



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

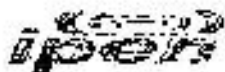
**ESTUDO DA VIABILIDADE DA MARCAÇÃO COM
TECNÉCIO-99m DO ANTICORPO ANTIMIOSINA ÍNTEGRO
E SEU FRAGMENTO: DESENVOLVIMENTO DE
RADIOFÁRMACO PARA AVALIAÇÃO CARDÍACA**

GUILHERME LUIZ DE CASTRO CARVALHO

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

Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

**São Paulo
2007**



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

**ESTUDO DA VIABILIDADE DA MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m DO
ANTICORPO ANTIMIOSINA ÍNTEGRO E SEU FRAGMENTO:
DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACO PARA AVALIAÇÃO CARDÍACA.**

GUILHERME LUIZ DE CASTRO CARVALHO



Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
mestre em Ciências na área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

**São Paulo
2007**

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

ESTUDO DA VIABILIDADE DA MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m DO
ANTICORPO ANTIMIOSINA ÍNTEGRO E SEU FRAGMENTO:
DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACO PARA AVALIAÇÃO CARDÍACA.

GUILHERME LUIZ DE CASTRO CARVALHO

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
mestre em Ciências na área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

São Paulo
2007

"Este trabalho é dedicado aos meus pais José Luiz e Regina, a minha irmã Lívia e a
meu amor Clarissa."

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisa Energética e Nuclear, IPEN-CNEN/SP, por possibilitar a realização deste trabalho.

A Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, chefe da Divisão da Garantia de Qualidade do Centro de Radiofarmácia e minha orientadora, pela convivência harmoniosa, pelos ensinamentos, conselhos, apoio e confiança a mim depositada proporcionando um grande crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Patrick Jack Spencer, pesquisador do Centro de Biotecnologia, pelo encorajamento, dedicação, paciência e ensinamentos transmitidos. Sua colaboração foi inestimável.

A Dra. Maria Helena Taqueda, professora do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade, atenção e colaboração, principalmente no planejamento experimental e análise estatística.

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

Aos funcionários do Centro de Radiofarmácia que contribuíram de alguma maneira na realização deste trabalho, principalmente ao José Luiz, Marcelo, Edson, Alcides, Ademar, Cláudia, Ideli e Natanael por tarefas prestadas no laboratório. José Caldeira, Maria Tereza, Renato Brito, Wagner, David, Dulcila, Rosana, Fábio e Salete pela colaboração sempre que solicitada.

Aos colegas de pós-graduação do IPEN, principalmente Renata, Akinkumi, Marcelo, Gaúcho, Júnior, Laura, Josefina, Taís, Claudinha e Flavinha pelo agradável convívio, incentivo e amizade.

Aos meus pais José Luiz e Regina, pelo amor, compreensão e apoio total não só nesse momento, mas em todos da minha vida. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigado por tudo, amo muito vocês!

A Livia, minha querida irmã, pelo apoio e incentivo constante durante esse tempo longe de casa.

A Clarissa, pelo amor, companheirismo, interesse e apoio. Mesmo distante geograficamente sua presença e seu apoio foram essenciais para a conclusão desse trabalho. Te amo!

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

"Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração e auto-sacrifício, esforço e dúvida."

(Max Beerbohm)

**ESTUDO DA VIABILIDADE DA MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m DO
ANTICORPO ANTIMIOSINA ÍNTEGRO E SEU FRAGMENTO:
DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACO PARA AVALIAÇÃO CARDÍACA.**

Guilherme Luiz de Castro Carvalho

RESUMO

No infarto agudo do miocárdio o miócito tem sua membrana rompida permitindo a entrada de moléculas extracelulares, como anticorpos circulantes, na célula danificada. O uso de anticorpos específicos contra miosina marcados com ^{99m}Tc permite localizar e dimensionar o infarto do miocárdio. O objetivo desse trabalho foi estudar a viabilidade da marcação do anticorpo antimiosina íntegro e seu fragmento F(ab')_2 com ^{99m}Tc . Devido ao alto custo do anticorpo antimiosina outros anticorpos foram utilizados para padronizar a metodologia, sendo as melhores condições utilizadas para o anticorpo antimiosina. O anticorpo íntegro foi clivado pela pepsina formando o fragmento F(ab')_2 . O F(ab')_2 e o anticorpo íntegro foram reduzidos pelo tratamento com Ditiotreitól (DTT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e em seguida marcados com ^{99m}Tc pelo método direto. Diferentes concentrações de redutor, agitações e tempos de incubação foram estudados. Na condição padrão, incubação com uma razão molar 1:1000 (Ac:redutor) à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação constante (850 rpm), foram obtidos 13,28 grupos -SH/molécula. Na marcação foi estudada a influência do pH, da concentração de estanho (Sn^{2+}) e do tempo de incubação, sendo os maiores rendimentos ($90,06 \pm 1,53$ %) obtidos quando utilizada uma massa de 2,5 μg de Sn^{2+} , em pH 4,5 por 60 minutos. Devido aos rendimentos baixos da digestão, a marcação do fragmento F(ab')_2 não apresentou resultados satisfatórios. Após purificação em PD-10, o estudo da biodistribuição foi realizado e mostrou que o anticorpo antimiosina íntegro marcado com ^{99m}Tc apresenta cinética rápida e compatível com a biodistribuição de anticorpo íntegro marcado com ^{99m}Tc . Imagem cintilográfica de animal com infarto do miocárdio foi obtida e comparada à imagem de animal normal. Os estudos permitem concluir que o uso do fragmento F(ab')_2 não mostrou-se viável, já a utilização do radiofármaco formado pelo anticorpo antimiosina íntegro apresenta-se promissora.

STUDY OF THE VIABILITY OF TECHNETIUM-99M LABELING OF WHOLE ANTIMYOSIN ANTIBODY AND ITS FRAGMENT: DEVELOPMENT OF RADIOPHARMACEUTICAL FOR CARDIAC SURVEY.

Guilherme Luiz de Castro Carvalho

ABSTRACT

In the acute myocardium infarction, the myocytes cell membrane loses its integrity, allowing the influx of extracellular macromolecules such as circulating antibody into the damaged cell. The use of the specific antibodies against cardiac myosin labeled with ^{99m}Tc allows to determine the localization and extension of myocardial infarction. The purpose of this work was to study the viability of labeling of the antimyosin monoclonal antibody and its fragment F(ab')_2 with ^{99m}Tc . Because of the high cost of antimyosin antibody, others antibodies were used to optimize the methodology and the best condition was used for antimyosin antibody. The intact antibody was cleaved by pepsin to produce F(ab')_2 fragment. The F(ab')_2 and the intact antibody were reduced by treatment with Dithiothreitol (DTT) and 2-Mercaptoethanol (2-ME) and labeled with ^{99m}Tc by direct method. Different concentrations of reductants, mixing conditions and incubation times were studied. In the standard condition, incubation at molar ratio 1:1000 (antibody:reducing agent) at room temperature for 30 minutes with continuous rotation (850 rpm), 13.28 $-\text{SH}$ groups were formed per molecule. It was studied the influence of pH, of the concentration of stannous chloride (Sn^{2+}) and incubation time in the labeling condition. The better radiochemical yield ($90.06 \pm 1.53\%$) was obtained using $2.5 \mu\text{g}$ of Sn^{2+} in pH 4.5 for 60 minutes. The labeling of the fragment F(ab')_2 did not present satisfactory results because of the low yield of the digestion. After purification by PD-10, the biodistribution study was performed and showed that the intact antimyosin antibody labeled with ^{99m}Tc presented fast kinetic compatible with the biodistribution of an intact antibody labeled with ^{99m}Tc . Scintigraphy image of the animal with myocardial infarction was obtained and compared with the image of a normal animal. The studies allow to conclude that the use of fragment F(ab')_2 are not viable, but the use of the labeled antimyosin antibody are promising.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Medicina nuclear e radiofarmácia	12
1.2 Radioisótopos e radiofármacos	13
1.3 Aplicação de radiofármacos em Medicina Nuclear	14
1.3.1 Radiofármacos utilizados em diagnóstico	15
1.3.1.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET)	16
1.3.1.2 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Simples (SPECT)	17
1.3.2 Radiofármacos utilizados em terapia	17
1.4 Radiofármacos com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)	19
1.5 O sistema imunológico e os anticorpos	21
1.5.1 Anticorpos Policlonais	23
1.5.2 Anticorpos Monoclonais	24
1.5.2.1 Tecnologia do Hibridoma	25
1.5.2.2 Anticorpo Monoclonal antimiosina	26
1.5.3 Fragmentos do anticorpo obtidos pela proteólise	27
1.6 Marcação de proteínas com ^{99m}Tc	28
1.6.1 Marcação Direta	28
1.6.2 Marcação Indireta	29
1.7 O sistema circulatório e o coração	29
1.7.1 Fisiologia e morfologia do coração normal	30
1.7.2 Infarto agudo do miocárdio	30
1.7.2.1 Cintilografia do coração	31
2 OBJETIVO	34
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
3.1 Métodos de marcação de anticorpos com ^{99m}Tc	35
3.2 O uso do anticorpo antimiosina no infarto do miocárdio	41
3.3 Anticorpo antimiosina marcado com ^{99m}Tc	42
3.4 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN): Situação atual	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Infraestrutura e Equipamentos	46
4.2 Lista de Reagentes	47
4.3 Preparo das soluções	49
4.3.1 Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol/L pH 7,2	49
4.3.2 Tampão Fosfato 0,1 mol/L pH 8,0	49
4.3.3 Tampão Fosfato 0,1 mol/L pH 7,4	50
4.3.4 Tampão Citrato-Ácido Cítrico 0,1 mol/L pH 3,5; 4,0 e 4,5	50
4.3.5 Tampão Glicina 0,1 mol/L pH 2,8	50
4.3.6 Tampão Bicarbonato de Amônio 0,1 mol/L	50
4.3.7 Solução de Cisteína	51
4.3.8 Reagente de Ellman's	51
4.3.9 Solução de Imunização	51
4.3.10 Corante Coomassie Blue R-250	51
4.4 Preparo do fragmento de anticorpo F(ab')_2	52
4.4.1 Imunização de camundongos para obtenção de anticorpos	52
4.4.1.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	53
4.4.2 Fracionamento do plasma e purificação para obtenção de anticorpos	53

