioria dos casos uma boa porcentagem de recuperação da proteína inicialmente reduzida, com uma recuperação média de $91,6\% \pm 6,1\%$.

4.4 Determinação do nº de grupos -SH reduzidos

O nº de tióis livres foi obtido por comparação com uma curva padrão obtida pelo ensaio de uma série de padrões de cisteína com concentrações entre 0,25 e 1,0 mmol/L, como mostra a FIG. 16.

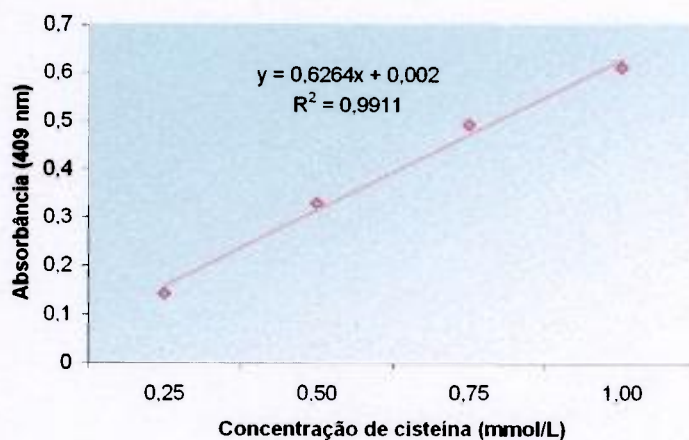


FIGURA 16 – Curva padrão de cisteína construída para determinação dos grupos -SH.

Uma excelente correlação linear foi encontrada entre a concentração de cisteína e a absorbância ($r^2 = 0,9911$). Foi realizada uma varredura das amostras e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a densidade óptica de 409 e 412 nm.

A concentração dos grupos sulfidrilas baseada na curva padrão de cisteína e o nº de grupos -SH por molécula de anticorpo foram calculados e são mostrados na TAB. 6 os resultados otimizados.

TABELA 6 – Número de grupos sulfidrilas endógenos gerados por redução com 2-ME.

Anticorpo	Antes da redução	Após redução (nº de grupos SH gerados/mol de anticorpo)*	% do total (36 SH/mol)
ior-CEA 1	0,8	9,8 ± 2,4	27,1
ior-EGF/R3	0,3	12,5 ± 2,3	34,8

*média ± DP (n = 3)

Uma IgG de camundongo contém somente 6 intercadeias e 12 intracadeias de ligações dissulfídicas oferecendo um máximo de 36 grupos -SH por molécula de anticorpo [42]. A determinação dos grupos sulfidrilas por redução com 2-ME usando reagente de Ellman's (TAB. 6) indicou a produção de 9,8 e 12,5 grupos sulfidrilas, o que representa 27,1 e

34,8% do total de grupos SH gerados por molécula para os anticorpos ior-CEA 1 e ior-EGF/R3, respectivamente.

A relação entre o nº de grupos -SH endógenos gerado e a eficiência de marcação está mostrada na FIG. 17.

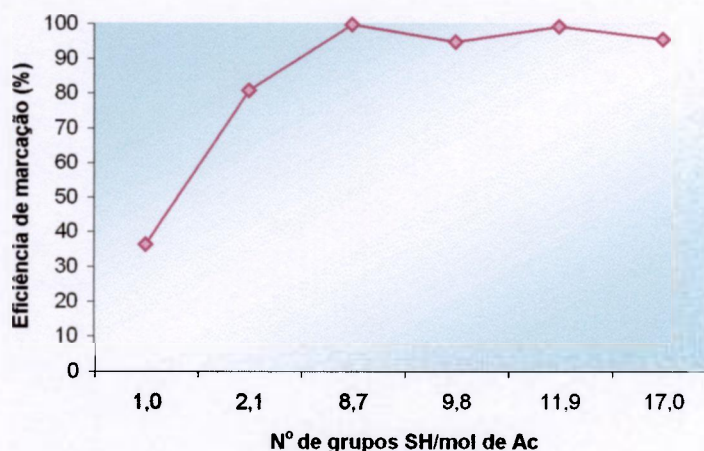


FIGURA 17 – Relação entre o nº de grupos -SH endógenos e a eficiência de marcação para o anticorpo ior-EGF/R3.

A importância dos grupos sulfidrilas da molécula de anticorpo deve-se ao fato de que eles são a ligação para o íon de tecnécio, sendo essenciais para a eficiência de marcação de anticorpos monoclonais. Quanto maior a quantidade de grupos tióis livres maior será o rendimento de marcação, como constatado na literatura por vários autores [27, 78, 81] e confirmado neste trabalho (FIG. 17). O anticorpo ior-CEA-1 teve o mesmo perfil que o anticorpo ior-EGF/R3.

Griffiths et al. [95] usando 2-ME obtiveram com IgG intacto de 1 a 9 grupos -SH por molécula de IgG usando reagente de Ellman. Paik et al. [96] avaliaram grupos sulfidrilas em seu trabalho que foram determinados após a incubação por 30 minutos de cloreto estano com anticorpo numa razão de 10:1 (SnCl_2 :anticorpo) e a porcentagem de redução foi 15,3%, sob essas condições, baseado nos 36 grupos sulfidrilas por molécula de anticorpo. Garron et al. [97] usaram 2-aminoetanétio (AET) por 30 minutos numa média de 3000 a 9000:1 (AET:anticorpo) e observaram entre 11,9 e 22,2% dos grupos -SH baseado em 36 sulfidrilas e tiveram 98,0% de rendimento de radiomarkação com ^{99m}Tc . Percebe-se que em comparação

com os dados apresentados na literatura, os resultados encontrados no presente trabalho foram superiores, para as condições otimizadas.

Também foram analisadas amostras do anticorpo reduzido mas sem purificação pela coluna PD-10 e a quantidade de grupos -SH obtida foi 32,4 (EGF/R3) e 31,5 (CEA). Certamente isso foi devido à presença do contaminante 2-ME, como observado por Mather e Ellison [42], indicando que se o 2-ME sobreviver à etapa de filtração gel pode mascarar a quantificação dos grupos -SH. Foi demonstrado experimentalmente que o 2-ME absorve no comprimento de onda utilizado nesta análise.

4.5 Marcação dos anticorpos

Os anticorpos foram primeiramente testados em solução para determinação e otimização de alguns parâmetros e posteriormente na forma de kits. Os resultados serão apresentados separadamente para cada um dos anticorpos, pois em alguns casos os parâmetros diferiram entre si.

Neste tópico, também serão apresentados os resultados da estabilidade estudada em intervalos de tempo definidos após a marcação (0 – 24 h).

4.5.1 Marcação sem liofilização: ior-CEA-1

O Sn^{2+} reduz o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para ligação aos grupos sulfidrilas, portanto a redução do pertecnetato foi realizada com um kit comercial de MDP, que contém SnCl_2 .

A otimização da marcação foi realizada pela variação dos parâmetros incluindo massa de anticorpo (0,5, 1,0 e 2,0 mg), volume do kit de MDP (10, 29 e 50 μL), massa de Sn^{2+} (1,0, 3,0 e 5,0 μg), atividade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (55,5 – 2619,6 MBq [1,5 – 70,8 mCi]) e volume do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (1 – 3 mL). O tempo após adição do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ também foi observado de 15 até 180 minutos. O pH 7,0 manteve-se constante.

O primeiro estudo foi realizado variando o volume do kit de MDP e conseqüentemente a massa de estanho presente nas marcações (FIG. 18). Para isso foi usado 0,5 mg de Ac, 59,2 MBq (1,6 mCi) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (1 mL) e tempo de reação de 30 minutos.

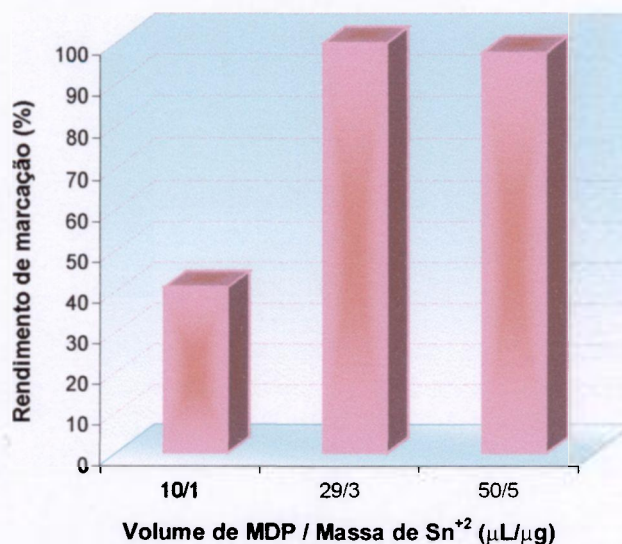


FIGURA 18 – Eficiência de marcação em relação à variação do volume do kit de MDP e massa de estanho correspondente.

Com um baixo volume de kit de MDP e menos massa de Sn²⁺ o rendimento de marcação não chegou a 50,0% e mostrou que a quantidade do Sn²⁺ e do ligante fraco (MDP) foi insuficiente para reduzir por completo o tecnécio [30] e realizar a troca de ligantes respectivamente, também constatado por Ferro-Flores e Lezama-Carrasco [79], ao usarem solução de HEDP para marcação do anticorpo CEA. Aumentando o volume de MDP (e a massa de Sn²⁺), a eficiência de marcação do Ac foi favorecida e o rendimento foi 99,7% para 29 µL de MDP (3,0 µg de Sn²⁺) e 97,4% para 50 µL de MDP (5,0 µg de Sn²⁺). Todavia, deve-se tomar cuidado ao aumentar o volume de MDP porque a eficiência de marcação do Ac compete com o aumento da quantidade de MDP marcado (^{99m}Tc-MDP) e o aumento do nível do íon Sn²⁺ gera um aumento na quantidade de colóide [30]. Portanto o melhor resultado foi obtido com 29 µL de MDP (3,0 µg de Sn²⁺) e esta quantidade foi adotada para a variação dos outros parâmetros.

Posteriormente foi variada a massa de anticorpo para marcação, FIG. 19. Usou-se 29 µL de MDP (3,0 µg de Sn²⁺), uma média de 57,72 MBq (1,56 mCi) de ^{99m}Tc (1 mL) e 30 minutos de reação.

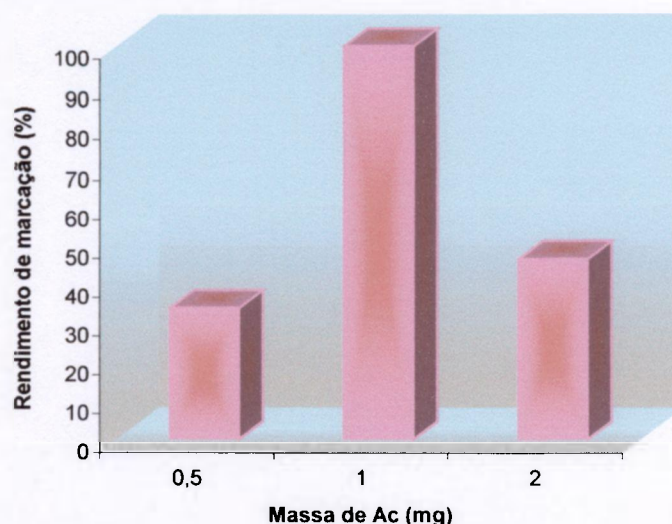


FIGURA 19 – Eficiência de marcação em relação a massa de anticorpo usada.

Os resultados obtidos com 0,5 e 2,0 mg de anticorpo neste estudo ficaram abaixo de 50,0%, o que não é adequado para aplicação de radiofármacos em pacientes, em razão da grande quantidade de impurezas radioquímicas presentes, que podem mascarar a imagem cintilográfica. No caso de pertecnetato livre consegue-se mapear a tireóide e o estômago, para o ^{99m}Tc -MDP, sistema ósseo e para o tecnécio hidrolisado, fígado.