4.4.3 Digestão do anticorpo pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção fragmento F(ab') ₂	54
4.4.4 Análise da digestão e purificação do fragmento digerido.....	55
4.4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	55
4.4.4.2 Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC).....	56
4.4.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	56
4.5 Redução do anticorpo íntegro e do fragmento F(ab') ₂	56
4.5.1 Purificação do anticorpo íntegro e do fragmento reduzido.....	58
4.5.2 Avaliação da concentração protéica do anticorpo reduzido.....	58
4.5.3 Determinação do número de grupos –SH formados.....	59
4.5.3.1 Construção da curva padrão de cisteína.....	59
4.6 Marcação do anticorpo íntegro e do fragmento reduzido com tecnécio-99m...	60
4.6.1 Controle de qualidade dos anticorpos marcados.....	61
4.6.1.1 Determinação da pureza radioquímica.....	61
4.7 Anticorpo Antimiosina.....	63
4.7.1 Digestão do anticorpo antimiosina pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção fragmento F(ab') ₂	63
4.7.2 Redução do anticorpo íntegro e do fragmento F(ab') ₂	63
4.7.3 Marcação anticorpo íntegro e seu fragmento F(ab') ₂ com tecnécio-99m.....	64
4.7.4 Estudo da Biodistribuição.....	65
4.7.5 Estudo cintilográfico do antimiosina- ^{99m} Tc	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
5.1 Preparo do fragmento de anticorpo F(ab') ₂	68
5.1.1 Imunização de camundongos para obtenção de anticorpos.....	68
5.1.1.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	68
5.1.2 Fracionamento do plasma e purificação para obtenção de anticorpo.....	68
5.1.3 Digestão do anticorpo pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção fragmento F(ab') ₂	69
5.1.4 Análise da digestão e purificação do fragmento digerido.....	70
5.1.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	70
5.1.4.2 Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC).....	74
5.1.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	75
5.2 Redução do anticorpo íntegro e do fragmento F(ab') ₂	76
5.2.1 Purificação do fragmento e anticorpo íntegro reduzidos e avaliação da concentração protéica	76
5.2.2 Determinação do número de grupos –SH formados.....	78
5.2.2.1 Construção da curva padrão de cisteína.....	81
5.3 Marcação do fragmento reduzido com tecnécio-99m.....	83
5.3.1 Controle de qualidade dos anticorpos marcados.....	83
5.3.1.1 Determinação da pureza radioquímica.....	83
5.4 Anticorpo Antimiosina.....	86
5.4.1 Digestão do anticorpo antimiosina pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção fragmento F(ab') ₂	86
5.4.2 Redução do anticorpo íntegro e do fragmento F(ab') ₂	88
5.4.3 Marcação anticorpo íntegro e seu fragmento F(ab') ₂ com tecnécio-99m.....	89
5.4.4 Estudo da Biodistribuição.....	91
5.4.5 Estudo cintilográfico do antimiosina- ^{99m} Tc.....	94
6 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Diferenças entre anticorpo policlonal e monoclonal.	26
TABELA 2. Planejamento experimental da digestão.	55
TABELA 3. Planejamento experimental da redução com 2-mercaptoetanol.	57
TABELA 4. Planejamento experimental da redução com ditioneitol.	57
TABELA 5. Fator de retenção das diferentes espécies.(38)	62
TABELA 6. Planejamento experimental da digestão. Variáveis utilizadas e Índices de Fragmentação encontrados após digestão.	72
TABELA 7. Análise estatística do planejamento experimental da digestão usando programa Minitab 14.	72
Tabela 8. Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução do fragmento F(ab') ₂ do anticorpo anti-CEA.	77
TABELA 9. Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução com DTT do anticorpo íntegro anti-CD20 (planejamento experimental).....	77
TABELA 10. Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução com 2-ME do anticorpo íntegro anti-CD20 (planejamento experimental).	78
TABELA 11. Planejamento experimental da redução com 2-mercaptoetanol. Variáveis utilizadas e resultados obtidos.	79
TABELA 12. Planejamento experimental da redução com ditioneitol. Variáveis utilizadas e resultados obtidos.	79
TABELA 13. Análise do planejamento experimental da redução com 2-ME.	79
TABELA 14. Análise do planejamento experimental da redução com DTT.	80
TABELA 15 Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução do anticorpo antimiosina íntegro com DTT.	88
TABELA 16 Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução do fragmento F(ab') ₂ com DTT.....	88
TABELA 17 Rendimento da marcação do anticorpo antimiosina íntegro determinado pela cromatografia ascendente (fitas Whatman 3MM e fitas ITLC-SG), cromatografia em coluna Sep-Pak Sílica e cromatografia em coluna PD-10.	89
TABELA 18 Porcentagem atividade/órgão em camundongos Swiss normais.	92
TABELA 19 Porcentagem atividade órgão/grama em camundongos Swiss normais.	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Perfil cromatográfico em FPLC da purificação do plasma de camundongos imunizados com veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> em coluna de afinidade (HiTrap r Protein A Fast Flow).	69
FIGURA 2. Cromatograma de HPLC da amostra de anticorpo íntegro (anticorpo de camundongo imunizado com veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>) em coluna de exclusão molecular (TSK 2000 7,5 x 600 mm, Toso-Haas).	70
FIGURA 3. Cromatograma de HPLC da amostra 09 (planejamento experimental) em coluna de exclusão molecular (TSK 2000 7,5 x 600 mm, Toso-Haas).	71
FIGURA 4. Gráfico de superfície de resposta do rendimento da digestão vs concentração de pepsina e o tratamento com PNGase F na agitação máxima.	73
FIGURA 5. Gráfico de superfície de resposta do rendimento da digestão vs tratamento com PNGase F e a agitação em baixas concentrações de pepsina.	74
FIGURA 6. Perfil cromatográfico em FPLC com uma coluna de exclusão molecular, Sephacryl S-200, da amostra de anticorpo Anti-CEA digerido pela pepsina imobilizada em agarose.	75
FIGURA 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da amostra de anticorpo Anti-CEA digerido pela pepsina imobilizada em agarose.	76
FIGURA 8. Gráfico de superfície de resposta do rendimento vs concentração do redutor e tempo de incubação na redução com 2-ME.	80
FIGURA 9. Gráfico de superfície de resposta do rendimento vs concentração do redutor e tempo de incubação na redução com DTT.	81
FIGURA 10. Curva padrão de cisteína usada para análise das amostras 1 e 4 do planejamento da redução com 2-ME e DTT.	82
FIGURA 11. Curva padrão de cisteína usada para análise das amostras 2 e 3 do planejamento da redução com 2-ME e DTT.	82
FIGURA 12. Curva padrão de cisteína usada para análise das amostras 5 e 6 do planejamento da redução com 2-ME e DTT.	82
FIGURA 13. Rendimento da marcação vs $[Sn^{2+}]$ determinado pela cromatografia ascendente (fitas Whatman 3MM e ITLC-SG).	84
FIGURA 14. Rendimento da marcação vs $[Sn^{2+}]$ determinado pela cromatografia em mini colunas compactadas (Sep-Pak Sílica).	84
FIGURA 15. Rendimento da marcação vs pH determinado pela cromatografia ascendente (fitas Whatman 3MM e ITLC-SG).	85
FIGURA 16. Rendimento da marcação vs pH determinado pela cromatografia em mini colunas compactadas (Sep-Pak Sílica).	85
FIGURA 19 Gráfico de barras da porcentagem atividade/órgão em camundongos Swiss normais.	92
FIGURA 20 Gráfico de barras da porcentagem atividade órgão/grama em camundongos Swiss normais.	93

FIGURA 21. Imagens cintilográficas de rato Wistar 4 horas após administração do antimiosina-99mTc. (a) animal normal, (b) animal infartado..... 94

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medicina nuclear e radiofarmácia

A Medicina Nuclear pode ser definida como a especialidade médica que utiliza as propriedades nucleares de compostos radioativos para realizar avaliações diagnósticas das condições anatômicas e/ou fisiológicas, tratamentos terapêuticos e pesquisas médicas. Um aspecto único da Medicina Nuclear é a sensibilidade elevada para detectar alterações na função ou morfologia de um determinado órgão. Para tal, faz uso de radiofármacos.⁽¹⁾

O aumento da eficiência no diagnóstico e na terapêutica médica correlaciona-se estreitamente com a evolução dos métodos destinados a avaliar o estado anátomo-fisiológico de partes do organismo. Esta evolução vem se fazendo para propor métodos cada vez mais sensíveis e inócuos. A imagem visual construída com base na distribuição do radionuclídeo numa estrutura é chamada imagem cintilográfica ou cintilografia.⁽²⁾

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 e até da bioquímica dos órgãos ou sistemas).⁽³⁾

A Radiofarmácia é um ramo da ciência que estuda os aspectos químicos, farmacológicos, físicos, físicos-químicos, bioquímicos, biológicos, fisiológicos e disciplinas similares que relacionam-se com o desenvolvimento de moléculas marcadas denominadas radiofármacos e utilizadas em Medicina Nuclear como traçadores radioativos. A Radiofarmácia pode ser classificada em industrial, hospitalar e centralizada.

Radiofarmácia Industrial : Produtora de insumos (radiofármacos, reagentes liofilizados para marcação com radionuclídeos, geradores e radionuclídeos em geral).

Radiofarmácia Hospitalar: Responsável pela preparação das doses individuais e marcação com radionuclídeos de gerador.

Radiofarmácia Centralizada: Responsável pela etapa final da preparação do radiofármaco (ou doses) e do envio aos centros de Medicina Nuclear.

1.2 Radioisótopos e radiofármacos

Radioisótopos ou radionuclídeos são nuclídeos instáveis que buscam a estabilidade por decaimento radioativo, através da emissão de radiação eletromagnética (γ) ou de partículas carregadas (α e β). Essa emissão pode levar à formação espontânea de outro nuclídeo ou do mesmo nuclídeo com uma energia menor. ⁽⁴⁾

Esses radionuclídeos podem ser produzidos em reatores nucleares que são fontes de um grande número de nêutrons térmicos e utilizam como combustível o ^{235}U enriquecido. Para a produção de radioisótopos em reatores são usadas as seguintes reações nucleares: bombardeamento de núcleos estáveis com nêutrons e fissão nuclear, formando núcleos instáveis por excesso de nêutrons que desintegram-se preferencialmente por emissão de negatron (β^-) e radiação gama (γ). Ex: ^{131}I , ^{51}Cr , ^{99}Mo , ^{32}P e ^{89}Sr . ⁽⁴⁾

Já os radionuclídeos produzidos em ciclotron ou acelerador de partículas são obtidos a partir do bombardeamento de alvos estáveis com partículas carregadas positivamente (prótons, dêutrons ou partículas alfa). São núcleos instáveis por excesso de prótons que desintegram-se por emissão de pósitron (β^+) como ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N e ^{15}O ou por captura eletrônica (CE) com emissão de radiação gama (γ) como por exemplo ^{67}Ga , ^{201}Tl , ^{123}I e ^{111}In . ⁽⁴⁾

Os radioisótopos 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. ⁽⁴⁾

A associação desse radionuclídeo a um composto ligante origina um radiofármaco. Radiofármacos podem ser definidos simplesmente como substratos que contêm um átomo radioativo em sua estrutura, podendo ser considerados como vetores que apresentam certa especificidade por algum órgão ou uma função fisiológica e/ou fisiopatológica. Por sua forma farmacêutica, quantidade e qualidade da radiação emitida, podem ser utilizados com finalidade diagnóstica ou terapêutica, qualquer que seja a via de administração empregada.⁽¹⁾

No desenvolvimento de radiofármacos, vários fatores devem ser levados em conta, tais como a escolha e produção do elemento radioativo, a escolha e obtenção do substrato de marcação e o método a ser aplicado na marcação. Além disso, devem ser considerados os aspectos de pureza de natureza química, física e biológica relativos ao controle de qualidade deste radiofármaco.⁽¹⁾

1.3 Aplicação de radiofármacos em Medicina Nuclear

O uso do radiofármaco é ditado pelas características dos dois componentes, ligante e radionuclídeo. As considerações gerais quando se projetam novos radiofármacos são: fácil viabilidade, baixo custo, meia-vida ótima do radionuclídeo, meia-vida efetiva do radiofármaco compatível, emissão de fótons do radionuclídeo e tipo de decaimento favoráveis ao tipo de aplicação e alta razão alvo:não alvo. Além 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, carga e peso da molécula, solubilidade, estabilidade, cinética *in vivo* e capacidade de ligação às proteínas plasmáticas.⁽⁵⁾

As áreas mais promissoras de pesquisa envolvendo radiofármacos são:⁽⁶⁾

- ❖ Imagem de infecção;
- ❖ Imagem de câncer;
- ❖ Terapia de câncer;
- ❖ Imagem de neuro-receptor
- ❖ Imagem cardíaca e

❖ Química de radiofármacos.

Atualmente, radiofármacos marcados com diferentes radionuclídeos vêm sendo utilizados em aplicações diagnósticas e terapêuticas, sendo que 95% dos radiofármacos são usados com propósito de diagnóstico.⁽¹⁾

1.3.1 Radiofármacos utilizados em diagnóstico

Radiofármacos com finalidade diagnóstica, utilizados na obtenção de imagens cintilográficas em Medicina Nuclear, devem ser preferencialmente constituídos por radioisótopos emissores de radiação gama (fótons), com energia entre 100-500 keV e com tempo de meia vida físico ($t_{1/2}$) relativamente curto (horas a poucos dias). São exemplos de radioisótopos utilizados para diagnóstico: Tecnécio-99m (^{99m}Tc), Iodo-123 (^{123}I), Gálio-67 (^{67}Ga), Tálcio-201 (^{201}Tl), Índio-111 (^{111}In), entre outros.⁽¹⁾

Radiofármacos utilizados em procedimentos diagnósticos devem:

- Apresentar alta seletividade por um órgão ou sistema;
- Emitir radiações penetrantes que atravessem o corpo e atinjam os detectores;
- Emitir baixa dose de radiação ao paciente;
- Permitir a repetição de exames em tempos curtos;
- Ser emissores gama puro (γ) ou de pósitrons, com baixa energia (100-500 keV) com tempo de meia-vida curto (1,5 x duração do procedimento).

Com o advento e sucesso da tomografia computadorizada (TC) no diagnóstico em radiologia, técnicas similares têm sido aplicadas em Medicina Nuclear como a Tomografia Computadorizada por Emissão (TCE). A tomografia pode ser transversal ou longitudinal. A tomografia longitudinal utiliza apenas radionuclídeos que emitam fótons simples (raio X e γ), sendo denominada Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único ("Single Photon

Emission Computed Tomography” - SPECT), já a tomografia transversal utiliza radionuclídeos emissores de pósitron, sendo denominada Tomografia por Emissão de Pósitrons (“Positron Emission Tomography” - PET).⁽⁴⁾

A escolha da técnica a ser utilizada no diagnóstico está relacionada ao tipo de emissão do radionuclídeo durante seu decaimento radioativo.⁽³⁾

1.3.1.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET)

A Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), dependendo do radiofármaco utilizado, pode fornecer 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.⁽³⁾

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 pósitron (β^+) e um elétron do meio. 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 (sendo de 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.⁽³⁾

As substâncias marcadas pelos radioisótopos incluem substratos do metabolismo celular, drogas, peptídeos, neurotransmissores, anticorpos (Acs) e outras moléculas biologicamente ativas.⁽³⁾

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).⁽³⁾

1.3.1.2 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT)

Os radionuclídeos utilizados nessa técnica emitem um único fóton com energia suficiente para sobrepor a atenuação pelo corpo. Pode-se obter uma imagem da distribuição do radiofármaco utilizando-se uma gama-câmara, que consiste de um cristal de cintilação de NaI (TI) 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).⁽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 100-500 keV, devem decair por captura eletrônica ou transição isomérica e não devem emitir radiação corpuscular para minimizar a dose de radiação ao paciente. Devem, também, possuir meia-vida física adequada ao estudo fisiológico de interesse. Os principais radioisótopos utilizados são: Tecnécio-99m (^{99m}Tc), Gálio (^{67}Ga), Iodo-123 (^{123}I), Iodo-131 (^{131}I), Tálcio-201 (^{201}Tl) e Índio-111 (^{111}In).⁽³⁾

1.3.2 Radiofármacos utilizados em terapia

Radiofármacos utilizados em terapia devem:

- Apresentar alta seletividade pelo tumor.
- Transferir ao tumor uma alta taxa de dose para destruir a célula cancerígena.
- Preservar os tecidos sadios adjacentes.
- Ser emissor β^- ou α de alta energia ($\beta^- > 1 \text{ MeV}$) e tempo de meia-vida relativamente longo (dias).

A Radioterapia é uma das modalidades mais efetivas no tratamento do câncer, podendo ser dividida em algumas classes, dependendo da sua forma de aplicação, equipamento usado e tipo de radiação. São elas a teleterapia, a braquiterapia, os aplicadores, os radiofármacos injetáveis incluindo a radioimunoterapia. ⁽³⁾

A teleterapia, radioterapia convencional ou de feixe externo, consiste em eliminar tumores malignos (cancerígenos) utilizando equipamentos que emitem radiação gama, raios X ou feixes de elétrons (ex: telecobalto e acelerador linear). ⁽³⁾

A Braquiterapia trata-se de uma radioterapia localizada para tipos específicos de tumores e em locais específicos do corpo humano. O tratamento é feito por meio de núclídeos radioativos onde a fonte de radiação fica a uma distância curta, em contato ou até mesmo implantada na região que deve receber a dose. O ^{60}Co , ^{137}Cs , ^{125}I e ^{192}Ir são exemplos de radioisótopos utilizados. ⁽³⁾

Aplicadores são fontes radioativas emissoras beta distribuídas sobre uma superfície, cuja geometria depende do aplicador. O princípio de operação é a aceleração do processo de cicatrização de tecidos submetidos a cirurgias, evitando sangramentos e quelóides, de modo semelhante a uma cauterização superficial. O ^{90}Sr é um radionuclídeo muito usado em aplicadores dermatológicos e oftalmológicos. ⁽³⁾

No tratamento com injetáveis os radiofármacos são inoculados no paciente por meio de ingestão ou injeção, com a deposição preferencial em determinado órgão ou tecido do corpo humano, permitindo a localização e o tratamento de doenças extremamente disseminadas. São exemplos o iodo-131 para tratamento de câncer na tireóide, o MIBG- ^{131}I (Metaiodobenzilguanidina) para tumores neuroendócrinos e o EDTMP- ^{153}Sm (ácido etilenoaminotetrametilenofosfônico) para controle da dor causada por metástases ósseas. ⁽³⁾

A Radioimunoterapia (RIT) corresponde ao uso de radiofármacos específicos constituídos de Acs radiomarcados aplicados na terapia do câncer, permitindo a irradiação específica de tecido tumoral com danos mínimos aos órgãos não afetados pela doença. Os anticorpos para uso em RIT podem ser marcados com emissores β^- tais como ^{188}Re , ^{90}Y , ^{153}Sm e ^{177}Lu entre outros. ⁽³⁾

1.4 Radiofármacos com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

A introdução do ^{99m}Tc é considerada um dos eventos mais importantes na recente história da Medicina Nuclear. O tecnécio é o elemento de número atômico 43 e não ocorre naturalmente. Sua descoberta deu-se em Palermo, em 1937, por Segré e Perrier, como resultado dos estudos de Segré, sobre a capacidade de produção de radioisótopos do ciclotron da Universidade da Califórnia, em 1936. Ele notou que algumas partes do interior da máquina quando irradiadas com dêutrons, em particular o defletor constituído de molibdênio, apresentavam uma forte radioatividade a qual supôs ser proveniente do então desconhecido elemento 43.⁽⁷⁾

Quando retornou à Itália levando os fragmentos do defletor, trabalhou com o professor de mineralogia Carlo Perrier, com o objetivo de promover a separação química do novo elemento e conseqüentemente conhecer sua química. Através de um processo minucioso, Perrier e Segré excluíram a possibilidade da nova substância ser um radioisótopo do zircônio, nióbio, molibdênio, rutênio ou manganês e identificaram-no como uma substância com propriedades químicas semelhantes às do Rênio.⁽⁷⁾

Onze anos depois, o nome Tecnécio foi criado pelo grego Paneth e significa que este foi o primeiro elemento artificial produzido pelo homem (o nome tecnécio em grego significa artificial) e o símbolo químico sugerido foi Tc. O isomerismo nuclear do elemento Tc e a existência do ^{99m}Tc (Tecnécio metaestável) foram descobertos por Seaborg e Segré.⁽⁵⁾

Durante muitos anos após sua descoberta, o tecnécio permaneceu como uma curiosidade científica. No entanto, nos últimos 30 anos, os radiofármacos de ^{99m}Tc tornaram-se importantes ferramentas para o diagnóstico de várias doenças ou disfunções de órgãos e sistemas que compõem o corpo humano. Devido às suas propriedades radiofísicas ideais, hoje o ^{99m}Tc é o radionuclídeo mais utilizado para o diagnóstico em Medicina Nuclear.⁽⁴⁾

Com relação a outros nuclídeos gama emissores, apresenta as seguintes vantagens: [1] tempo de meia-vida físico curto (6,02 h); [2] ausência de radiação particulada ou de alta energia, o que minimiza a dose de radiação absorvida pelo paciente; [3] decai para um isótopo filho (^{99}Tc) que representa uma dose de radiação negligenciável e [4] mono-emissão gama de energia 140 keV, compatível

com os sistemas de aquisição de imagens. Com o advento do gerador de ^{99m}Tc no final dos anos 60, tornou-se possível obter este radionuclídeo convenientemente numa forma pura.⁽⁸⁾

A outra grande vantagem é sua fácil disponibilidade à classe médica na forma de um gerador comercial de molibdênio-99 / tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) 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 ânion tetraoxitecnetato hidratado (pertechnetato, $^{99m}\text{TcO}_4^-$) por eluição com solução fisiológica estéril, juntamente com seu isômero ou carreador $^{99}\text{TcO}_4^-$.⁽⁵⁾

Após a eluição com salina, uma solução de pertechnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) é obtida. O pertechnetato TcO_4^- é um íon no qual o tecnécio apresenta o maior estado de oxidação possível (+7). Apesar de tal solução poder ser utilizada para fins diagnósticos, na maioria das aplicações médicas, contudo, o ^{99m}Tc (+7) é reduzido a estados de oxidação inferiores de modo a formar um complexo com um ligante específico, cuja biodistribuição é definida por sua própria natureza, constituindo os chamados radiofármacos essenciais.⁽⁸⁾

Agentes redutores são utilizados para reduzir o estado de oxidação +7 do tecnécio a estados de oxidação inferiores, entre eles, o cloreto estanoso (SnCl_2), citrato estanoso, HCl concentrado, borohidreto de sódio, ditionito e sulfato ferroso. Dentre eles, o mais utilizado é o cloreto estanoso (SnCl_2).⁽⁸⁾

A grande versatilidade do uso do ^{99m}Tc se deve a sua capacidade em marcar com eficiência pelo método direto uma série grande de substâncias liofilizadas, chamadas comercialmente de reagentes de radiodiagnóstico ou reagentes liofilizados, constituídos basicamente da substância a ser complexada, do agente redutor e do sistema tampão, cada um deles com uma aplicação diferenciada dentro do corpo humano.⁽⁵⁾

Em função de sua grande disponibilidade e baixo custo o ^{99m}Tc é considerado muitas vezes como isótopo ideal para a marcação de Acs, através de técnicas diretas (acoplamento direto na molécula) ou indiretas (acoplamento por meio de outro composto que funcione como ponte).⁽⁵⁾

1.5 O sistema imunológico e os anticorpos

O sistema imunológico compreende todos os mecanismos pelos quais um organismo multicelular se defende de invasores internos, como bactérias, vírus ou parasitas.^(9,10)

Existem dois tipos de mecanismos de defesa: os inatos ou não específicos como a proteção da pele, a acidez gástrica, as células fagocitárias ou a secreção de lágrimas; e o sistema imunológico adaptativo, como a ação direcionada dos linfócitos e a sua produção de anticorpos (Acs) específicos.^(9,10)