Morales-Morales et al. (1998) [85] demonstraram em seus estudos que a eficiência de marcação no processo é dependente da concentração do anticorpo reduzido e mostraram que concentrações acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ foram necessárias para obter uma eficiência de marcação maior que 95,0%. Outros autores como Stalteri e Mather (1996) [83] determinaram que concentrações de Ac acima de 0,5 mg/mL foram necessárias para uma boa marcação (98,0%). No presente trabalho, o melhor resultado (99,7%) foi encontrado com a massa de 1 mg de anticorpo (concentração de 1 mg/mL).

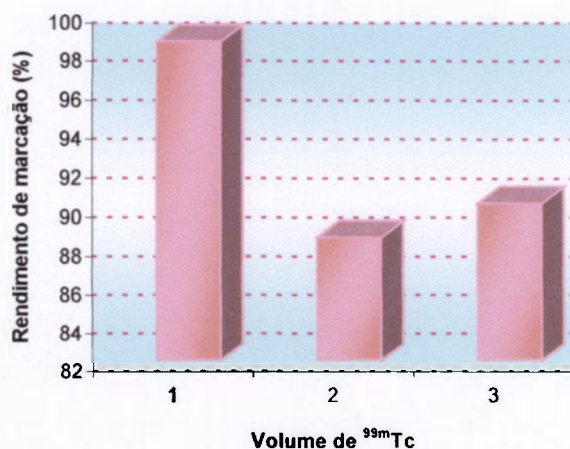
Foi analisado o efeito da variação da atividade de ^{99m}Tc no rendimento de marcação, como mostrado na TAB. 7. Foram usados alguns parâmetros distintos nesta análise.

TABELA 7 - Efeito da variação da atividade de ^{99m}Tc no rendimento de marcação

Massa de Ac (μg)	Volume de MDP/Massa de Sn^{2+} ($\mu\text{L}/\mu\text{g}$)	Atividade de ^{99m}Tc (MBq/mCi)	Rendimento de marcação (%)
300	20 / 2,0	55,5 / 1,5	99,8
300	20 / 2,0	302,29 / 8,17	95,8
300	30 / 3,0	516,52 / 13,96	98,0
300	30 / 3,0	1391,2 / 37,6	93,4
1000	29 / 3,0	169,09 / 4,57	99,7
1000	87 / 9,0	2619,6 / 70,80	70,0

Independente da massa de anticorpo usada, percebe-se que ao aumentar a atividade de ^{99m}Tc houve uma queda no rendimento de marcação. A marcação em solução aquosa permaneceu acima de 90% até a atividade de 1391,2 MBq (37,6 mCi). Quando se usou atividade de 2619,6 MBq (70,8 mCi), o rendimento caiu para 70,0%.

Também foi estudado o efeito do volume de ^{99m}Tc usado para a marcação do anticorpo, FIG. 20. Foi usado 300 μg de Ac, 20 μL de MDP (2,0 μg de Sn^{2+}) e 99,9 MBq (2,7 mCi) de ^{99m}Tc .

FIGURA 20 – Rendimento de marcação com relação à variação do volume de ^{99m}Tc .

Para a marcação do anticorpo em solução aquosa o volume de 1 mL de ^{99m}Tc foi o mais adequado, mostrando-se superior aos outros volumes testados.

É mostrado na FIG. 21 o rendimento de marcação obtido nos diferentes tempos estudados após a adição do ^{99m}Tc , mostrando uma ótima ligação do ^{99m}Tc ao anticorpo, com

eficiência de marcação numa média de 97,2%. Foi usado 300 μg de Ac, 20 μL de MDP (2,0 μg de Sn^{2+}) e 55,5 MBq (1,5 mCi) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (1 mL).

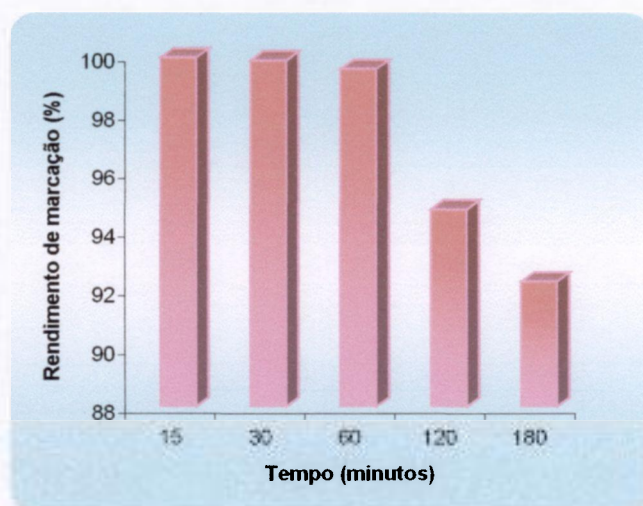


FIGURA 21 – Variação do rendimento de marcação em relação ao tempo pós-adição do $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Até a primeira hora após adição do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o rendimento de marcação permaneceu inalterado. Após 2 horas o rendimento de marcação caiu de 99,9% para 94,7% e após 4 horas caiu para 92,3%.

As melhores condições encontradas para o anticorpo sem liofilização marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foram: 1 mg de anticorpo, 29 μL do kit de MDP correspondente a 3,0 μg de Sn^{+2} . Os tempos de reação mais adequados foram 15 e 30 minutos e o anticorpo manteve-se estável até 180 minutos. O volume de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mais adequado foi 1 mL e o rendimento de marcação superior a 90% foi com atividade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ até 1391,2 MBq (37,6 mCi).

4.5.2 Preparação e liofilização da formulação do anticorpo ior-CEA 1 reduzido

Após os processos de redução e purificação dos anticorpos e do cálculo da proteína recuperada, as formulações para marcação foram submetidas ao processo de liofilização para posterior realização do controle de qualidade. Foram preparados lotes liofilizados variando-se a massa de anticorpo e volume do kit de MDP (massa de Sn^{2+}) como descrito na TAB. 8.

TABELA 8 – Composição usada na preparação dos lotes do anticorpo ior-CEA 1

Lote	Massa de anticorpo (mg)	Volume do kit de MDP (μL)	Massa de Sn^{2+} (μg)
A	0,5	25 ^a	2,5
B	1,0	15 ^b	1,5
C	1,0	20 ^b	2,0
D	1,0	29 ^{b/c}	3,0
E	1,0	38 ^b	4,0
F	1,0	87 ^c	9,0
G	1,8	10 ^b	1,0

^aReferente à composição A do kit de MDP.

^bReferente à composição B do kit de MDP.

^cReferente à composição C do kit de MDP.

4.5.2.1 Marcação dos kits: ior-CEA 1

Para o anticorpo ior-CEA-1 foram preparados diversos lotes de kits, com diferentes concentrações de anticorpo, MDP e estanho. Os parâmetros analisados foram diferenciados para cada lote, por esse motivo os resultados serão discriminados por lotes estudados.

❖ Lote A (0,5 mg de Ac, 25 μL de MDP e 2,5 μg de Sn^{2+})

Para este lote variou-se o volume e a atividade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ usado para reconstituir os kits, sendo 166,5 MBq (4,5 mCi) para 1,5 mL e 288,6 MBq (7,8 mCi) para 3,0 mL e a marcação foi acompanhada até 1 hora pós-adição do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, como mostra a FIG. 22.

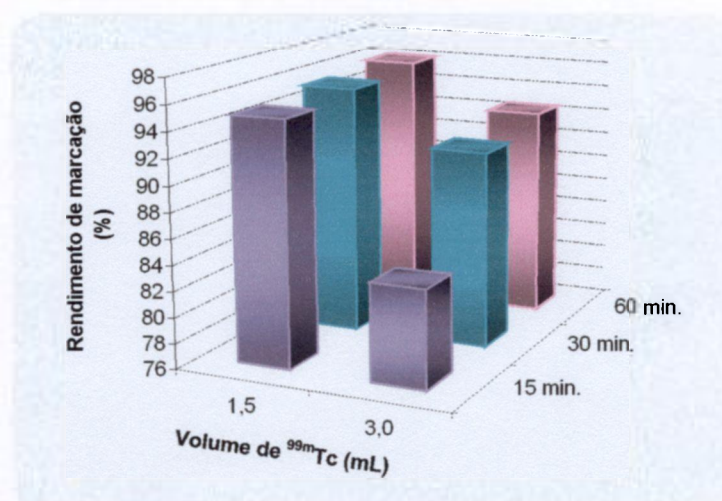


FIGURA 22 – Rendimento de marcação dos kits do Lote A.

O máximo rendimento de marcação obtido para os kits deste lote foi 95,5%, com o menor volume de ^{99m}Tc , o que já havia sido percebido nas marcações em solução aquosa. Aos 15 minutos com 3,0 mL, o rendimento ficou abaixo do permissível (83,5%) e chegou a 92,5% aos 60 minutos, mostrando que houve um aumento da quantidade de $^{99m}\text{Tc-Ac}$ com a diminuição de $^{99m}\text{Tc-MDP}$ durante o respectivo tempo, fato também observado com 1,5 mL.

❖ *Lote B (1 mg de Ac, 15 μL de MDP e 1,5 μg de Sn^{2+})*

Apesar de não ter tido sucesso com a baixa quantidade de MDP e estanho usada nas marcações do anticorpo em solução aquosa, foi preparado um lote usando-se pequenas quantidades dos mesmos. Foi usado 1 mL de ^{99m}Tc com diferentes atividades. O tempo de reação foi de 30 minutos e a estabilidade analisada até 24 horas pós-adição do ^{99m}Tc , FIG. 23.

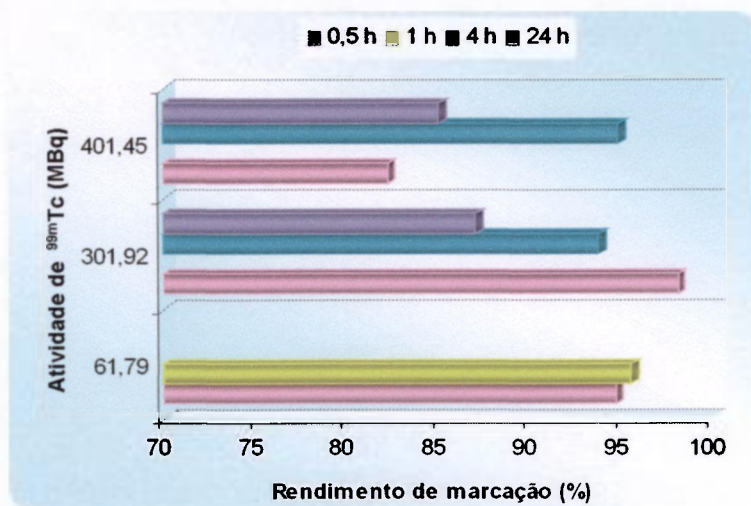


FIGURA 23 – Rendimento de marcação dos kits do Lote B.

Os kits deste lote tiveram bom rendimento de marcação, em média $93,0\% \pm 4$, até as primeiras 4 horas após a adição do ^{99m}Tc . Usando atividade de 61,79 MBq (1,67 mCi) nos dois tempos analisados (30 e 60 minutos) o rendimento de marcação ficou acima de 95,0%. Com 301,92 MBq (8,16 mCi), a 24 horas o rendimento caiu de 98,0 para 87,0%. Com 401,45 MBq (10,85 mCi), aos 30 minutos a marcação ficou em torno de 82,0%, atingindo um máximo após 4 horas (95,0%) e caindo novamente após 24 horas (85,1%).