O sistema específico ou adaptativo se concentra na capacidade das células imunitárias distinguirem proteínas através de receptores, os TCR ("T-cell receptors") ou BCR ("B cell receptors"), sendo controlado e efetuado largamente pelos linfócitos. A ligação do antígeno a esses receptores de superfície é uma etapa crucial na indução da célula B, levando-a a proliferar e a se diferenciar em célula secretora de Acs (plasmócito).^(9,10)

Os Acs são os produtos antígenos-específicos das células B e sua produção na resposta contra as infecções é a principal contribuição dos linfócitos B para a imunidade adaptativa. Os Acs foram as primeiras moléculas participantes do reconhecimento imune específico a serem caracterizadas, sendo ainda hoje as mais bem conhecidas. Coletivamente, os Acs formam uma família de proteínas plasmáticas, conhecidas como imunoglobulinas, cujo bloco constitutivo básico, o domínio de imunoglobulina, é usado de várias formas em muitas moléculas do sistema imunológico.⁽¹⁰⁾

A molécula de anticorpo, em si, tem duas funções distintas: se ligar especificamente ao agente patogênico que induz a resposta imune e recrutar outras células e moléculas, a fim de destruir o patógeno, uma vez que o anticorpo tenha se unido a ele. Essas funções são estruturalmente separadas na molécula do anticorpo, que possuem uma forma de Y com três segmentos de igual tamanho, conectados por uma porção flexível. Cada função é exercida por porções diferentes da molécula; duas extremidades são variáveis entre diferentes moléculas de Acs e estão envolvidas na ligação ao antígeno, reconhecem especificamente o antígeno, enquanto a terceira extremidade interage com as moléculas efetoras, ativando os mecanismos que irão removê-lo.⁽¹⁰⁾

A região de ligação com o antígeno varia amplamente entre as moléculas dos Acs, sendo conhecida como região variável ou região V. Essa variabilidade permite que cada molécula reconheça um determinado antígeno. Por sua vez, a região da molécula de anticorpo que participa das funções efectoras do sistema imunológico não varia do mesmo modo, sendo conhecida como região constante ou região C, embora apresente cinco formas principais, ou isotipos.⁽¹⁰⁾

Os anticorpos IgG, principal imunoglobulina humana, são moléculas grandes com peso molecular de aproximadamente 150 kDa e compostas por duas cadeias polipeptídicas diferentes. Uma, de aproximadamente 50 kDa, é chamada de cadeia pesada ou cadeia H; a outra, de 25 kDa, recebe a designação de cadeia leve ou cadeia L. Cada molécula de IgG contém duas cadeias pesadas e duas leves. As cadeias pesadas são unidas por pontes dissulfídicas e cada uma é ligada a uma cadeia leve, também por uma ligação dissulfídica. Em cada molécula de imunoglobulina, as duas cadeias pesadas e as duas cadeias leves são idênticas.⁽¹⁰⁾

Há somente dois tipos de cadeias leves, denominadas cadeias lambda (λ) e kappa (κ). Nenhuma diferença funcional tem sido encontrada entre Acs com cadeias leves λ ou κ e qualquer um desses tipos de cadeia leve pode ser encontrado nos Acs de qualquer uma das cinco classes principais.⁽¹⁰⁾

Por outro lado, a classe de um anticorpo é definida pela estrutura de sua cadeia pesada. Existem cinco principais classes ou isotipos de cadeia pesada, algumas das quais possuem vários subtipos que determinam a atividade funcional de uma molécula de anticorpo. As cinco classes principais de imunoglobulinas são imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina D (IgD), imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina E (IgE), designando-se suas cadeias pesadas pelas letras gregas minúsculas correspondentes μ , δ , γ , α e ϵ , respectivamente. Suas propriedades funcionais distintas são conferidas pela porção carboxiterminal da cadeia pesada, onde não há associação com a cadeia leve.^(10, 11)

- ❖ IgG - é a principal imunoglobulina presente na circulação dos fluídos corpóreos, respondendo por cerca de 70 - 75 % do total de imunoglobulinas. É o anticorpo mais importante da resposta imune secundária, sendo produzida durante a segunda e subsequente exposição ao antígeno. A IgG apresenta quatro subclasses distintas : IgG₁, IgG₂, IgG₃ e 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.

1.5.1 Anticorpos Policlonais

Anticorpos policlonais são produzidos por diferentes células, e conseqüentemente são imunoquimicamente diferentes; eles reagem com vários epítopos no antígeno contra o qual são produzidos. Os animais mais utilizados para a produção de anticorpos policlonais são coelho, cabra, porco, carneiro e cavalo.⁽¹¹⁾

Dependendo da imunogenicidade do antígeno, doses de 10 µg a 200 µg são freqüentemente administradas para provocar uma resposta imune em animais. O antígeno é geralmente injetado por via intradérmica ou subcutânea, mas injeções no músculo da pata ou na cavidade peritoneal são utilizadas também. Em coelhos, pequenos volumes de 0,1 - 0,5 mL são usualmente injetados por via intradérmica.⁽¹¹⁾

Os Acs gerados numa resposta imune natural ou após imunização são uma mistura de moléculas de diferentes especificidades e afinidades, e podem ser chamados de anti-soro. Parte dessa heterogenicidade resulta da produção de Acs que se ligam a epítopos do antígeno imunizante. Anticorpos policlonais originados dos animais hiperimunizados não diferem apenas quanto aos determinantes que eles reconhecem no antígeno, mas podem também diferir em sua afinidade para o mesmo determinante, assim, mesmo os Acs direcionados contra um único determinante antigênico, podem ser marcadamente heterogêneos^(10,11)

Os anti-soros são úteis para diversas finalidades biológicas, mas possuem certas desvantagens intrínsecas relacionadas à heterogenicidade dos Acs que contêm. Primeiro, cada anti-soro é diferente de todos os outros anti-soros, mesmo quando desenvolvidos num animal geneticamente idêntico com o uso da mesma preparação de antígeno e o mesmo protocolo de imunização. Segundo, os anti-soros podem ser produzidos em volumes limitados, sendo, portanto, impossível usar o mesmo reagente sorológico numa série longa ou complexa de experimentos ou testes clínicos. Finalmente, mesmo os Acs purificados por cromatografia de

afinidade podem incluir sub-populações de Acs que proporcionam reações cruzadas inesperadas, que dificultam a análise do experimento.⁽¹⁰⁾

1.5.2 Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais (AcMs) são produzidos pelos clones de células do plasma. Acs de um dado clone são imunoquimicamente idênticos e reagem contra um epítopo específico do antígeno contra o qual são produzidos. Provavelmente por razões econômicas, camundongos são utilizados quase que exclusivamente para produção de AcMs

Os AcMs apresentam muitas vantagens imunohistoquímicas sobre o anticorpo policlonal equivalente, incluindo alta homogeneidade, ausência Acs não específicos e fácil caracterização.

Os AcMs quando ligados adequadamente a radioisótopos emissores γ , permitem observar componentes celulares usados como antígenos. Os principais isótopos usados para marcação de Ac são o ^{111}In , ^{125}I e $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

A realização de cintilografia com Ac monoclonais possibilita a detecção e localização de antígenos no corpo humano, podendo auxiliar no diagnóstico e acompanhamento de diversas patologias (ex. antígeno carcino-embriônico no carcinoma do cólon ou antígeno da miosina no infarto agudo do miocárdio).

Entretanto, os Ac intactos apresentam um alto peso molecular (PM) limitando a difusão e localização e requerendo longos intervalos de tempo entre a administração do radiofármaco e a aquisição de imagens cintilográficas.⁽¹⁾

Estes problemas são, em parte, superados com a utilização de fragmentos de Ac que apresentam clareamento sanguíneo e acúmulo na região afetada mais rápidos do que os Ac intactos. Atualmente os fragmentos mais utilizados são o F(ab')_2 com PM de 100 kDa, o Fab' com aproximadamente 50 kDa e o Fvs 50% menores que o Fab' .⁽¹⁾

1.5.2.1 Tecnologia do Hibridoma

Em 1975, Georges Köhler e César Milstein revolucionaram o campo da imunologia quando descobriram que as células de mieloma produziam grandes quantidades de imunoglobulinas idênticas. Eles então desenvolveram uma técnica para produzir uma população homogênea de Acs com uma especificidade antigênica conhecida, surgindo assim a Técnica de Hibridoma que pode ser descrita da seguinte forma: ⁽¹⁰⁾

Após uma resposta imune ter sido atingida, linfócitos B do baço do camundongo imunizado são retirados e misturados com células mieloma sob condições específicas, resultando em células híbridas. Essas células híbridas são selecionadas por meio de drogas que matam a célula de mieloma parenteral e as células esplênicas parentais, como consequência, apenas as linhagens de células híbridas de mieloma (Hibridomas) sobrevivem. Aqueles hibridomas que produzem os Acs com a especificidade desejada são então identificados e clonados por novas culturas a partir de células isoladas. ⁽¹³⁾

Como cada hibridoma é um clone originado da fusão com uma única célula B, todas as moléculas de Acs produzidas são idênticas em estrutura, inclusive seus sítios de ligação de antígenos e isotipos. Estes Acs são portanto chamados de anticorpos monoclonais (AcMs). ⁽¹⁰⁾

Com o advento da tecnologia de hibridomas foi possível produzir Ac monoclonais, que apresentam alta especificidade por um determinante antigênico em particular. Esta especificidade impulsionou o desenvolvimento de radiofármacos a partir de Ac monoclonais que atualmente são empregados na maioria dos ensaios sorológicos, como sondas diagnósticas e agentes terapêuticos. ^(1,10)

Ambos, anticorpos monoclonais e policlonais, possuem propriedades específicas para uma situação particular (TAB. 1).

TABELA 1. Diferenças entre anticorpo policlonal e monoclonal.

Item	Anticorpo Policlonal	Anticorpo Monoclonal
Origem	Soro de animal imunizado.	Células de hibridoma (linfócito-mieloma) de camundongos.
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 e Soroterapia.	Imunohistoquímica, imunodeteção e imunoterapia

⊙

1.5.2.2 Anticorpo Monoclonal antimiosina

A administração de Acs radiomarcados com propósitos diagnósticos não é um conceito novo. Surgiu em torno de 1945 com o início da Medicina Nuclear.⁽¹²⁾

A chegada da tecnologia de hibridoma permitiu a produção de uma grande quantidade de AcMs 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.

Radioimunodiagnóstico com AcMs radiomarcados tem ajudado a detectar doenças em seu estágio precoce e a reduzir a mortalidade.⁽³⁾

Em virtude de sua alta especificidade no alvo estes Acs 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.⁽³⁾

O Ac antimiosina é um anticorpo monoclonal que apresenta alta especificidade contra a miosina do músculo cardíaco. Esse anticorpo liga-se à cadeia pesada da miosina intracelular, exposta quando o miócito tem sua membrana rompida, permitindo a localização não-invasiva do infarto por meio de imagens.^(13,14,15)

1.5.3 Fragmentos do anticorpo obtidos pela proteólise

A molécula de anticorpo compreende três porções globulares de igual tamanho, unidas por uma porção flexível da cadeia polipeptídica conhecida como região da dobradiça, formando um Y imperfeito. Cada braço do Y é formado pela associação de uma cadeia leve com a metade aminoterminal de uma cadeia pesada, enquanto a perna do Y é formada pelo pareamento das metades carboxiterminais das duas cadeias pesadas.

Cada função é exercida por porções diferentes da molécula; duas extremidades são variáveis entre diferentes moléculas de Acs e estão envolvidas na ligação ao antígeno, enquanto a terceira extremidade é constante e interage com as moléculas efetoras.⁽¹⁰⁾

Enzimas proteolíticas (proteases) que clivam seqüências polipeptídicas têm sido usadas para analisar a estrutura das moléculas de Acs e para determinar que partes da molécula são responsáveis por suas funções. A digestão limitada com papaína cliva as moléculas de Acs em três segmentos. Dois fragmentos são idênticos e contêm a atividade de ligação com o antígeno, sendo denominados fragmentos Fab ("Fragment antigen binding"). Os fragmentos Fab correspondem aos braços da molécula de anticorpo, que contêm as cadeias leves completas pareadas com parte da cadeia pesada. O outro fragmento não tem atividade de ligação com o antígeno, mas cristaliza facilmente, sendo, por essa razão, chamado de fragmento Fc ("Fragment crystallizable"). Esse fragmento corresponde ao pareamento da parte restante da cadeia pesada e interage com moléculas e células efetoras.⁽¹⁰⁾

O padrão exato dos fragmentos obtidos após a proteólise depende de onde a protease cliva a molécula de anticorpo em relação as pontes dissulfídicas que unem as duas cadeias pesadas na região da dobradiça. A papaína cliva a molécula de anticorpo no lado aminoterminal das ligações dissulfídicas, desprendendo os dois braços do anticorpo como fragmentos Fab separados, enquanto no fragmento Fc as metades carboxiterminais permanecem unidas.⁽¹⁰⁾

Uma segunda enzima, a pepsina, cliva na mesma região da molécula de anticorpo que a papaína, porém no lado carboxiterminal das ligações dissulfídicas, produzindo um fragmento no qual os dois braços da molécula de anticorpo permanecem unidos, o fragmento F(ab')₂. Nesse caso, a parte restante da cadeia

pesada é cortada em muitos fragmentos pequenos. O fragmento $F(ab')_2$ tem exatamente a mesma característica de ligação ao antígeno que o anticorpo original, mas não interage com qualquer molécula efetora e, conseqüentemente, tem um grande potencial em aplicações terapêuticas, bem como em pesquisas sobre o papel da porção F_c .⁽¹⁰⁾

Técnicas de engenharia genética permitem a construção de um fragmento Fab, compreendendo somente a região V da cadeia pesada unida por um pedaço de peptídeo sintético à região V da cadeia leve, sendo chamado de cadeia única Fv (Fragmento variável). Moléculas Fv podem tornar-se agentes terapêuticos valiosos devido ao seu tamanho pequeno, permitindo pronta penetração tissular.⁽¹⁰⁾

1.6 Marcação de proteínas com ^{99m}Tc

Alguns estudos devem ser considerados no desenvolvimento de um novo radiofármaco de modo a estabelecer o melhor método de radiomarkação e definir a condição ótima de marcação e a estabilidade *in vitro* da espécie radioquímica de interesse.^(16, 17)

Uma eficiência de marcação alta é sempre desejada, embora em alguns casos não seja atingida. Quanto maior a eficiência, melhor o método de marcação. Entretanto, uma baixa eficiência é, às vezes, aceitável, se o produto radiomarcado for factível de ser purificado e aplicável em uso clínico, não sendo o método dispendioso ou não havendo uma alternativa melhor.^(16, 17)

A marcação de Acs e fragmentos de Acs com tecnécio-99m pode ser realizada utilizando-se metodologia direta ou indireta de incorporação do radionuclídeo à estrutura protéica.

1.6.1 Marcação Direta

O anticorpo ou fragmento é reduzido por um agente redutor que rompe as pontes dissulfeto formando grupos sulfídricos (-SH) livres. Esses grupos apresentam alta capacidade de ligação com o pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) reduzido, sendo responsáveis pela formação do complexo anticorpo- ^{99m}Tc .^(16, 17)

Como agente redutor do anticorpo podem ser usados o 2-mercaptoetanol (2ME), o ditioneitol (DTT) ou o Ácido Ascórbico (AA).^(16, 17)

1.6.2 Marcação Indireta

Esse método utiliza um agente quelante bifuncional (BFCA) para formar o complexo anticorpo-BFCA-^{99m}Tc. A formação desse complexo pode ser realizada por meio da conjugação desse quelante com o anticorpo seguida pela marcação com tecnécio ou pela formação prévia do composto BFCA-^{99m}Tc que ao reagir com o anticorpo forma o complexo final.^(16, 17)

1.7 O sistema circulatório e o coração

O sistema circulatório humano é composto de sangue, sistema vascular e coração. O coração é o órgão que bombeia o sangue. O sistema vascular é composto pelos vasos sanguíneos: artérias, veias e capilares. As artérias são vasos pelos quais o sangue sai do coração. Como a pressão do sangue no lado arterial é maior, comparando com as veias, a parede das artérias é mais espessa. As veias são os vasos que trazem o sangue para o coração. Os capilares são vasos microscópicos, com paredes de apenas uma célula de espessura e que são responsáveis pelas trocas de gases e nutrientes entre o sangue e o meio interno.⁽¹⁸⁾

O sangue segue um caminho contínuo, passando duas vezes pelo coração antes de fazer um ciclo completo. Pode-se dividir desta maneira o sistema circulatório em dois segmentos: a circulação pulmonar e a circulação sistêmica.⁽¹⁸⁾

A circulação pulmonar ou pequena circulação se inicia no tronco da artéria pulmonar, seguindo pelos ramos das artérias pulmonares, arteríolas, capilares pulmonares, vênulas pulmonares, veias pulmonares e deságua no átrio esquerdo do coração. Na sua primeira porção, transporta sangue venoso. Nos capilares pulmonares o sangue é saturado em oxigênio, transformando-se em sangue arterial.⁽¹⁸⁾

A circulação sistêmica ou grande circulação se inicia na aorta, seguindo por seus ramos arteriais e na seqüência pelas arteríolas sistêmicas, capilares sistêmicos, vênulas sistêmicas e veias sistêmicas, estas se unindo em dois grandes troncos, a veia cava inferior e a veia cava superior. Ambas deságuam no átrio direito do coração. Sua primeira porção transporta sangue arterial. Nos capilares sistêmicos o sangue perde oxigênio para os tecidos e aumenta seu teor de gás carbônico, passando a sangue venoso.⁽¹⁸⁾

A função básica do sistema circulatório é irrigar todo o corpo levando material nutritivo e oxigênio para as células e drenar produtos residuais do metabolismo das células para os órgãos que fazem sua eliminação (ex: pulmão e rins). Além do transporte de hormônios e do seu papel importante no sistema imunológico.^(18, 19)

1.7.1 Fisiologia e morfologia do coração normal

O coração é um órgão muscular oco que funciona como uma bomba contrátil-propulsora, responsável pela manutenção da pressão sanguínea nos vasos e envio de sangue com substratos para as demais células do corpo. Apresenta uma morfologia que lembra um cone ou uma pirâmide, com um ápice e uma base.^(19, 20)

É um órgão ímpar em todos os aspectos. Constituído por um tecido muscular estriado cardíaco (miocárdio), com características de esquelético, que fica protegido por uma membrana serosa denominada de epicárdio e posteriormente o pericárdio. Passivo de controle humoral, também lhe é atribuída função endócrina.^(19, 20)

1.7.2 Infarto agudo do miocárdio

No infarto agudo do miocárdio, como consequência da interrupção do fluxo sanguíneo, a membrana do miócito perde a integridade o que permite a saída de moléculas e íons intracelulares, assim como a entrada de macromoléculas extracelulares no interior da célula.^(13, 14, 21, 22)

A miosina, maior proteína contrátil do músculo cardíaco, é uma proteína intracelular com alto peso molecular e constituída por duas cadeias pesadas e dois

pares de cadeias leves.⁽¹⁴⁾ Com a perda da integridade da membrana as cadeias leves são liberadas para circulação, já as cadeias pesadas, insolúveis em líquidos corporais e com alto peso molecular, permanecem por maior tempo na célula danificada.^(14, 21)

1.7.2.1 Cintilografia do coração

Na avaliação clínica de um paciente, a existência de um histórico sugestivo, alterações no eletrocardiograma e um aumento na concentração da creatina quinase podem indicar alterações no miocárdio, sugestivas de infarto. Por serem inespecíficos, esses parâmetros podem levar a um diagnóstico inconclusivo ou tardio. A biópsia endomiocárdial tem sido usada como um método específico, mas por ser invasiva não é indicada, impulsionando assim a busca de uma técnica não-invasiva com boa sensibilidade e especificidade.⁽²³⁾

Avanços significativos têm sido realizados nas últimas décadas com relação à capacidade de obtenção de imagens do coração utilizando-se traçadores radioativos. Existem marcadores específicos para várias condições cardíacas, como: marcadores de perfusão, de necrose, de inflamação, de metabolismo e de inervação.⁽²⁴⁾

Entre os radiofármacos utilizados para avaliação cardíaca, o Tálcio-201 na forma de cloreto de Tálcio (^{201}Tl), a metoxiisobutil-isonitrila- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (MIBI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$), o tetrófosmin- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e o teboroxime- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ são utilizados para estudo da perfusão do miocárdio.⁽²⁴⁾

Durante muitos anos o ^{201}Tl foi a única técnica de cintilografia adequada para estudo da doença arterial coronária. Sendo utilizado na forma de cloreto de tálcio, com uma meia vida (73,1 horas) e energia gama (γ) relativamente alta, o ^{201}Tl promove uma dosimetria desfavorável ao paciente, particularmente se comparada à dosimetria de radiofármacos marcados com tecnécio-99m. No diagnóstico de pacientes com angina estável e disfunção ventricular, há evidências de perda de sensibilidade, representando um inconveniente da técnica.

O MIBI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresenta-se como o melhor substituto para o ^{201}Tl , caracterizado como um membro da família química isonitrilas, esse radiofármaco entra na célula por mecanismo passivo através do sarcolema, ligando-se às

mitocôndrias e praticamente não sofrendo redistribuição. É o indicador mais utilizado na atualidade, mas apresenta limitações na obtenção de cintilografias em pacientes com hipertensão, hipertrofia ventricular e bloqueio de ramo esquerdo.⁽²⁴⁾

O tetrofosmin-^{99m}Tc é um agente de imagem do miocárdio de 2° geração, membro da classe química difosfato. É lipofílico e também localiza-se na mitocôndria das células, entra passivamente no músculo cardíaco e apresenta menos de 5% de concentração plasmática após 10 minutos de injeção. É indicado para a detecção de isquemia reversível do miocárdio com acúmulo proporcional ao fluxo sanguíneo.⁽²⁴⁾

O teboroxima-^{99m}Tc é um traçador lipofílico neutro da classe de compostos referidos como ácidos borônicos. Seu mecanismo de captação é desconhecido e exibe uma redistribuição e um clareamento do miocárdio, devendo as imagens serem obtidas em até 6 minutos pós-dose, por isso não proporciona sucesso nos estudos realizados em pacientes. Não é utilizado na prática e não está disponível no mercado.⁽²⁴⁾

O Pirofosfato/estanho em forma de reagente liofilizado para marcação com ^{99m}Tc também é utilizado na avaliação cardíaca. Pela facilidade e ausência de manipulação externa do sangue, a marcação de hemácias utilizando-se pirofosfato com pertecnetato (^{99m}TcO₄⁻) ocorre *in vivo*, sendo o ^{99m}Tc injetado 20-30 minutos após a injeção do pirofosfato. O pirofosfato/estanho tem capacidade de reduzir as hemácias circulantes, preparando-as para reação química com o ^{99m}Tc. Entretanto, além de uma baixa eficiência de marcação, em pacientes submetidos à terapia de reperfusão com trombóticos, as hemácias marcadas superestimam o tamanho da área necrótica.^(5, 6)

A utilização do glucarato-^{99m}Tc, um análogo da glicose que se acumula rapidamente na área do infarto recente, vem sendo estudada. Devido a sua rápida cinética esse traçador permite a obtenção de imagens 30 minutos após a injeção. A positividade do exame é tempo-dependente, não estando presente após 9 horas do início da dor precordial. Este agente ainda não está disponível comercialmente.