❖ **Lote C (1 mg de Ac, 20 μ L de MDP e 2,0 μ g de Sn²⁺)**

Os kits deste lote foram preparados com uma quantidade maior de MDP e estanho do que os kits do lote B. Foi usado 103,6 MBq (2,8 mCi) de ^{99m}Tc em 1 mL e tempo de reação de 30 minutos. A marcação foi analisada até 120 minutos (2 horas) pós-adição do ^{99m}Tc. Os valores de rendimento de marcação obtidos são mostrados na TAB. 9.

TABELA 9 – Rendimento de marcação dos kits do Lote C.

Lote C	
Tempo após adição do ^{99m}Tc (h)	Rendimento de marcação (%)*
0,5	32,4 \pm 3,1
1	31,3 \pm 1,4
2	19,9 \pm 3,1

*média \pm DP (n = 3)

Foi observado na marcação dos kits deste lote que ao adicionar-se ^{99m}Tc ao kit, o mesmo formava “grumos” e não dissolvia corretamente. O baixo rendimento de marcação obtido para estes kits foi em consequência desta situação que não havia sido observada anteriormente.

Com o prosseguimento dos experimentos percebeu-se que essa formação de “grumos” foi decorrente do tempo de estocagem do anticorpo, que não possuía mais as qualidades do início do trabalho. Esta situação foi contornada mudando-se o tempo usado na redução dos anticorpos, como já discutido no item 4.1.

❖ **Lote D (1 mg de Ac, 29 μ L de MDP e 3,0 μ g de Sn²⁺)**

Este lote foi preparado com as melhores condições encontradas nas marcações do anticorpo em solução aquosa. Na marcação foram variados o volume e a atividade de ^{99m}Tc. O tempo de reação foi 30 minutos e a estabilidade acompanhada até 24 h, como mostra a TAB. 10.

TABELA 10 – Rendimento de marcação dos kits do Lote D.

Tempo (h)	Lote D		
	Rendimento de marcação (%)		
	1 mL de ^{99m}Tc		5 mL de ^{99m}Tc
	155,0 MBq	506,9 MBq	444,0 MBq
0,5	98,5	96,1	97,6
4	97,5	-	-
24	93,8	83,2	-

Os kits deste lote tiveram bom rendimento de marcação, confirmando os resultados encontrados nas marcações do anticorpo em solução aquosa. Com a atividade de ^{99m}Tc um pouco menor, 155,03 MBq, o anticorpo foi mais estável após 24 horas. Aos 30 minutos, tanto com 1 mL quanto com 5 mL de ^{99m}Tc , o rendimento de marcação foi satisfatório.

❖ *Lote E (1 mg de Ac, 38 μL de MDP e 4,0 μg de Sn^{2+})*

Este lote apenas foi analisado quanto a sua estabilidade após adição de 1 mL de ^{99m}Tc , com uma atividade de 185 MBq (5 mCi) como mostra a FIG. 24.

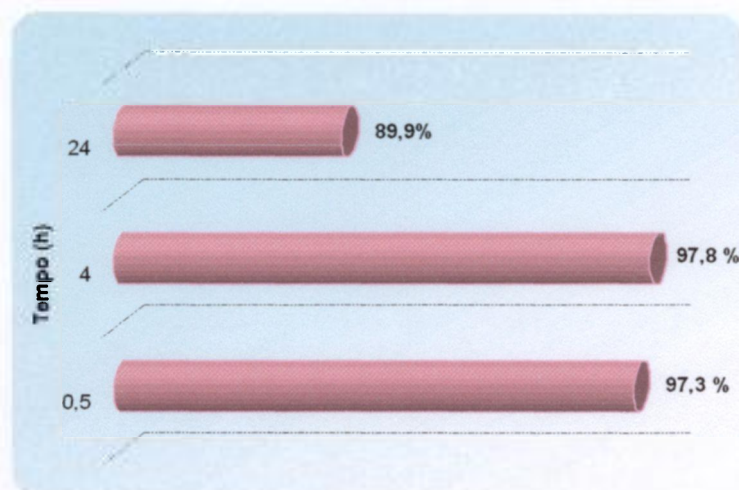


FIGURA 24 – Rendimento de marcação dos kits do Lote E e sua estabilidade.

Mesmo com uma quantidade maior de MDP, os kits deste lote apresentaram um bom rendimento de marcação até as primeiras 4 horas, não sendo tão estáveis após 24 horas da marcação.

❖ **Lote F (1 mg de Ac, 87 μ L de MDP e 9,0 μ g de Sn)**

Os kits deste lote foram usados para marcações com alta atividade de ^{99m}Tc . Foi usado 1998 MBq (54 mCi) de ^{99m}Tc em 1 mL e tempo de reação de 30 minutos, como mostra a TAB. 11.

TABELA 11 – Rendimento de marcação dos kits do Lote F.

Lote F	
Tempo de reação (min.)	Rendimento de marcação (%)
30	93,4

Este lote apresentou um rendimento de marcação de 93,4%. Mesmo aumentando o volume de kit de MDP, este valor ficou abaixo do conseguido na marcação de outros lotes. Isso pode ser explicado pela interferência da grande quantidade de MDP na marcação, sendo que o MDP marcado compete com o Ac marcado como mencionado por Ferro-Flores et al. [79].

❖ **Lote G (1,85 mg de Ac, 10 μ L de MDP e 1,0 μ g de Sn^{2+})**

Este foi o único lote preparado com maior massa de anticorpo (1,85 mg). A estabilidade foi estudada após a reconstituição dos kits com 1 mL de ^{99m}Tc (279,72 MBq = 7,56 mCi), como mostra a FIG. 25.

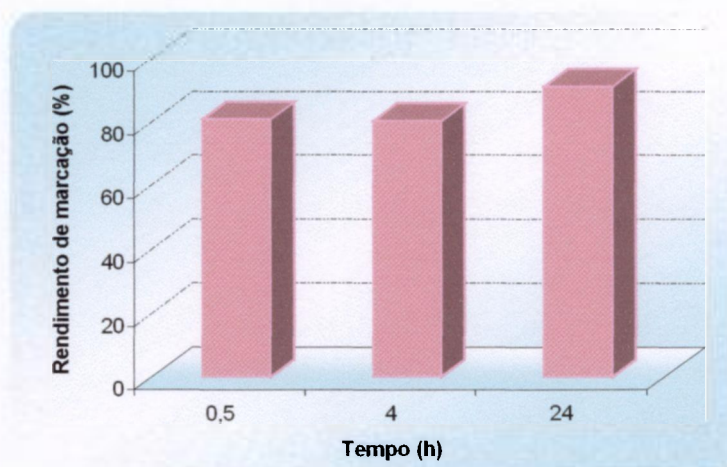


FIGURA 25 – Rendimento de marcação dos kits do Lote G.

Até as primeiras 4 horas o rendimento de marcação permaneceu praticamente inalterado (média de 80,5%) e só melhorou após 24 horas chegando aproximadamente a 90,0%. Ferro-Flores e Lezama-Carrasco [79] verificaram ao marcar o Ac CEA usando um kit de HEDP que o mecanismo de marcação é realizado via troca de ligantes e observaram que houve um aumento da quantidade de $^{99m}\text{Tc-Ac}$ com a diminuição de $^{99m}\text{Tc-HEDP}$ ao longo do tempo. Este fato pode explicar a melhora do rendimento de marcação obtida após 24 horas de marcação.

No geral os kits do anticorpo ior-CEA-1 tiveram bons rendimentos de marcação e foram estáveis até 4 horas após marcação. Os kits do Lote D preparados com as melhores condições (determinadas na marcação sem liofilização) foram os que apresentaram o melhor rendimento radioquímico e foram estáveis até 24 horas após adição do ^{99m}Tc . Os únicos kits que apresentaram rendimentos inferiores a 50% foram os do Lote C devido o problema de formação de grumos ao adicionar o ^{99m}Tc .

4.5.3 Marcação sem liofilização: ior-EGF/R3

A otimização da marcação foi realizada pela variação dos parâmetros incluindo massa de anticorpo (0,5, 1,0 e 2,0 mg), volume de MDP (10, 29 e 50 μL), massa de Sn^{2+} (1,0, 3,0 e 5,0 μg), atividade de ^{99m}Tc (54,39 – 1132,20 MBq [1,47 – 30,6 mCi]) e tempo de reação (5 - 45 minutos). A estabilidade radioquímica do complexo foi observada até 24 horas. O volume de ^{99m}Tc usado em todas as marcações foi 1 mL e o pH 7,0 manteve-se constante.

O primeiro estudo foi realizado variando o volume do kit de MDP e conseqüentemente a massa de estanho presente nas marcações (FIG. 26). Foi usado 1 mg de Ac, 203,5 MBq (5,5 mCi) em 1 mL de ^{99m}Tc .

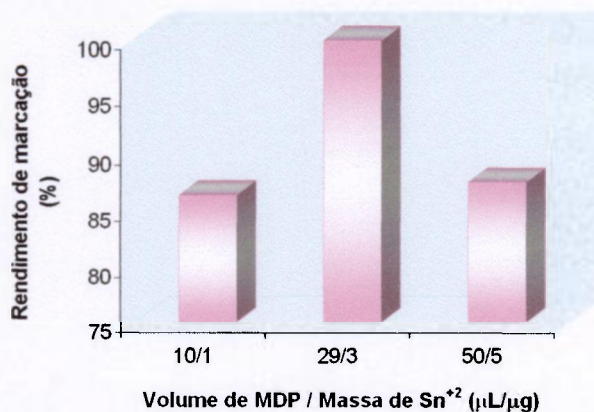


FIGURA 26 – Eficiência de marcação em relação à variação do volume do kit de MDP e a massa de estanho correspondente.

Com um baixo volume de MDP e menos massa de estanho o rendimento de marcação ficou abaixo de 90,0%, sendo a quantidade de redutor insuficiente para reduzir totalmente o tecnécio. Usando um volume maior de MDP e maior massa de estanho foi observado muita quantidade de MDP marcado, o que não é desejável. O melhor rendimento de marcação foi obtido com 29 μL de MDP (3,0 μg de Sn^{2+}), com rendimento superior a 99,0%, que está coerente com dados apresentados na literatura. Esta quantidade foi adotada para realização da variação dos outros parâmetros.

Posteriormente foi variada a massa de anticorpo para marcação, para tanto a quantidade de solução de MDP (e estanho) foi fixa (29 μL de MDP / 3,0 μg de Sn^{2+}) (FIG. 27). Foi usado 1 mL de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e uma média de 273,06 MBq (7,38 mCi).

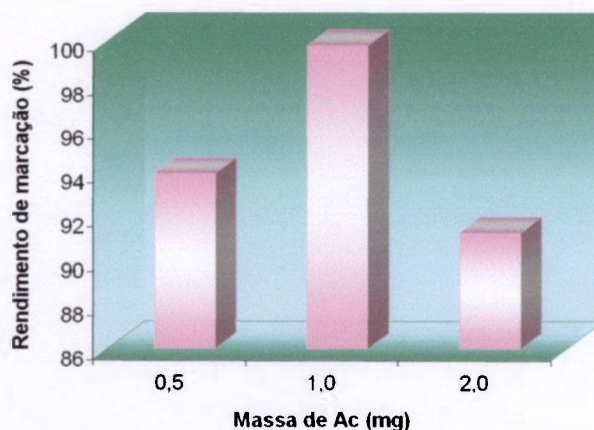


FIGURA 27 – Eficiência de marcação em relação a massa de anticorpo usada.

De acordo com os dados obtidos, percebe-se que as marcações com as três massas usadas apresentaram rendimento superior a 90,0%, mas o melhor resultado obtido foi com 1 mg.