Acs direcionados à miosina foram investigados para o desenvolvimento de um radiofármaco apropriado, que possibilite um diagnóstico rápido, específico e preciso da existência, localização e extensão do infarto do miocárdio. O antimiosina-¹¹¹In já é usado para detecção de dano irreversível do miocárdio, entretanto há

limitações à sua utilização, não só relacionadas a pouca disponibilidade, mas também à longa meia vida do radioisótopo.^(5, 6)

Visando contornar essas limitações, esse projeto propõe analisar a viabilidade de produção do radiofármaco antimiosina-^{99m}Tc, como opção, para avaliação cardíaca.

Devido à alteração na membrana celular, o anticorpo monoclonal antimiosina radiomarcado (radiofármaco), pode ligar-se à cadeia pesada da miosina intracelular permitindo a localização não-invasiva do infarto pela imagem do radiofármaco.⁽¹³⁻¹⁵⁾

O radiofármaco usado no diagnóstico do infarto agudo do miocárdio deve ser constituído pelo anticorpo antimiosina marcado por um radionuclídeo que emita radiação γ com energia entre 100 e 500 keV. Por apresentar um clareamento (capacidade de filtração e eliminação) mais rápido e características físicas desejáveis, o ^{99m}Tc é tido como o radionuclídeo de escolha.^(12, 16, 25, 26)

O uso de um fragmento F(ab')₂ do anticorpo é vantajoso sobre o uso do anticorpo inteiro, já que as reações imunológicas e o clareamento são inversamente proporcionais ao tamanho molecular, possibilitando a realização do diagnóstico mais precoce.^(15, 27) Esses fragmentos podem ser marcados sem perder atividade e especificidade fornecendo imagens adequadas.⁽¹⁵⁾

Para marcação do fragmento F(ab')₂ com ^{99m}Tc, o método direto é o mais simples, pois não há necessidade do uso de agentes quelantes bifuncionais e a manipulação química prévia é mínima.

O desenvolvimento do referido radiofármaco visa atender à solicitação da classe médica nuclear brasileira que manifestou interesse na disponibilização para uso rotineiro em clínica médica nuclear, do radiofármaco antimiosina-^{99m}Tc.

2 OBJETIVO

Avaliar a viabilidade da marcação do anticorpo antimiosina íntegro e seu fragmento $F(ab')_2$ com Tecnécio-99m para o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio, visando atender à solicitação da classe médica nuclear brasileira.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Métodos de marcação de anticorpos com ^{99m}Tc

Pettit e col. (1980) ⁽²⁸⁾ desenvolveram um processo para marcação de pequenas quantidades de imunoglobulina (100 μg), usando 0,2 mL de tartarato de estanho (2×10^{-5} M, pH 3,1-3,2) como redutor. Após incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, 0,2 mL (< 185 MBq) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram adicionados e a mistura incubada por 10 minutos a 40 °C. A mistura foi aplicada em uma coluna Sephacryl S-200, sendo observada uma diminuição na formação de espécies coloidais de tecnécio com uso do tartarato de estanho como redutor.

John e col. (1994) ⁽²⁹⁾ estudaram o uso do ácido ascórbico (AA) como agente redutor e do diaminotetratiol (N_2S_4) como quelante bifuncional para marcação do anticorpo monoclonal TNT-1 (IgG_{2a}). Na marcação direta foi utilizado um excesso molar de 3.500 de AA. Já pelo método indireto o N_2S_4 foi utilizado como quelante bifuncional. Sendo o pertecnetato, nos dois casos, reduzido por uma solução fresca de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Para o controle da marcação foi utilizado HPLC (Coluna SW 300) e fitas ITLC-SG usando a mistura $\text{EtOH}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1:5) como solvente. Os rendimentos de marcação foram de 73% para método direto e 91% com uso do N_2S_4 .

Pak e col. (1990) ⁽³⁰⁾ avaliaram a estabilidade e a imunoreatividade dos fragmentos Fab' de oito diferentes AcMs de camundongo dos isotipos IgG_1 , IgG_{2a} e IgG_3 marcados com ^{99m}Tc . Os fragmentos foram radiomarcados utilizando-se o complexo D-glucarato- ^{99m}Tc . Todos os fragmentos foram estáveis aos desafio com DTPA, EDTA e pH ácido. O complexo formado permaneceu estável após incubação por 24 horas a 37 °C e manteve sua imunoreatividade após 24 horas a 37 °C em tampão fosfato. O Fab' do isotipo IgG_{2a} apresentou ligação mais estável com o ^{99m}Tc do que os Fab' dos isotipos IgG_1 e IgG_3 .

Schwarz e Hoechst (1987) ⁽³¹⁾ usaram uma nova técnica para marcar AcMs com ^{99m}Tc . Os AcMs foram reduzidos com 2-mercaptoetanol (2-ME), purificados em coluna cromatográfica e liofilizados. O reagente liofilizado contendo estanho (Sn^{2+})

foi então reconstituído, sendo uma alíquota dessa solução, correspondente a 10 µg de estanho, adicionada ao AcM liofilizado. Após adicionar o pertcenetato, a mistura foi incubada por 10 minutos. O método apresentou bons resultados na marcação de diferentes AcMs do isotipo IgG₁, sendo o rendimento da marcação, determinado por HPLC, maior que 95%.

Mather e Ellison (1990) ⁽¹²⁾ descreveram um método simples e facilmente aplicável para a marcação de Acs com ^{99m}Tc. Após redução com 2-mercaptoetanol (2-ME) na razão molar variando de 100:1 a 2000:1 (2-ME:Ac) por 30 minutos à temperatura ambiente, os Acs H17E2, PR1A3 e SM3 (todos do isotipo IgG₁), foram purificados em uma coluna Sephadex G-50 e o número de grupos sulfidrílicos livres determinado pelo método de Ellman. Os Acs foram então marcados na presença do metileno difosfonado (MDP), um competidor fraco, utilizando o reagente liofilizado Amerscan® (Amersham), reconstituído com cloreto de sódio 0,9%, seguido pela adição de 200 MBq de pertecnetato eluído do gerador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. A eficiência de marcação foi medida por ITLC em solução NaCl 0,9%; eficiências de marcação >97% foram obtidas. Os maiores rendimentos de marcação foram observados quando o anticorpo foi reduzido em uma razão molar 1000:1 (2-ME:Ac). Acima desta razão o alto número de grupos -SH/molécula de anticorpo provavelmente esta relacionado ao excesso do redutor, já que o 2-ME contém átomos de enxofre (S) em sua constituição e não é totalmente separado do anticorpo reduzido.

Thakur e DeFulvio (1990) ⁽²⁶⁾ usaram três diferentes métodos (método nitroprusiato, método ninhidrina e método azul de molibdênio) para determinar a quantidade de grupos de cisteína produzidos após a redução de um anticorpo (IgG) com cinco diferentes agentes redutores (ditioeritritol (DTE), ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), cloreto estanoso (SnCl₂) e ácido ascórbico (AA). O anticorpo (240 µg) foi tratado com cada um dos cinco agentes redutores usando a razão molar redutor:IgG ótima, segundo a literatura, e razões molares 3 e 5 vezes maiores. Esses métodos mostraram-se sensíveis para detecção de pequenas quantidades de cisteína, possibilitando a monitoração da redução do anticorpo.

Stalteri e Mather (1996) ⁽³²⁾ realizaram a irradiação do anticorpo com luz ultravioleta para reduzir as pontes dissulfeto permitindo assim a marcação do anticorpo. O anticorpo monoclonal PR1A3, um anticorpo do isotipo IgG₁ usado para estudo do câncer coloretal, foi irradiado a 300 nm usando um reator fotoquímico

Rayonet com oito lâmpadas RMR 3000. O anticorpo irradiado foi marcado utilizando-se o reagente liofilizado Amerscan® e 500 MBq de pertecnetato de sódio, sendo essa mistura incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. O controle da marcação foi realizado por HPLC e ITLC-SG, obtendo-se rendimentos maiores que 95%. A fotoativação apresentou-se como um método simples e eficiente, com a vantagem de não necessitar de uma etapa de purificação para retirar o excesso do agente redutor.

Sykes e col. (1995) ⁽³³⁾ descreveram o uso da luz ultravioleta (UV) no processo de fotoativação para facilitar a marcação de AcMs com ^{99m}Tc. Os anticorpos monoclonais foram submetidos ao processo de fotoativação em um reator fotoquímico ou reduzidos pelo íon estanho. Os reagentes liofilizados fotoativados e reduzidos pelo estanho foram radiomarcados com ^{99m}Tc (740-1480 MBq). Após marcação os AcMs fotoativados e reduzidos pelo estanho foram submetidos ao controle radioquímico (rendimento marcação e estabilidade), bioquímico (SDS-PAGE e HPLC) e imunoquímico (imunoreatividade), permitindo concluir que o processo de fotoativação é uma boa alternativa para a marcação direta com ^{99m}Tc por ser um processo simples que apresenta bons resultados.

Rhodes e col. (1986) ⁽³⁴⁾ estudaram a marcação de fragmentos de AcMs com ^{99m}Tc. Todos os AcMs utilizados eram de origem murínica e foram digeridos pela pepsina em uma razão pepsina:proteína de 1:33 (p:p) em pH 4,0 a 37 °C. O fragmento F(ab')₂ foi isolado por Sephadex G-150 e incubado com íons de estanho (Sn²⁺) durante a noite, sendo esses fragmentos reduzidos marcados pelo método direto com ^{99m}Tc. O controle da marcação foi realizado por ITLC usando acetona como solvente e por cromatografia em gel com uma coluna Sephadex G-25. Foram encontrados rendimentos acima de 98% para todos os AcMs. Após o estudo conclui-se que fragmentos F(ab')₂, ao reagirem com o íon estanho, tornam-se espécies químicas capazes de formar fortes ligações com o ^{99m}Tc e podem ser armazenados congelados ou liofilizados até o momento da marcação, além de apresentarem um clareamento sangüíneo mais rápido e preservarem sua imunoreatividade após a marcação.

Castiglia e col. (1995) ⁽³⁵⁾ descreveram os resultados obtidos na marcação do AcM Anti-CEA B2C114, obtido pela Técnica do Hibridoma, com ^{99m}Tc usando um método direto de marcação. O anticorpo (500 µg) foi reduzido com DTT na razão

molar de 1000:1 (DTT:AcM) por 30 minutos à temperatura ambiente sob rotação contínua. O número de grupos –SH livres, formados após a redução, foi determinado pelo método de Ellman. O anticorpo reduzido foi marcado usando o MDP como ligante e uma solução de fluoreto de estanho (SnF_2) para reduzir o pertecnetato de sódio (700-800 MBq). O controle da marcação foi realizado por ITLC-SG usando salina e metiletilcetona (MEC) como solvente e uma mistura EtOH: NH_4OH : H_2O (2:1:5) em fitas impregnadas em soro albumina. Os maiores rendimentos de marcação foram observados quando utilizada a razão 4,3:1 (MDP: SnF_2) (m:m). Baixos rendimentos foram relacionados à incompleta redução do pertecnetato devido a baixos níveis do íon Sn^{2+} e à formação de espécies coloidais de tecnécio devido a um excesso de Sn^{2+} .