Foi feito o estudo do efeito da variação da atividade de ^{99m}Tc no rendimento de marcação. Os valores obtidos estão representados na FIG. 28. Foi usado 1 mg de Ac, 29 μL de MDP, 3,0 μg de Sn^{2+} e 1 mL de ^{99m}Tc .

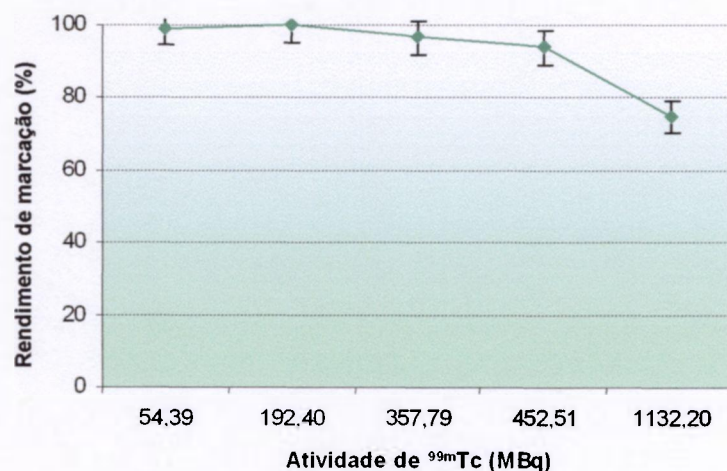


FIGURA 28 – Efeito da variação da atividade de ^{99m}Tc no rendimento de marcação.

O anticorpo permaneceu estável até a atividade 452,51 MBq (12,23 mCi). O melhor rendimento, 99,8%, foi obtido com 192,40 MBq (5,2 mCi). Quando foi usado 1132,20 MBq (30,6 mCi) esse valor caiu para 74,7%, mostrando que o anticorpo não foi estável em solução aquosa para altas atividades.

É mostrado na FIG. 29 o rendimento de marcação obtido nos diferentes tempos de reação estudados, mostrando uma ótima ligação do ^{99m}Tc ao anticorpo monoclonal, com eficiência de marcação numa média de $96,9\% \pm 1,6$ para todos os tempos estudados. Foi usado 1 mg de Ac, 29 μL de MDP, 3,0 μg de Sn^{2+} , 1 mL de ^{99m}Tc (192,4 MBq = 5,2 mCi).

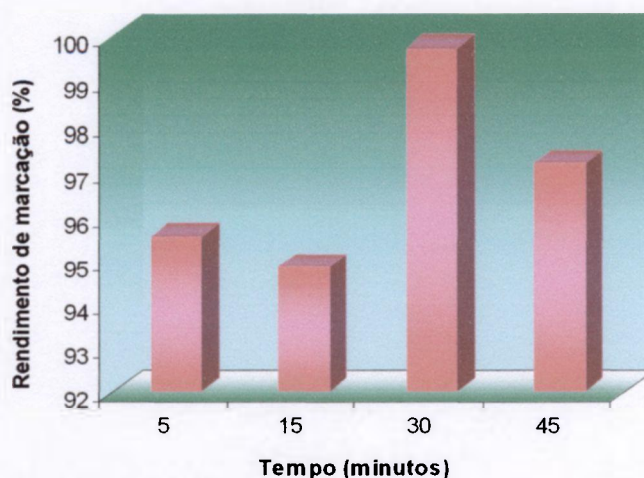


FIGURA 29 - Variação do rendimento de marcação (%) em relação ao tempo.

Observa-se pelos valores que o melhor rendimento de marcação (99,0%) foi obtido com um tempo de reação de 30 minutos. Este tempo de reação foi escolhido para marcação dos kits.

A estabilidade do anticorpo marcado foi acompanhada até 24 horas, como mostra a TAB. 12.

TABELA 12 – Estabilidade da marcação do anticorpo ior-EGF/R3

Tempo (horas)	Rendimento de marcação (%)
0,5	99,8
1	92,2
24	98,8

O anticorpo permaneceu estável nas primeiras 24 horas após adição do ^{99m}Tc com um ótimo rendimento de marcação (98,8%), mostrando que o processo de marcação foi eficiente sem a necessidade de purificação posterior.

As melhores condições encontradas foram: 1 mg de anticorpo, 29 μL do kit de MDP com uma massa correspondente de 3,0 μg de Sn^{+2} . O volume de ^{99m}Tc usado foi 1 mL e obteve-se bom rendimento de marcação com atividade até 452,51 MBq (12,23 mCi). O tempo de reação considerado adequado foi 30 minutos e o anticorpo marcado permaneceu estável até 24 horas.

4.5.4 Preparação e liofilização da formulação do anticorpo ior-EGF/R3 reduzido

Após a otimização dos parâmetros de marcação do anticorpo em solução, foi realizado o processo de liofilização para posterior realização do controle de qualidade dos kits. Foram preparados lotes liofilizados variando-se a massa de anticorpo, massa de Sn^{2+} e volume do kit de MDP como descrito na TAB. 13.

TABELA 13 – Composição usada na preparação dos lotes do anticorpo ior-EGF/R3

Lote	Massa de anticorpo (mg)	Volume do kit de MDP (μL)	Massa de Sn^{2+} (μg)
A'	1,0	29 ^c	3,0
B'	1,0	87 ^c	9,0

^cReferente à composição C do kit de MDP.

4.5.4.1 Marcação dos kits: ior-EGF/R3

Os parâmetros variados nas marcações foram o volume, a atividade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e o tempo de incubação após adição do $^{99\text{m}}\text{Tc}$. O valor do pH foi 7,0 e manteve-se constante em todas as marcações.

A FIG. 30 mostra o rendimento de marcação obtido em relação à variação do tempo de incubação (lote A').



FIGURA 30 – Rendimento de marcação em relação à variação do tempo de incubação.

O melhor tempo de incubação do anticorpo com ^{99m}Tc foi de 30 minutos, como confirmado com o anticorpo em solução aquosa no item 4.5.3. A média em todos os tempos foi de $94,0\% \pm 2,0\%$.

A TAB. 14 apresenta os rendimentos de marcação obtidos com a variação do volume de ^{99m}Tc usado para reconstituir o kit de anticorpo (lote A'). Tempo de reação de 30 minutos.

TABELA 14 - Comparação do rendimento de marcação com a variação do volume de ^{99m}Tc .

Volume de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (mL)	Rendimento de marcação (%)
1	97,9
3	72,1
5	97,2

Os valores obtidos com 1 e 5 mL de ^{99m}Tc foram satisfatórios, ficando numa média de $97,5\% \pm 0,4\%$. Com o volume de 3 mL o rendimento permaneceu abaixo do recomendado (72,1%), apresentando altos índices de impurezas. O que foi percebido na marcação do Ac ior-CEA 1 é que com esse volume de ^{99m}Tc consegue-se bons rendimentos de marcação, mas ocorreu alguma interferência nessa marcação do ior-EGF/R3 em particular que foi percebida posteriormente e o experimento não foi repetido.

Os kits foram testados usando alta atividade de ^{99m}Tc , o que é de importância à aplicação clínica do radiofármaco. Foi feita uma comparação entre os kits do lote A' (com 29 μL de MDP e 3,0 μg de Sn^{2+}) e do lote B' (com 87 μL de MDP e 8,0 μg de Sn^{2+}). Neste caso foi usado 1 mL de ^{99m}Tc e um tempo de reação de 30 minutos. Os resultados da cromatografia estão expressos na TAB. 15.

TABELA 15 – Rendimento de marcação em relação a altas atividades de ^{99m}Tc .

Lote	Atividade de ^{99m}Tc (MBq)	Rendimento de marcação (%)
A'	501,4	96,2
A'	2171,9	91,1
B'	1975,8	93,7
B'	2301,4	91,1

Analisando os resultados percebe-se que não houve grandes diferenças em relação aos lotes estudados. Usando praticamente a mesma atividade de ^{99m}Tc , 2171,9 e 2301,4 MBq (58,7 e 62,2 mCi), o rendimento de marcação dos dois lotes ficou muito próximo.

Com o prosseguimento dos experimentos, os kits começaram a apresentar baixos rendimentos de marcação e foi observado que ao adicionar ^{99m}Tc nesses kits, os mesmos estavam apresentando uma camada de espuma. Para saber se a velocidade de injeção do ^{99m}Tc estava interferindo na formação dessa espuma, foram realizados testes onde o vácuo do kit foi retirado com uma seringa e comparado com o kit normal (com vácuo).

A TAB. 16 apresenta os rendimentos de marcação (lote A') obtidos com o frasco normal (a vácuo) e sem vácuo (retirado com uma agulha).

TABELA 16 – Comparação do kit a vácuo e sem vácuo

	Normal	Sem vácuo
Rendimento de marcação (%)	21,3 ± 4,8	88,7 ± 2,4
	46,0 ± 1,3	78,9 ± 1,7
	69,4 ± 5,8	95,6 ± 0,1

Analisando os resultados da TAB. 16 nota-se que a retirada do vácuo dos frascos dos kits com agulha ajudou muito a melhorar o rendimento das marcações, chegando a melhorar de 69,4 para 95,6%. Contudo esse não foi considerado o melhor método para se melhorar os resultados e a solução encontrada foi aumentar o tempo de reação no processo de redução e o resultado encontrado foi bem satisfatório, como pode ser visto na TAB. 17.

TABELA 17 – Rendimento de marcação em relação ao tempo usado na redução do anticorpo.

Rendimento de marcação (%)	Tempo de reação (h)	
	1	2
	44,7	94,8
	47,2	96,2

Em uma análise geral, os kits do Lote A' apresentaram bons rendimentos de marcação. O tempo adequado foi de 30 minutos, como já havia sido comprovado na marcação sem liofilização. O volume de ^{99m}Tc mais apropriado foi 1 e 5 mL e a maior atividade para as condições do kit foi 2171,9 MBq (58,7 mCi). Após o aumento do tempo de reação da redução do anticorpo, não foi mais necessário à retirada do vácuo dos frascos.

Os kits do Lote B' tiveram bom rendimento de marcação usando 1 mL de ^{99m}Tc com uma atividade de até 2301,4 MBq (62,2 mCi).

4.6 Estabilidade dos kits

A estabilidade foi estudada em intervalos de tempo definidos após a marcação (0 – 24 h), como mostrado nos itens 4.5.1, 4.5.2.1, 4.5.3, 4.5.4.1 e em relação ao tempo de estocagem. Aqui serão apresentados os resultados da estabilidade em relação ao tempo de estocagem dos kits em geladeira. O rendimento de marcação foi analisado como descrito em 3.4.8.1.

A TAB. 18 apresenta os resultados dos kits do lote A' (1,0 mg de Ac ior-EGF/R3, 29 μL de MDP e 3,0 μg de Sn^{2+}) estocados por 2 meses em geladeira.

TABELA 18 - Estabilidade dos kits do Lote A' (ior-EGF/R3) após estocagem por diferentes períodos.

Lote A'			
Tempo (meses)	Rendimento de marcação (%)		
	1º kit	2º kit	3º kit
0	97,9	95,7	97,2
1	80,5	95,5	-
2	-	86,4	98,9

No primeiro estudo realizado, o rendimento inicial foi de 97,9% caindo para 80,5% após um mês de estocagem. No segundo estudo não houve diferença entre o rendimento inicial e após um mês de estocagem (95,7 e 95,5%) e após 2 meses o rendimento caiu para 86,4%. O terceiro estudo foi o mais satisfatório mostrando que o kit permaneceu estável após 2 meses de estocagem, apresentando um rendimento de marcação de 98,9%. No geral, os kits deste lote tiveram bom rendimento de marcação e mostraram-se estáveis após estocagem em geladeira.

Os resultados da estabilidade do lote B (1,0 mg de ior CEA-1, 15 μ L de MDP e 1,5 μ g de Sn^{2+}) são mostrados na TAB. 19.

TABELA 19 - Estabilidade dos kits do Lote B (ior CEA-1) após estocagem por diferentes períodos.

Lote B	
Tempo (meses)	Rendimento de marcação (%)
0	99,1
2	97,5
12	99,9
21	96,2

Mesmo usando uma pequena quantidade de MDP e Sn^{2+} na formulação dos kits deste lote, eles foram os que apresentaram melhores rendimentos de marcação em relação ao tempo de estocagem. O rendimento de marcação inicial obtido foi 99,1% e caiu para 96,2% após 21 meses de estocagem, mostrando a alta qualidade dos kits deste lote. Morales Morales et al. [87] tiveram uma eficiência de marcação de 90,0% após 1 ano de estocagem de um kit de ior- EGF/R3 com glicose como aditivo. Nota-se que os resultados apresentados na TAB. 19 foram muito superiores quando comparados aos do trabalho acima citado e não houve a necessidade de ser adicionado nenhum tipo de aditivo para manter a estabilidade dos kits do lote B após 1 ano de estocagem.

A estabilidade dos kits do lote D (1,0 mg de ior CEA-1, 29 μ L de MDP e 3,0 μ g de Sn^{2+}) foi acompanhada até 90 dias (3 meses) e os resultados são mostrados na TAB. 20.

TABELA 20 - Estabilidade dos kits do Lote D (ior CEA-1) após estocagem por diferentes períodos.

Lote D		
Tempo (dias)	Rendimento de marcação (%)	
	1º kit	2º kit
0	97,9	99,8
8	97,9	97,6
90	-	98,8

Não foi notada diferença nos primeiros 8 dias de estocagem dos kits e o rendimento de marcação manteve-se praticamente constante. No segundo estudo, o rendimento inicial obtido foi de 99,8% e após 3 meses esse valor foi de 98,8%. Morales Morales et al. [87] tiveram uma eficiência de marcação de 80,0% durante estocagem de 3 meses de um kit de ior-EGF/R3 sem uso de nenhum tipo de aditivo.

O lote E (1,0 mg de ior CEA-1, 38 μ L de MDP e 4,0 μ g de Sn^{2+}) foi estudado apenas após alguns dias de estocagem, como mostra a TAB. 21.

TABELA 21 - Estabilidade dos kits do Lote E (ior CEA-1) após estocagem por diferentes períodos.

Lote E	
Tempo (dias)	Rendimento de marcação (%)
0	98,0
8	97,7

Os kits deste lote apresentaram em média bom rendimento de marcação (97,8%) após 8 dias de estocagem.

De forma geral, foram obtidos bons rendimentos de marcação para todos os lotes analisados, comprovando a estabilidade dos kits após estocagem em geladeira.

4.7 Imunorreatividade

Quando se emprega um anticorpo monoclonal com fins diagnósticos ou terapêuticos, é essencial comprovar que o processo de marcação não danificou a região do anticorpo que reconhece o antígeno. A estabilidade da proteína deve ser estudada tanto do ponto de vista bioquímico quanto do ponto de vista imunológico verificando a conservação da capacidade de reconhecimento pelo antígeno [92].

A proporção do anticorpo marcado presente (atividade total) capaz de unir-se ao antígeno respectivo pode-se denominar de fração da imunorreatividade (FI) [92].

Uma forma sensível de realizar esta determinação em laboratório é mediante a imunocromatografia, onde se adsorve um excesso de antígeno puro sobre ITLC-SG ou outro suporte, aplica-se uma amostra do anticorpo marcado e desenvolve-se o cromatograma em um solvente que permita separar o complexo antígeno-anticorpo do anticorpo livre. Medindo-se a

atividade associada à fita, calcula-se a fração da imunorreatividade [92]. O método usado neste trabalho foi descrito no protocolo da AIEA [88].

Neste estudo foram utilizados os antígenos CEA e EGF/R (Scripps) assumidos serem eficientes e sem problemas estruturais. A etapa de preparação das fitas é muito importante e requer cuidados para não ocasionar resultados incorretos.

Para o anticorpo ior-CEA 1 a média conseguida da FI foi de $62,9 \pm 2,4\%$, mostrando que o processo de redução com 2-ME e marcação com ^{99m}Tc não afetou a sua capacidade de ligação ao antígeno. Este resultado está de acordo com o obtido por Seccamani et al. (1991) [98] que foi cerca de 60,0%, usando o método de cromatografia por imunoafinidade.

No caso do anticorpo ior-EGF/R3 a média da % FI obtida foi $45,4 \pm 0,7\%$, não sendo alcançada a faixa esperada de 60,0 – 70,0%. O que se percebeu para este anticorpo foi uma alta % de união inespecífica superando o limite de 20,0% permitido. Notou-se que o processo de marcação não afetou a imunorreatividade do anticorpo, mas verificou-se que este anticorpo reconheceu tanto o antígeno EGF/R quanto o soro fetal bovino usado como ligação inespecífica.

4.8 Desafio a cisteína

Transquelação para cisteína foi estudada em 5 razões molares. Foi observado que para a maior razão molar (8,3 mmol/L), o ^{99m}Tc -EGF/R3 foi relativamente mais suscetível ao ensaio de cisteína do que o ^{99m}Tc -CEA 1.

A maior razão molar demonstrada para causar deslocamento sugeriu que a resistência de ligação dos anticorpos- ^{99m}Tc foi bem alta (média de 17,2% para ior-CEA 1 e 20,5% para ior-EGF/R3), como mostra a FIG. 31.

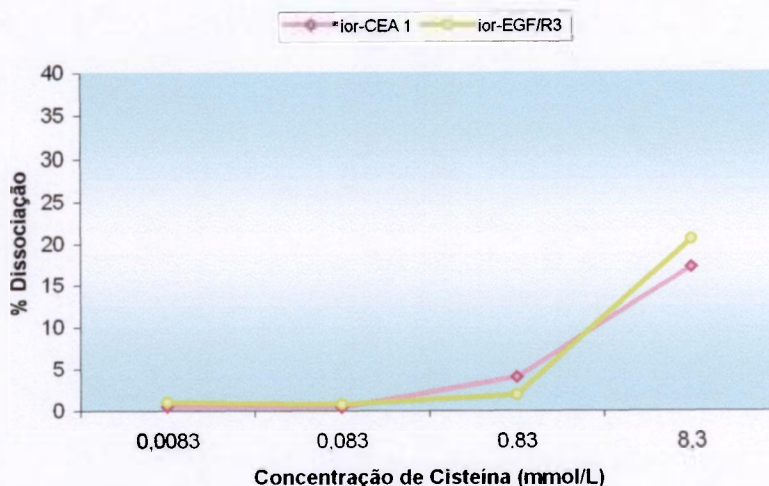


FIGURA 31 – Desafio a cisteína.

Embora a transquelação pela solução de cisteína ocorra lentamente, esta ligação pode ter um papel importante na estabilidade *in vitro* e *in vivo* do produto marcado.

A concentração máxima esperada de exposição do anticorpo *in vivo* é descrita na literatura sendo 1 mmol/L [25]. Fazendo-se o ajuste dos valores obtidos neste estudo para 1 mmol/L obteve-se 5,4% de dissociação para o anticorpo ior-CEA 1 e 2,1% para o anticorpo ior-EGF/R3, demonstrando a estabilidade *in vivo* dos anticorpos marcados.

Mardirossian e col. [99] sugeriram que a principal causa de instabilidade das proteínas marcadas com ^{99m}Tc era a transquelação do metal com a cisteína presente no sangue e tecidos. Por esta razão se realizam ensaios contra a cisteína para avaliar a estabilidade das moléculas marcadas. Em seus estudos, após 3 horas $75,4 \pm 1,4\%$ do anticorpo estava marcado.

Para o caso de anticorpos marcados diretamente com ^{99m}Tc , Hnatowich e col. [100] reportaram que a 3 horas mais de 40,0% da atividade transquela a cisteína com um excesso de 1:300.

Salteri e Mather [83] relataram valores aproximados de 10,0% e 50,0% de dissociação após 3 e 24 horas de incubação com excesso molar de 1:333 (cisteína:anticorpo) do anticorpo PR1A3 marcado de forma direta com ^{99m}Tc .

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os apresentados em literatura.

4.9 Estudos de imagem com os anticorpos marcados com ^{99m}Tc

As cintilografias foram realizadas em camundongos nude sadios e portadores de tumor de células AR42J (FIG. 32) após injeção intravenosa (iv) de cada solução de anticorpo marcado, ^{99m}Tc -CEA 1 e ^{99m}Tc -EGF/R3.

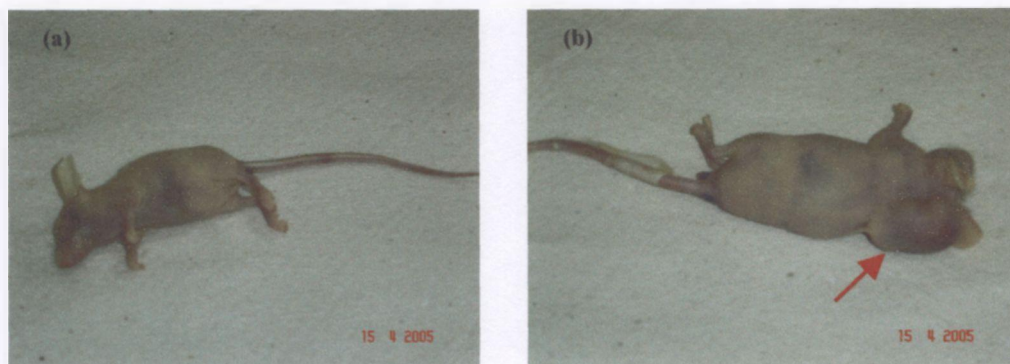


FIGURA 32 – Fotos dos camundongos usados no estudo: (a) camundongo sadio e (b) camundongo com tumor localizado no dorso (indicado pela seta).

As imagens estáticas adquiridas com um tempo de aquisição de 10 minutos, foram realizadas após 24 horas da injeção dos produtos. Os animais foram posicionados lateralmente na gama-câmara (FIG. 33) para uma melhor visualização do tumor.



FIGURA 33 – Posicionamento realizado para aquisição das imagens

Os resultados das imagens do camundongo normal (padrão) e da localização do tumor são mostrados nas FIG. 34 e 35.

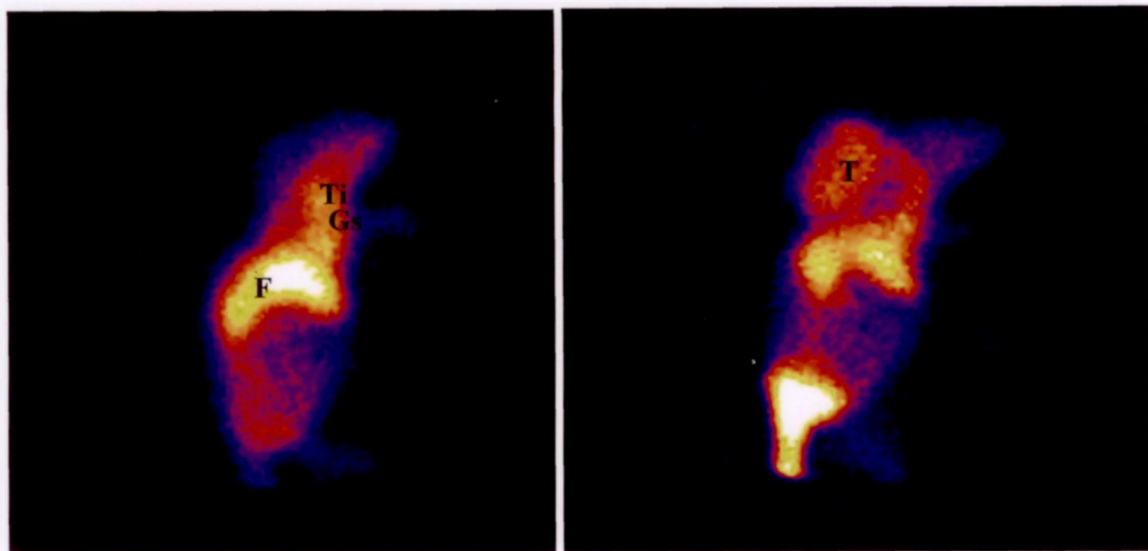


FIGURA 34 – Imagem de gama-câmara do camundongo normal (esquerda) e com tumor (direita) após 24 horas de injeção iv com o anticorpo ior-CEA-1 marcado com ^{99m}Tc . Foram visualizados: tumor (T), tireóide (Ti), glândulas salivares (Gs) e fígado (F).