Griffiths e col. (1994) ⁽³⁵⁾ estudaram um método de marcação direta do fragmento F(ab')_2 do anticorpo monoclonal murínico Mu-9 com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. O anticorpo foi reduzido com 2-ME e purificado pela cromatografia de exclusão em acrilamida. O Teste de Ellman foi usado para determinar o número de grupos –SH formados (normalmente de 1-3 grupos –SH/molécula de anticorpo). O Ac foi então digerido pela pepsina (concentração final de 12 $\mu\text{g/mL}$), em pH 3,7 por 1 hora a 37°C, sendo a mistura purificada em uma coluna de exclusão molecular TSK 3000. A eletroforese SDS-PAGE confirmou a obtenção do fragmento F(ab')_2 puro. A marcação do F(ab')_2 reduzido foi realizada pela incubação com uma solução de SnCl_2 contendo 5 μg do íon estanho, seguido pela adição de 74MBq de pertecnetato de sódio. O controle da marcação foi feito por HPLC e ITLC embebida em albumina. Foram observados altos rendimentos de marcação, próximos a 100%.

Paik e col. (1985) ⁽³⁷⁾ investigaram a marcação de IgG íntegro e dos fragmentos F(ab')_2 e Fab' com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Dissolveram 100 mg IgG (anticorpo anti-soro albumina humana) e 2 mg de pepsina em 10 mL de tampão acetato 0,1M pH 4,5. Após incubação por 12 horas a 37°C, as frações Fc , insolúveis, foram removidas por centrifugação e cromatografia de afinidade em uma coluna Sepharose Proteína-A. A eletroforese SDS-PAGE confirmou a formação do fragmento F(ab')_2 . Na marcação direta, o F(ab')_2 e IgG íntegra foram marcados com 7,4 MBq de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ na presença de DTPA e diferentes concentrações de cloreto de estanho. O controle das marcações foi realizado pela cromatografia em papel usando solução fisiológica

(NaCl 0,9% - SF) e a mistura acetonitrila:água (1,5:1) como solvente. Foram obtidos rendimentos de 71,9% para o IgG e 70,1% para o F(ab')₂.

Sapienza e col. (1995) ⁽³⁸⁾ estudaram a marcação direta da imunoglobulina humana com ^{99m}Tc. A IgG humana (Sandoglobulina – Sandoz) foi reduzida com 2-ME em uma relação molar 1000:1 (2-ME:IgG). O anticorpo reduzido foi purificado por gel filtração em uma coluna Sephadex G-50, e as frações com concentração maior que 0,5 mg/mL, determinadas no espectrofotômetro (absorbância 280 nm), foram utilizadas para preparar o reagente liofilizado que foi reconstituído com pertecnetato de sódio. O controle da marcação foi realizado por cromatografia ascendente em papel Whatman 3MM usando SF como solvente. Foi encontrada uma eficiência de marcação $\geq 97\%$.

Wilson e col. (2002) ⁽³⁹⁾ apresentaram um método para melhorar a pepsinólise de IgG₁ de camundongos para obtenção do fragmento F(ab')₂. Vários anticorpos monoclonais além de IgG policlonal, foram deglicolisados pelo tratamento com o peptídeo: N-glicosidase F (PNGase F). A formação do fragmento F(ab')₂ foi determinada pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O tratamento prévio apenas com a PNGase F, mostrou-se suficiente para melhorar a pepsinólise com uma maior produção de fragmentos F(ab')₂.

Ferro-Flores e Hashimoto (1997) ⁽⁴⁰⁾ desenvolveram diferentes reagente liofilizados para marcação direta do AcM IOR-CEA1 e seu fragmento F(ab')₂ com ¹⁸⁸Re usando um ligante competidor fraco (EHDP). O IOR-CEA1 (IgG₁) foi digerido pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção do fragmento F(ab')₂ que após ser purificado por HPLC, usando coluna de exclusão molecular Protein Pak SW 300, teve sua concentração determinada em espectrofotômetro (absorbância 280 nm). O F(ab')₂ foi então reduzido com 2-ME na razão molar de 1074:1 (2-ME:Ac) por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. O fragmento reduzido foi purificado por HPLC e o número de grupos -SH formados determinado pelo teste de Ellman (geralmente entre 3-6 grupos -SH/molécula de anticorpo), sendo esse fragmento marcado com ¹⁸⁸Re. O controle da marcação foi realizado utilizando-se fitas ITLC-SG embebidas em soro albumina e HPLC, sendo obtido um rendimento $> 95\%$.

Garron e col. (1991) ⁽⁴¹⁾ estudaram o método de marcação do anticorpo íntegro e seus fragmentos com ^{99m}Tc e a estabilidade do marcado. O anticorpo anti-CEA (IgG₁) íntegro e seu fragmento F(ab')₂ foram reduzidos pelo 2-aminoetanotiol

(AET) na razão 3000:1 (AET:IgG). Após purificação em coluna Sephacryl HR 200, a concentração do fragmento Fab' foi determinada em espectrofotômetro (absorbância em 280 nm) e o número de grupos -SH livres, formado após redução, determinado pelo teste de Ellman. O Fab' foi então marcado com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (37MBq/mL). Fitas de ITLC-SG usando MEC como solvente foram usadas para o controle da marcação. Rendimentos de 95%, 64,5% e 92,2% foram obtidos na marcação do anticorpo íntegro, do fragmento F(ab')_2 e do Fab', respectivamente.

Hnatowich e col. (1993) ⁽⁴²⁾ compararam as propriedades *in vivo* e *in vitro* dos Acs B72.3 (IgG₁) e C110 (IgG₁) após marcação direta e indireta com ^{99m}Tc . Na marcação direta, os Acs foram reduzidos por uma solução de estanho na razão de peso $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:Anticorpo de 0,71 (500 vezes excesso de estanho). O anticorpo reduzido foi então marcado com pertecnetato (1850 MBq/mg). Na marcação indireta o anticorpo conjugado ao quelante hidrazino nicotinamida foi radiomarcado pela adição de glucoheptonato- ^{99m}Tc (10 MBq/mg). Todos os Acs marcados foram avaliados quanto à pureza radioquímica por HPLC usando coluna Superose-12. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois Acs na marcação direta, sendo a pureza radioquímica após purificação igual a $95\% \pm 2\%$. A marcação indireta foi menos eficiente.

Dean e col. (1992) ⁽⁴³⁾ estudaram o desenvolvimento de métodos de marcação de Acs com ^{99m}Tc para preparação de radiofármacos usados em diagnóstico. Por apresentarem um clareamento mais rápido e uma menor imunogenicidade, foram utilizados, os fragmentos Fab', obtidos pela clivagem do anticorpo íntegro com pepsina seguido pela redução do fragmento F(ab')_2 com DTT. Esses fragmentos foram marcados pelo método direto e indireto. No método direto o Fab' foi marcado na presença do glucarato. No método indireto, utilizou-se o mercaptoacetiltriclicina (MAG_3) como quelante. Os controles da marcação foram feitos usando fitas ITLC-SG em tampão citrato 0,1M pH 5,0 e fitas ITLC-SG embebidas em soro albumina bovina 5% com a mistura $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1,2:2,5:6,3) como solvente. Nas duas marcações foram obtidos altos rendimentos, boa imunoreatividade e estabilidade suficiente para uso clínico.

Bautovich e col. (1994) ⁽⁴⁴⁾ avaliaram o uso do fragmento Fab' do anticorpo monoclonal murínico anti-fibrina DD-3B6/22 (IgG₃) marcado com ^{99m}Tc para detecção da trombose venosa e embolismo pulmonar. O fragmento F(ab')_2 do anticorpo foi reduzido a Fab' pelo DTT em um excesso molar de 80:1. O Fab' foi

então marcado pela adição de 2600 MBq de glucarato- ^{99m}Tc . A mistura foi purificada e a concentração protéica determinada pela absorbância em 280 nm.

Abrams e col. (1990) ⁽⁴⁵⁾ avaliaram o comportamento biológico da imunoglobulina policlonal humana (IgG) radiomarcada com ^{99m}Tc por um método que utiliza hidrazino nicotinamida. A biodistribuição e as imagens foram comparadas às obtidas com IgG- ^{111}In . O IgG foi marcado pela adição de 740 MBq de glucoheptonato- ^{99m}Tc e um excesso molar de 4 vezes do cloridrato de nicotinitato 6-hidrazino succinimidil. A pureza radioquímica foi determinada usando fitas ITLC-SG com citrato de sódio 0,1M pH 5,5 como solvente. Uma pureza radioquímica > 90% foi observada. Observou-se uma equivalência entre as imagens obtidas com o IgG- ^{99m}Tc e o IgG- ^{111}In para detecção de focos de infecção em animais.

Kasina e col. (1991) ⁽⁴⁶⁾ desenvolveram um reagente liofilizado para radiomarcagem do fragmento Fab' de anticorpo com ^{99m}Tc usando N_2S_2 como quelante bifuncional. O ^{99m}Tc foi conjugado ao quelante N_2S_2 e usado para marcar o fragmento Fab' do anticorpo anti-melanoma NR-ML-05. Para separar o ^{99m}Tc livre do ^{99m}Tc ligado ao anticorpo foram utilizadas fitas ITLC-SG e ácido tricloroacético 12% como solvente. Foram obtidos rendimentos de 80% a 95%.

3.2 O uso do anticorpo antimiosina no infarto do miocárdio

Khaw e col. (1976) ⁽²¹⁾ avaliaram a especificidade do anticorpo contra miosina cardíaca no infarto do miocárdio em cachorros. O anticorpo foi digerido pela pepsina em uma razão enzima:substrato de 1:100 para formar o fragmento F(ab')_2 . Esse fragmento foi radioiodado pelo método da lactoperoxidase. O anticorpo antimiosina mostrou boa especificidade na determinação do infarto do miocárdio e o uso do fragmento F(ab')_2 possibilitou uma localização mais rápida da região infartada devido a seu menor tamanho (dois terços do anticorpo íntegro), além de manter intactos os sítios de ligação (especificidade) e eliminar reações do complemento.

Frame e col. (1983) ⁽⁴⁷⁾ usaram o fragmento F(ab')_2 do anticorpo antimiosina cardíaca radiomarcado para avaliar o dano na membrana durante reperfusão após infarto do miocárdio. O anticorpo íntegro, obtido pela imunização de coelhos com miosina cardíaca canina, foi digerido pela pepsina em pH 4,5 por 20 horas a 37 °C. O fragmento foi radioiodado com ^{125}I e ^{131}I pelo método da lactoperoxidase. O

anticorpo antimiosina mostrou-se um bom marcador do dano de membrana, devido a sua ligação específica à miosina cardíaca localizada nos locais de ruptura da membrana.

Rezkalla e col. (1989) ⁽²³⁾ verificaram o uso do fragmento Fab do anticorpo monoclonal antimiosina na determinação do dano miocárdial em camundongos. O fragmento Fab do anticorpo monoclonal G4-2D7 clone 2 foi marcado com ¹²⁵I pelo método da lactoperoxidase. O Fab-¹²⁵I mostrou-se útil na detecção do dano miocárdial em camundongos.

Willerson (1991) ⁽⁴⁸⁾ relatou a capacidade do anticorpo antimiosina em detectar o infarto agudo do miocárdio e dimensionar a área afeta usando a técnica de tomografia computadorizada por emissão de fótons simples - SPECT. As imagens do infarto na região inferior do coração em alguns pacientes foram dificultadas devido à grande captação no fígado. Foi observado que o uso do anticorpo pode trazer consequências imunológicas, principalmente se utilizado mais de uma vez como na detecção do reinfarto. O uso de fragmentos menores e menos imunogênicos minimiza esse problema.