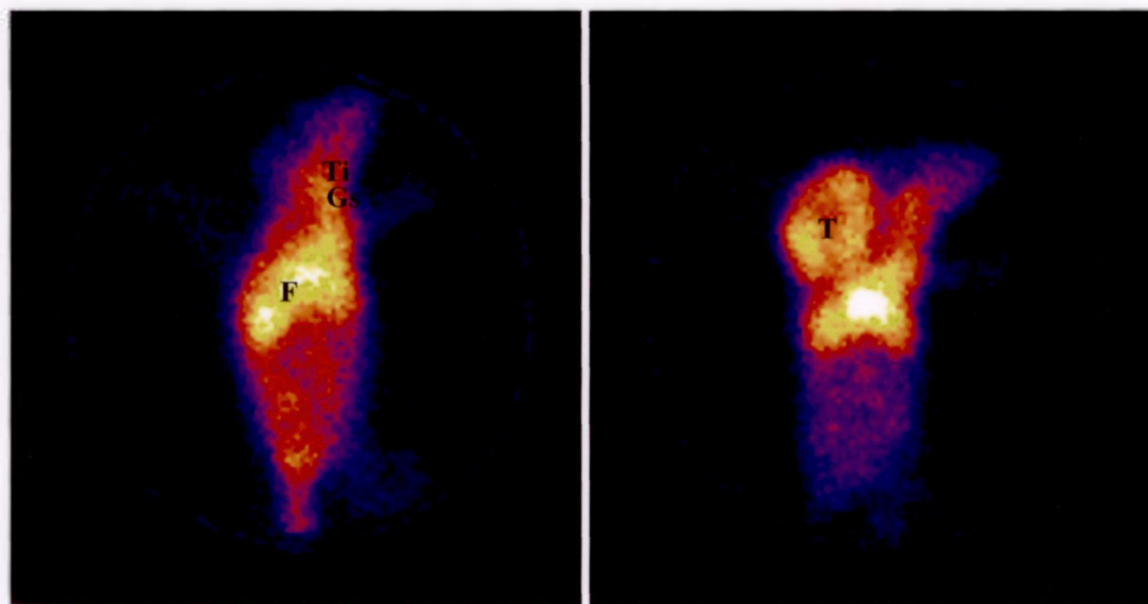


FIGURA 35 – Imagem de gama-câmara do camundongo normal (esquerda) e com tumor (direita) após 24 horas de injeção iv com o anticorpo ior-EGF/R3 marcado com ^{99m}Tc . Foram visualizados: tumor (T), tireóide (Ti), glândulas salivares (Gs) e fígado (F).

Pelas imagens percebe-se que houve uma alta captação dos anticorpos marcados no tumor, tanto para o ior-CEA 1 quanto para o ior-EGF/R3.

Na FIG. 34 observa-se um acúmulo de atividade na cauda do camundongo com tumor, devido à dificuldade na hora de injeção do radiofármaco, ocasionando uma retenção no local.

Para quantificação das imagens, foi estabelecido a radioatividade retida no camundongo inteiro e depois no tumor, fornecendo a % de captação em relação ao corpo inteiro como mostrado na TAB. 22.

TABELA 22 – Porcentagem (%) de dose captada no tumor em relação ao corpo inteiro.

Anticorpo	% de dose captada no tumor
ior-CEA 1	14,7
ior-EGF/R3	26,0

Com este tipo de medida não dá para saber a % de captação em relação à dose injetada, consegue-se apenas saber a % em relação ao corpo inteiro no momento do sacrifício. A diferença observada entre os dois anticorpos provavelmente é devido a quantidade de fármaco que ficou no local de injeção para o camundongo injetado com o anticorpo ior-CEA 1 (FIG. 34).

Para ambos anticorpos marcados, nenhuma acumulação seletiva foi vista nos órgãos sadios, com exceção das glândulas salivares, tireóide, fígado e estômago, tanto nos camundongos sadios quanto nos com tumor.

A visualização da tireóide, glândulas salivares e estômago pode ser resultado de uma pequena quantidade de pertecnetato livre decorrente da degradação dos produtos marcados, como já observado por Ramos-Suzarte et al. [76].

O fígado mostrou alta captação em relação aos outros órgãos e isto sugere que ele pode ser considerado o maior órgão de catabolismo [78] e metabolismo de proteínas radiomarcadas e seus produtos de degradação [84, 98]. Notou-se então que para anticorpos marcados podemos ter 2 vias de excreção: a renal e fecal. Neste estudo percebeu-se a predominância da excreção fecal.

Alguns autores [27, 82, 83, 85] em estudos de biodistribuição com anticorpos marcados em camundongos, observaram que além do sangue, os órgãos que tiveram a % de dose injetada por grama de tecido mais significativa foram os rins, pulmões, fígado, baço e

intestino. Com isso, percebe-se que os órgãos visualizados nas imagens obtidas neste estudo estão de acordo com o esperado pela literatura.

De acordo com Fritzberg (1987) [43], em estudo realizado com fragmentos de anticorpos, a localização significativa do produto marcado no tumor foi vista após 4 horas da injeção e conseguiu-se um bom clareamento central do corpo após 10 horas, indicando um clareamento sanguíneo lento típico de anticorpos monoclonais. Considerando o resultado encontrado por este e outros autores, a localização do tumor foi demonstrada com sucesso após 24 horas de injeção dos anticorpos marcados e as cintilografias obtidas comprovaram a eficiência do radiofármaco.

5. CONCLUSÕES

A metodologia de marcação, liofilização e controle de qualidade usada permite a preparação de um kit estável de anticorpos monoclonais para distribuição à classe médica, onde os produtos podem ser obtidos com alto rendimento radioquímico assegurando sua eficácia no radiodiagnóstico.

Do lado experimental destacam-se:

1. A redução dos anticorpos ior-CEA-1 e ior-EGF/R3 foi eficiente, com uma boa porcentagem de recuperação da proteína reduzida.
2. Estabeleceu-se uma relação entre a massa de anticorpo e o tempo de redução usado.
3. A análise das frações reduzidas dos anticorpos em CLAE foi importante para determinar a pureza dessas frações quanto à presença do redutor 2-ME considerado um contaminante, otimizando assim a escolha das frações usadas para marcação sem liofilização ou para compor os kits.
4. O número de grupos livres -SH encontrado para os dois anticorpos foi satisfatório, comprovando sua importância no processo de marcação.
5. Este trabalho mostrou a importância de se estabelecer as melhores condições de marcação em solução antes do processo de liofilização.
6. Os kits mostraram-se estáveis quando estocados em geladeira, provando que o processo de formulação e liofilização foi eficiente.
7. A radiomarcção dos anticorpos com ^{99m}Tc não afetou a imunorreatividade dos mesmos.
8. O ^{99m}Tc -EGF/R3 foi mais suscetível ao desafio a cisteína do que o ^{99m}Tc -CEA-1, mas no geral ambos mostraram-se estáveis na presença da cisteína.
9. Nas imagens não foi vista nenhuma acumulação seletiva nos órgãos sadios (para os dois anticorpos) com exceção da tireóide, glândulas salivares, fígado e estômago. A localização do tumor foi demonstrada com sucesso após 24 horas de injeção dos anticorpos marcados.
10. Verificou-se a partir dos resultados obtidos que o processo de marcação com ^{99m}Tc pelo método direto foi simples e eficiente, tanto para a formulação em solução quanto para a formulação liofilizada, apresentando pureza radioquímica maior que 95%.
11. As principais dificuldades deste trabalho vieram da falta de obtenção de anticorpos com certificado de qualidade, essencial para estabelecimento da produção rotineira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. XXXI, n. 4, p. 260-277, 2001.
- 2 MATHER, S. J. New horizons in radiopharmaceuticals. **IAEA BULLETIN**, v. 45/1, p. 62-65, 2003.
- 3 FUKUDA, H.; KUBOTA, K. Recent developments and future aspects of nuclear medicine in oncology. **International Congress Series**, 1228, p. 107-116, 2002.
- 4 Radiações ionizantes: Aplicações e cuidados. Site:
<http://www.segurancaetrabalho.com.br/download/rad-ion-cuidados.pdf> acessado em: 14/06/2005.
- 5 VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Therapeutic radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, n. 9, p. 2269-2292, 1999.
- 6 OLIVEIRA, A. *Desenvolvimento da Tecnologia de Preparo de Geradores de ^{188}W - ^{188}Re* . 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 7 PERERA, A.; LEYVA, R.; GAMBOA, R.; ALBERDI, L.; XIQUES CASTILLO, A. Marcaje del anticuerpo monoclonal humanizado H-R3 con ^{188}Re . **Nucleus**, n. 33, p. 64-68, 2003.
- 8 WUNDERLICH, G.; PINKERT, J.; STINTZ, M.; KOTZERKE, J. Labeling and biodistribution of different particle materials for radioembolization therapy with ^{188}Re . **Applied Radiation and Isotopes**, 62, p. 745-750, 2005.
- 9 OLIVIER, P. Nuclear oncology, a fast growing field of nuclear medicine. **Nucl. Instruments and Methods in Physics Research A**, 527, p. 4-8, 2004.
- 10 STERN, M.; HERRMANN, R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, p. 1-19, 2005.
- 11 NAVARRO, B. G.; PARADA, A. C.; ALVAREZ, P.; LEON, A.; SANTANA, E.; BADA, A.; FIGUEREDO, R.; IZNAGA-ESCOBAR, N.; PEREZ, R. Local and systemic toxicity of h-R3, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, labeled with ^{188}Os mium after the intracerebral administration rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 56, p. 313-319, 2005.
- 12 FANI, M.; VRANJES, S.; ARCHIMANDRITIS, S. C.; POTAMIANOS, S.; XANTHOPOULOS, S.; BOUZIoTIS, P.; VARVARIGOU, A. D. Labeling of monoclonal antibodies with ^{153}Sm for potential use in radioimmunotherapy. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 57, p. 665-674, 2002.

13 PAGANELLI, G.; CHINOL, M.; STOLDT, H. S.; AFTAB, F.; GERAGHTY, J.; SICCARDI, A. G. Radiomunological therapy. **Clinical Nucl. Med.**, v. 3, p. 39-52, 1998.

14 STIMAC, G.K. *Introdução ao diagnóstico por imagem*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p.417.

15 ENCONTRO PAULISTA DE FÍSICA MÉDICA E PROTEÇÃO RADIOLÓGICA, 30 nov. - 01 dez., 2000. São Paulo. **Anais**.

16 MARSDEN, P. K. Detector technology challenges for nuclear medicine and PET. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, 513, p. 1-7, 2003.

17 WIELE, C. van de; LAHORTE, C.; OYEN, W.; BOERMAN, O.; GOETHALS, I.; SLEGERS, G.; DIERCKX, R. A. Nuclear Medicine imaging to predict response to radiotherapy: a review. **Int. Rad. Oncol. Biol. Phys.**, v. 55, n. 1, p. 5-15, 2003.

18 ÖBERG, K.; ERIKSSON, B. Nuclear medicine in the detection, staging and treatment of gastrointestinal carcinoid tumours. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 265-276, 2005.

19 Site: <http://www.medical.philips.com/main/products/pet/products/gemini/imagegallery> acessado em: 18/07/2005.

20 Site:

<http://www.medical.philips.com/main/products/pet/products/gemini/clinicalimages/07/index.asp> acessado em: 18/07/2005.

21 MORAES, V. *Desenvolvimento de um método de Preparação de um Traçador de Estanho, o ^{117m}Sn , a partir da irradiação de Estanho Natural com Feixe de Prótons do Ciclotron do IPEN*. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

22 Site: http://www.bwzk.uni-mainz.de/15_nuk/welcome.html Acessado: 10/08/2005.

23 ALFASSI, Z. B.; GROUPI, F.; BONARDI, M. L.; GOEIJ, J. J. M. On the “artificial” nature of Tc and the “carrier-free” nature of ^{99m}Tc from ^{99}Mo - ^{99m}Tc generators. **Applied Radiation and Isotopes**, 63, p. 37-40, 2005.

24 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.**, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001.

25 FAINTUCH, B. L.; PEREIRA, N. P. S.; FAINTUCH, S.; MURAMOTO, E.; SILVA, C. P. G. Lanreotide and octreotide complexed with technetium-99m: labeling, stability and biodistribution studies. **Brazilian J. of Pharm. Sciences**, v. 40, n. 1, p. 101-110, 2004.

26 SAKAHARA, H.; SAGA, T. Avidin-biotin system for delivery of diagnostic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 37, p. 89-101, 1999.

27 MORALES MORALES, A. A.; DUCONGÉ, J.; ALVAREZ-RUIZ, D.; BECQUER-VIART, M. L. A.; NÚÑEZ-GANDOLFF, G.; FERNÁNDEZ, E.; CABALLERO-TORRES, I.; IZNAGA-ESCOBAR, N. Humanized versus murine anti-human epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for imunoscintigraphic studies. **Nucl. Med. Biol.**, v. 27, p. 199-206, 2000.

28 LIU, S.; EDWARDS, D. S. ^{99m}Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, n. 9, p. 2235-2268, 1999.

29 GOODEN, C. S. R.; SNOOK, D. E.; MARAVEYAS, A.; ROWLINSON-BUSZA, G.; PETERS, A. M.; EPENETOS, A. A. Direct technetium-99m labeling of three anticancer monoclonal antibodies: stability, pharmacokinetics and imaging. **J. Nucl. Med.**, v. 36, n. 5, p. 842-849, 1995.

30 CASTIGLIA, S. G.; DURAN, A.; FISZMAN, G.; HORENSTEIN, A. L. ^{99m}Tc direct labeling of anti-CEA monoclonal antibodies: quality control and preclinical studies. **Nucl. Med. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 367-372, 1995.

31 MEASE, R. C.; LAMBERT, C. Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. XXXI, n. 4, p. 278-285, 2001.

32 HNATOWICH, D. J.; VIRZI, F.; WINNARD, P.; FOGARASI JÚNIOR, M.; RUSCKOWSKI, M. Investigations of ascorbate for direct labeling of antibodies with technetium-99m. **J. Nucl. Med.**, v. 35, p. 127-134, 1994.

33 THAKUR, M. L.; De FULVIO, J.; RICHARD, M. D.; PARK, C. H. Technetium-99m labeled monoclonal antibodies: Evaluation of reducing agents. **Nucl. Med. Biol.**, v. 18, n. 2, p. 227-233, 1991.

34 RHODES, B. A.; TARVESTAD, D. A.; BRESLOW, K.; VALDEZ, E. F. A kit for direct labeling of antibody and antibody fragments with Tc-99m [Abstract]. **J. Nucl. Med.**, v. 21, p. 54, 1980.

35 PAK, K. Y.; NEDELMAN, M. A.; STEWART, R.; DEAN, R. T. A rapid and efficient method for labeling IgG antibodies with Tc-99m and comparison to Tc-99m Fab' antibody fragments. [Abstract]. **J. Nucl. Med.**, v. 30, n. 5, p. 793, 1989.

36 FRITZBERG, A. R.; KASINA, S.; RENO, J. M.; SRINIVASAN, A.; WILBUR, D. S.; VANDERHEYDEN, J. L.; SCHROFF, R. W.; MORGAN Jr, A. C. Radiolabeling of antibodies with Tc-99m using N₂S₂ ligands. [Abstract]. **J. Nucl. Med.**, v. 27, n. 6, p. 957, 1986.

37 ARANO, Y.; YOKOYAMA, A.; MAGATA, Y.; HORIUCHI, K.; SAJI, H.; TORIZUKA, K. In the procurement of stable ^{99m}Tc labeled protein using bifunctional chelating agent. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 37, n. 7, p. 587 – 592, 1986.

38 GANO, L.; FERNANDES, C.; CANTINHO, G.; SANTOS, A. I.; PENA, H.; VIEIRA, R.; SALGADO, L.; PATRÍCIO, L. Technetium-99m labelling of the IOR CEA 1 monoclonal antibody: Evaluation of different methods. **Nuklearmedizin**, v. 36, p. 205-212, 1997.

39 CASTIGLIA, S. G. Marcación de proteínas con ^{99m}Tc . **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.**, v. 37, n. 2, p. 181-187, 2003.

40 STEIGMAN, J.; WILLIAMS, H. P.; SOLOMAN, N. A. The importance of the protein sulfhydryl group in HSA labeling with technetium-99m. **J. Nucl. Med.**, v. 16, p. 573 – 577, 1975. Apud ref. n° 53.

41 PAIK, C. H.; REBA, R. C.; ECKELMAN, W. C. Method of stably radiolabeling antibodies with technetium and rhenium. **US Patent**, 4, 652, 440, 1987. Apud ref. n° 39

42 MATHER, S. J.; ELLISON, D. Reduction-mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. **J. Nucl. Med.**, v. 31, n. 5, p. 692-697, 1990.

43 FRITZBERG, A. R. Advances in ^{99m}Tc -labeling of antibodies. **Nuklearmedizin**, v. 26, p. 7-12, 1987.

44 ABRAMS, M. J.; JUWEID, M.; TENKATE, C. L.; SCHWART, D. A.; HAUSER, M. M.; GAUL, F. E.; et al. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hidrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. **J. Nucl. Med.**, v. 31, p. 2022 – 2028, 1990.

45 OKADA, H.; TOLEDO E SOUZA, I. T.; OSSO JUNIOR, J. A. **Aspectos práticos de produção e aplicação de anticorpos monoclonais como radiofármacos**. Ipen-Pub-367, São Paulo, Abril, p. 1-66, 1992.

46 O Anticorpo: Estrutura da molécula de imunoglobulina. Site:
<http://rbi.fmrp.usp.br/imunobiol/aulas/t3.htm> Acessado em: 10/08/2005.

47 Site: <http://rbi.fmrp.usp.br/imunobiol/aulas/sv15115195.jpg> Acessado em: 10/08/2005.

48 Anticorpos: Estrutura e Função. Site:
<http://www.pucrs.br/fabio/imunopage/aula04.doc> Acessado em: 10/08/2005.

49 PRESSMAN, D.; KEIGHLIY, G. The zone of activity of antibodies as determined by the use of radioactive tracers: the zone of activity of nephrotoxic anti-kidney serum. **J Immunol.**, v. 59, p. 141 – 146, 1948. Apud ref. n° 50.

- 50 FINN, R.; CHEUNG, N. K. V.; DIVGI, C.; GERMAIN, J. ST.; GRAHAM, M.; PENTLOW, K.; LARSON, S. M. Technical challenges associated with the radiolabeling of monoclonal antibodies utilizing short-lived, positron emitting radionuclides. **Nucl. Med. Biol.**, v. 18, n. 1, p. 9-13, 1991.
- 51 KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495 – 497, 1975. Apud ref. n° 52.
- 52 KHAW, B. A. Antibodies as delivery systems for diagnostic functions. **Advanced drug delivery reviews**, 37, p. 63-80, 1999.
- 53 BRITTON, K. E.; GRANOWSKA, M.; MATHER, S. J. Radiolabelled monoclonal antibodies in oncology I. Technical aspects. **Nucl. Med. Comm.**, v. 12, p. 65-76, 1991.
- 54 FREIRE, C. A. Terapia com anticorpos monoclonais. Site: http://www.jornaldomedico.hpg.ig.com.br/terapia_antikorpos_monoclonais.htm Acessado em: 10/08/2005.
- 55 KEENAN, A. M.; HARBERT, J. C.; LARSON, S. M. Monoclonal antibodies in Nuclear Medicine. **J. Nucl. Med.**, v. 26, n. 5, p. 531-537, 1985.
- 56 SERAFINI, A. N. From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units: an overview. **J. Nucl. Med.**, v. 34, n. 3, p. 533-536, 1993.
- 57 MACH, J. P.; BUCHEGGER, F.; FORNI, M.; et al. Use of radiolabeled monoclonal anticarcinoembryonic antigen antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomoscintigraphy. **Immunol. Today**, v. 2, p. 239 – 249, 1981. Apud ref. n° 55
- 58 LARSON, S. M.; BROWN, J. P.; WRIGHT, P. W.; et al. Imaging of melanoma with I-131-labeled monoclonal antibodies. **J. Nucl. Med.**, v. 24, p. 123 – 129, 1983. Apud ref. n° 55
- 59 MOLDOFSKY, P. J.; SEARS, H. F.; MULHEARN Jr., C. B.; et al. Detection of metastatic tumor in normal-sized retroperitoneal lymph nodes by monoclonal-antibody imaging. **N. Engl. J. Med.**, v. 311, p. 106 – 107, 1984. Apud ref. n° 55
- 60 IZNAGA-ESCOBAR, N.; NÚÑEZ-GANDOLFF, G.; MORALES-MORALES, A. ^{99m}Tc-ior cea 1. **Drugs of the Future**, v. 25, n. 4, p. 351-355, 2000.
- 61 GNANASEGARAN, G.; CROASDALE, J.; BUSREMBE, J. R. Part-I. Radiopharmaceuticals. **World J. Nucl. Med.**, v. 3, n. 2, p. 155-165, 2004.
- 62 ECKELMAN, W. C.; PAIK, C. H.; STEIGMAN, J. Three approaches to radiolabeling antibodies with ^{99m}Tc. **Nucl. Med. Biol.**, v. 16, n. 2, p. 171-176, 1989.

63 BLOK, D.; FEITSMA, R. I. J.; WASSER, M. N. J. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; PAUWELS, E. K. J. A new method for protein labeling with ^{99m}Tc . **Nucl. Med. Biol.**, v. 16, n. 1, p. 11-16, 1989.

64 BOSSLET, K.; STEINSTRÄSSER, A.; SCHWARZ, A.; HARTHUS, H. P.; LÜBEN, G.; KUHLMANN, L.; SEDLACEK, H. H. Quantitative considerations supporting the irrelevance of circulating serum CEA for the immunoscintigraphic visualization of CEA expressing carcinomas. **Eur. J. of Nucl. Med.**, p. 1-6, 1988.

65 AQUINO, A.; FORMICA, V.; PRETE, S. P.; CORREALE, P. P.; MASSARA, M. C.; TURRIZIANI, M.; DeVECCHIS, L.; BONMASSAR, E. Drug-induced increase of carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. **Pharmacological Research**, 49, p. 383-396, 2004.

66 ZHUANG, H. S.; HUANG, J. L.; CHEN, G. N. Synthesis of a new biacridine and its use as the chemiluminescent probe for immunoassay of carcinoembryonic antigen. **Analytica Chimica Acta**, 512, p. 347-353, 2004.

67 NOVAK-HOFER, I.; BLÄUENSTEIN, P.; SCHUBIGER, P. A. Regulation of the cell surface expression of a nonspecific cross-reacting antigen variant during differentiation of HL-60 cells. **Cancer Research**, v. 50, p. 7437-7443, 1990.

68 ALBANOPOULOS, K.; ARMAKOLAS, A.; KONSTADOULAKIS, M. M.; LEANDROS, E.; TSIOBANOU, E.; KATSARAGAKIS, S.; ALEXIOU, D.; ANDROULAKIS, G. Prognostic significance of circulating antibodies against carcinoembryonic antigen (anti-CEA) in patients with colon cancer. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 4, p. 1056-1061, 2000.

69 HAIDOPOULOS, D.; KONSTADOULAKIS, M. M.; ANTONAKIS, P. T.; ALEXIOU, D. G.; MANOURAS, A. M.; KATSARAGAKIS, S. M.; ANDROULAKIS, G. F. Circulating anti-CEA antibodies in the sera of patients with breast cancer. **Eur. J. of Surgical Oncology**, 26, p. 742-746, 2000.

70 IZNAGA-ESCOBAR, N. E.; TORRES, L. A.; MORALES, A.; RAMOS, M.; RODRÍGUEZ, N.; FRAXEDAS, R.; PÉREZ, N.; ALVAREZ, I.; RODRÍGUEZ, O.; STABIN, M. G. Human pharmacokinetics, biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -labeled monoclonal antibody for egf/r3 in patients with tumors of epithelial origin: Preliminary results. **Proceeding of 4th meeting on nuclear applications. IV ENAN**, v. 2, p. 753-758, 1997.

71 IZNAGA-ESCOBAR, N.; TORRES, L. A.; MORALES, A.; RAMOS, M.; ALVAREZ, I.; PÉREZ, N.; FRAXEDAS, R.; RODRÍGUEZ, O.; RODRÍGUEZ, N.; PÉREZ, R.; LAGE, A.; STABIN, M. G. Technetium-99m-labeled anti-EGF-receptor antibody in patients with tumor of epithelial origin: I. Biodistribution and dosimetry for radioimmunotherapy. **J. Nucl. Med.**, v. 39, p. 15-23, 1998.

72 MORALES-MORALES, A.; DUCONGÉ, J.; CABALLERO-TORRES, I.; NÚÑEZ-GANDOLFF, G.; FERNÁNDEZ, E.; IZNAGA-ESCOBAR, N. Biodistribution of ^{99m}Tc -labeled anti-human epidermal growth factor receptor (EGF-R) humanized monoclonal antibody h-R3 in a xenograft model of human lung adenocarcinoma. **Nucl. Med. Nucl.**, v. 26, p. 275-279, 1999.

73 DAVIEST, D. E.; CHAMBERLIN, S. G. Targeting the epidermal growth factor receptor for therapy of carcinomas. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 1101-1110, 1996.

74 LASKIN, J. J.; SANDLER, A. B. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. **Cancer treatment reviews**, 30, p. 1-17, 2004.

75 DUCONGE, J.; CASTILLO, R.; CROMBET, T.; ALVAREZ, D.; MATHEU, J.; VECINO, G.; ALONSO, K.; BEAUSOLEIL, I.; VALENZUELA, C.; BECQUER, M. A.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, E. Integrated pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and allometric scaling for optimizing the dosage regimen of the monoclonal ior EGF/r3 antibody. **Eur. J. Pharm. Sciences**, 21, p. 261-270, 2004.

76 RAMOS-SUZARTE, M.; RODRÍGUEZ, N.; OLIVA, J. P.; IZNAGA-ESCOBAR, N.; PERERA, A.; MORALES, A.; GANZALEZ, N.; CORDERO, M.; TORRES, L.; PIMENTEL, G.; BORRÓN, M.; GONZÁLEZ, J.; TORRES, O.; RODRÍGUEZ, T.; PÉREZ, R. ^{99m}Tc -labeled antihuman epidermal growth factor receptor antibody in patients with tumors of epithelial origin: Part III. Clinical trials safety and diagnostic efficacy. **J. Nucl. Med.**, v. 40, n. 5, p. 768-775, 1999.

77 BAUM, R. P.; HERTEL, A.; LORENZ, M.; SCHWARZ, A.; ENCKE, A.; HÖR, G. ^{99m}Tc -labelled anti-CEA monoclonal antibody for tumour immunoscintigraphy: first clinical results. **Nucl. Med. Comm.**, v. 10, p. 345-352, 1989.

78 PAK, K. Y.; NEDELMAN, M. A.; TAM, S. H.; WILSON, E.; DADDONA, P. E. Labeling and stability of radiolabeled antibody fragments by a direct ^{99m}Tc -labeling method. **Nucl. Med. Biol.**, v. 19, n. 6, p. 669-677, 1992.

79 FERRO-FLORES, G.; LEZAMA-CARRASCO, J. A freeze dried kit formulation for the preparation of ^{99m}Tc -EHDP-MoAb-IOR CEAl complex. **Nucl. Med. Biol.**, v. 21, n. 7, p. 1013-1016, 1994.

80 IZNAGA ESCOBAR, N.; MORALES, A.; NÚÑEZ, G. A computer program for quantification of SH groups generated after reduction of monoclonal antibodies. **Nucl. Med. Biol.**, v. 23, p. 635-639, 1996.

81 IZNAGA ESCOBAR, N.; MORALES, A.; NÚÑEZ, G. Micromethod for quantification of SH groups generated after reduction of monoclonal antibodies. **Nucl. Med. Biol.**, v. 23, p. 641-644, 1996.

82 KARUBE, Y.; KATSUNO, K.; TAKATA, J.; MATSUNAGA, K.; HARUNO, M.; KUROKI, M.; ARAKAWA, F.; MATSUOKA, Y.; KANDA, H. Radioimmunosintigraphy using technetium-99m-labeled parental mouse and mouse-human chimeric antibodies to carcinoembryonic antigen in athymic nude mice bearing tumor. **Nucl. Med. Biol.**, v. 23, n. 6, p. 753-759, 1996.

83 STALTERI, M. A.; MATHER, S. J. Technetium-99m labelling of the anti-tumour antibody PR1A3 by photoactivation. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 23, n. 2, p. 178-187, 1996.

84 OLIVA, J. P.; OSORIO, M.; PIMENTEL, G.; BORRÓN, M.; DOPICO, R.; ORTIZ, R.; VELAZCO, M.; RAMOS, M.; COLLAZO, A.; COLLAZO, M.; BAUM, R. P. Detección de una metástasis cerebral desconocida empleando la radioinmunocentelleografía con el anticuerpo monoclonal IOR-EGF-R3-^{99m}Tc. **Rev. Esp. Med. Nucl.**, v. 16, n. 5, p. 321-323, 1997.

85 MORALES MORALES, A. A.; CRESPO, F. Z.; NÚÑEZ-GANDOLFF, G.; IZNAGA-ESCOBAR, N.; PÉREZ PÉREZ, N.; IZQUIERDO HERNÁNDEZ, J. C. Technetium-99m direct radiolabeling of monoclonal antibody ior egf/r3. **Nucl. Med. Biol.**, v. 25, p. 25-30, 1998.

86 IZNAGA-ESCOBAR, N.; MORALES MORALES, A.; DUCONGÉ, J.; CABALLERO-TORRES, I.; FERNÁNDEZ, E.; GÓMEZ, J. A. Pharmacokinetics, biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc-labeled anti-human epidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody R3 in rats. **Nucl. Med. Biol.**, v. 25, p. 17-23, 1998.

87 MORALES MORALES, A. A.; NÚÑEZ-GANDOLFF, G.; PÉREZ PÉREZ, N.; VÉLIZ, B. C.; CABALLERO-TORRES, I.; DUCONGÉ, J.; FERNÁNDEZ, E.; CRESPO, F. Z.; VELOSO, A.; IZNAGA-ESCOBAR, N. Freeze-dried formulation for direct ^{99m}Tc-labeling ior-egf/r3 MAb: Additives, Biodistribution, and Stability. **Nucl. Med. Biol.**, v. 26, p. 717-723, 1999.

88 "Preparación, control de calidad y validación de radiofármacos de ^{99m}Tc basados en anticuerpos monoclonales" – Reunión de expertos para definir el protocolo modelo, Informe, Centro Nuclear de México 8 al 12 de Octubre, 2001. Proyecto Arcal LII – Organismo Internacional de Energía Atómica.

89 OU, S.; KWOK, K. C.; WANG, Y.; BAO, H. An improved method to determine SH and -S-S- group content in soymilk protein. **Food Chemistry**, 88, p. 317-320, 2004.

90 Site:

http://cienciafarmaceutica.med.br/vidauniversitaria/cf_pesquisa_farmacocinetica.htm#prin
acessado em: 22/08/2005.

91 MARTINS, P.A. *Ciprofloxacina-^{99m}Tc: Marcação e Biodistribuição no diagnóstico de infecção*. 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

92 BALTER, Q. F. H. *Control de Calidad de Anticuerpos Marcados*. Taller sobre marcación de anticuerpos monoclonales con ^{99m}Tc , control de calidad y producción de juegos de reactivos liofilizados, 4 al 15 de febrero, Peru, 2002. Arcal LII.

93 *Manual de Protocolos de Calidad de Radiofarmacos*. Arcal XV – Producción y control de radiofármacos, p. 1 – 89, 1999.

94 FERRO-FLORES, G.; HASHIMOTO, K. Direct labeling of monoclonal antibodies and antibody fragments with ^{188}Re using a weak competing ligand. *Radiochimica Acta*, n. 147, p. 1-8, 1997.

95 GRIFFITHS, G. L.; GOLDENBERG, D. M.; KNAPP Jr., F. F.; CALLAHAN, A. P.; CHANG, C. H.; HANSEN, H. J. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with generator-produced rhenium-188 for radioimmunotherapy: Labeling and animal biodistribution studies. *Cancer Res.*, v. 51, p. 4594 – 4602, 1991. Apud ref. n° 81.

96 PAIK, C. H.; PHAN, L. N. B.; HONG, J. J.; SAHAMI, M. S.; HEALD, S. C.; REBA, R. C.; STEIGMAN, J.; ECKELMAN, W. C. The labeling of high affinity sites of antibodies with Tc-99m. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, v. 12, p. 3 – 8, 1985. Apud ref. n° 81.

97 GARRON, J. Y.; MOINEREAU, M.; PASCUALINI, R.; SACCAVINI, J. C. Direct Tc-99m labeling of monoclonal antibodies: Radiolabeling and in vitro stability. *Nucl. Med. Biol.*, v. 18, p. 695 – 703, 1991. Apud ref. n° 81.

98 SECCAMANI, E.; TARDITI, L.; BONINO, C.; CAMAGNA, M.; MOSCATELLI, G.; MARIANI, M.; RIVA, P. A new enzymatic method gives F(ab)₂ suitable for ^{99m}Tc labeling and use in immunoscintigraphy. *Nucl. Med. Biol.*, v. 18, n. 1, p. 19-25, 1991.

99 MARDIROSSIAN, G.; WU, C.; RUCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. The stability of ^{99m}Tc directly labelled to a Fab' antibody via stannous ion and mercaptoethanol reduction. *Nucl. Med. Comm.*, v. 13, p. 503 – 512, 1992. Apud ref. n° 7.

100 HNATOWICH, D. J.; MADIROSSIAN, G.; RUSCKOWSKI, M.; FORGARASI, M.; VIRZI, F.; WINNARD Jr., F. Directly and indirectly technetium-99m-labeled antibodies – A comparison of in vitro and animal in vivo properties. *J. Nucl. Med.*, v. 34, p. 109 – 119, 1993. Apud ref. n° 7.