3.3 Anticorpo antimiosina marcado com ^{99m}Tc

PaK e col. (1992) ⁽⁴⁹⁾ desenvolveram um reagente liofilizado para marcação do fragmento Fab' do anticorpo monoclonal antimiosina, produzido pela tecnologia do hibridoma. O IgG foi proteoliticamente clivado para produzir o fragmento F(ab')₂ que foi reduzido a Fab' pelo tratamento com DTT. A marcação foi realizada pela adição de pertecnetato de sódio (555-740 MBq) ao reagente liofilizado contendo 0,5 mg do fragmento Fab' antimiosina. Foram obtidos rendimentos > 95% e o estudo de biodistribuição em camundongos e experimentos em modelos caninos infartados mostraram que o antimiosina-^{99m}Tc apresenta bons resultados quando usado para visualizar o infarto agudo do miocárdio.

Vaccarino e col. (1992) ⁽⁵⁰⁾ avaliaram e compararam o uso do fragmento Fab' do anticorpo monoclonal antimiosina marcado com ¹¹¹In e ^{99m}Tc para avaliar a rejeição do transplante cardíaco em primatas. Na marcação com ¹¹¹In foi utilizado 0,023 mg de Fab' modificado com um polímero de 3,3 kD, o quelante DTPA foi ligado covalentemente a esse polímero formando o complexo DTPA-Polímero. Esse

complexo foi ligado ao Fab' e radiomarcado com ^{111}In via transquelação. Já a marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi realizada com 0,5 mg Fab' utilizando o RP-1 (conjugado éster bifuncional), sendo o complexo RP-1-Fab' reconstituído com pertecnetato. A pureza radioquímica foi determinada utilizando-se ITLC, sendo $> 90\%$.

Nedelman e col. (1993) ⁽²⁷⁾ avaliaram o uso de um recombinante de cadeia simples Fv (sFv) do anticorpo antimiosina marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para obtenção de imagem do infarto agudo do miocárdio em um modelo canino. O recombinante sFv foi acoplado ao quelante RP-1 formando o complexo sFv-RP-1. Aliquotas do quelante conjugado foram marcadas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (740 MBq). Os estudos de biodistribuição e as imagens obtidas mostraram que o composto sFv-RP-1- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresenta um clareamento sangüíneo mais rápido, uma melhor penetração na lesão, menor retenção em órgãos críticos e potencialmente uma menor imunogenicidade.

Senior e col. (1993) ⁽¹³⁾ compararam imagens do infarto agudo do miocárdio em 29 pacientes, utilizando-se dois novos métodos de marcação do anticorpo antimiosina com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ às imagens obtidas com o uso do antimiosina- ^{111}In . O fragmento Fab' do anticorpo antimiosina foi marcado pelo método direto e pelo método indireto usando RP-1 como quelante. Para a marcação direta foi utilizado um reagente liofilizado com 0,5 mg de antimiosina Fab', sendo esse reagente reconstituído com 925 MBq da solução de pertecnetato. O antimiosina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radiomarcado pelo método direto apresentou maior sensibilidade na detecção do infarto agudo do miocárdio do que o marcado utilizando-se RP-1. Quando comparado ao antimiosina- ^{111}In , o antimiosina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresenta vantagens como um clareamento sangüíneo mais rápido, menor custo e maior disponibilidade.

Taillefer e col. (1995) ⁽¹⁴⁾ determinaram a biodistribuição, a segurança e a sensibilidade do antimiosina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na detecção do infarto do miocárdio em humanos. O anticorpo antimiosina, fornecido pela Rougier Bio-Tech Ltd, foi marcado com 1100-1480 MBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, sendo obtidos rendimentos de $98,4\% \pm 1,2\%$. Após o estudo da biodistribuição e análise das imagens adquiridas, chegou-se à conclusão de que o antimiosina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é seguro e apresenta alta sensibilidade na detecção precoce do infarto agudo do miocárdio.

Khaw e col. (1986) ⁽¹⁵⁾ usaram o fragmento Fab do anticorpo antimiosina marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para realizar cintilografia em 30 pacientes com infarto do miocárdio. O Fab foi obtido pela digestão do anticorpo com papaína e separado do

Fc usando cromatografia de afinidade. Um volume de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (3700-5550 MBq) foi reduzido por um excesso de 5×10^5 M de ditonito de sódio e adicionado à solução do DTPA-Fab. Após incubação, a mistura foi fracionada usando uma coluna Sephadex G-25 (PD-10) e o rendimento determinado após purificação em uma coluna Sepharose 4B. As imagens usando Fab- ^{99m}Tc forneceram um diagnóstico preciso em 27 dos 30 pacientes analisados.

Khaw e col. (1982) ⁽²⁵⁾ desenvolveram um método para marcação de macromoléculas biologicamente ativas, como o fragmento Fab do anticorpo antimiosina. O fragmento Fab foi preparado pela digestão do anticorpo íntegro com papaína em uma razão 1:1000 (enzima:substrato). O Fab foi separado do anticorpo íntegro e da fração Fc utilizando uma coluna Sepharose Proteína-A. Uma solução de pertecnetato (740-1110 MBq) reduzida por $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ em excesso molar de 5×10^4 a 5×10^5 foi adicionada ao complexo DTPA-Fab, sendo a mistura purificada em coluna PD-10. Análise do produto em coluna Sephadex 4B confirmou um bom rendimento de marcação.

Sênior e col. (1991) ⁽⁵¹⁾ utilizaram antimiosina- ^{99m}Tc para fornecer um diagnóstico preciso de uma paciente de setenta anos com histórico de doença isquêmica cardíaca. Uma massa de 5 mg do fragmento do anticorpo antimiosina marcado com 740 MBq de ^{99m}Tc foi administrada por via intravenosa 48 horas após início da dor no peito. Os resultados demonstraram excelente correlação entre os locais de necrose miocárdica sugeridos pelo radionuclídeo e pela histopatologia, mostrando que o ^{99m}Tc -Fab liga-se especificamente ao miocárdio necrosado.

Iwasaki e col. (2001) ⁽⁵²⁾ examinaram a viabilidade do uso do anticorpo monoclonal antimiosina do músculo liso (SM-AcM) marcado com ^{99m}Tc para diagnóstico não-invasivo da dissecação aórtica em camundongos. O SM-AcM foi reduzido pelo 2-ME em uma razão molar de 1000:1 (2-ME:AcM) por 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo reduzido foi purificado em coluna PD-10 e marcado pela adição de uma massa de 2,5 μg de cloreto estânico e 740 MBq de pertecnetato. Para o controle da marcação, utilizaram fitas ITLC-SG usando acetona como solvente, sendo o rendimento maior que 98%.

Fc usando cromatografia de afinidade. Um volume de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (3700-5550 MBq) foi reduzido por um excesso de 5×10^5 M de ditionito de sódio e adicionado à solução do DTPA-Fab. Após incubação, a mistura foi fracionada usando uma coluna Sephadex G-25 (PD-10) e o rendimento determinado após purificação em uma coluna Sepharose 4B. As imagens usando Fab- ^{99m}Tc forneceram um diagnóstico preciso em 27 dos 30 pacientes analisados.

Khaw e col. (1982) ⁽²⁵⁾ desenvolveram um método para marcação de macromoléculas biologicamente ativas, como o fragmento Fab do anticorpo antimiosina. O fragmento Fab foi preparado pela digestão do anticorpo íntegro com papaína em uma razão 1:1000 (enzima:substrato). O Fab foi separado do anticorpo íntegro e da fração Fc utilizando uma coluna Sepharose Proteína-A. Uma solução de pertecnetato (740-1110 MBq) reduzida por $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ em excesso molar de 5×10^4 a 5×10^5 foi adicionada ao complexo DTPA-Fab, sendo a mistura purificada em coluna PD-10. Análise do produto em coluna Sephadex 4B confirmou um bom rendimento de marcação.

Sênior e col. (1991) ⁽⁵¹⁾ utilizaram antimiosina- ^{99m}Tc para fornecer um diagnóstico preciso de uma paciente de setenta anos com histórico de doença isquêmica cardíaca. Uma massa de 5 mg do fragmento do anticorpo antimiosina marcado com 740 MBq de ^{99m}Tc foi administrada por via intravenosa 48 horas após início da dor no peito. Os resultados demonstraram excelente correlação entre os locais de necrose miocárdial sugeridos pelo radionuclídeo e pela histopatologia, mostrando que o ^{99m}Tc -Fab liga-se especificamente ao miocárdio necrosado.

Iwasaki e col. (2001) ⁽⁵²⁾ examinaram a viabilidade do uso do anticorpo monoclonal antimiosina do músculo liso (SM-AcM) marcado com ^{99m}Tc para diagnóstico não-invasivo da dissecação aórtica em camundongos. O SM-AcM foi reduzido pelo 2-ME em uma razão molar de 1000:1 (2-ME:AcM) por 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo reduzido foi purificado em coluna PD-10 e marcado pela adição de uma massa de 2,5 μg de cloreto estanoso e 740 MBq de pertecnetato. Para o controle da marcação, utilizaram fitas ITLC-SG usando acetona como solvente, sendo o rendimento maior que 98%.

3.4 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN): Situação atual

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), autarquia estadual vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Governo do Estado de São Paulo, gerido, técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) do Ministério da Ciência e Tecnologia, produz e distribui para todo o território nacional diversos radiofármacos entre radioisótopos primários, moléculas marcadas e reagentes liofilizados para pronta marcação com o radionuclídeo tecnécio-99m (^{99m}Tc).

Através do setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia (CR), o IPEN tem como objetivo conduzir projetos de pesquisa visando o desenvolvimento de novos radiofármacos e o aprimoramento de técnicas e metodologias utilizadas na produção e controle de qualidade.

Entre os radiofármacos utilizados para avaliação cardíaca, o Tálcio-201 na forma de cloreto de Tálcio e o Pirofosfato/estanho em forma de reagente liofilizado para marcação com ^{99m}Tc já são comercializados pelo IPEN. O Sestamibi [(MIBI) $_6$], para marcação com ^{99m}Tc , também já foi desenvolvido e terá sua comercialização iniciada em breve.

O desenvolvimento dos radiofármacos glucarato- ^{99m}Tc e antimiosina- ^{99m}Tc vêm sendo estudados, visando contornar as limitações encontradas pelos outros métodos, disponibilizando assim radiofármacos, como opções, que possibilitem um diagnóstico mais preciso e precoce.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Infra-estrutura e Equipamentos

Os procedimentos foram realizados nos laboratórios de purificação e caracterização de proteínas, do grupo de pesquisas de biofármacos derivados de toxinas animais, no Centro de Biotecnologia (CB) e nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento de Radiofármacos do Centro de Radiofarmácia, ambos no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). Foram utilizados:

- Balança analítica, modelo M-220: Denver Instrument;
- Agitador/Aquecedor, Thermomixer comfort 1,5 mL: Eppendorf;
- pHmetro, modelo MPA-210P: Digimed;
- Estufa B.O.D, modelo Thermostat Cabinets: Logen Scientific;
- Estufa retilínea: Fanem;
- Freezer, modelo Stock F-17; Prosdócimo;
- Geladeira, modelo Biplax 450: Consul;
- Centrífuga para eppendorf, modelo Centrimicro 212: Fanem;
- Centrífuga, modelo 5810R: Eppendorf;
- Agitador ("Shaker"), modelo TE-421: Tecnal;
- Pipetas automáticas 10-100 e 100-1000: Brand; 10-100 e 100-1000: Socorex;
- Calibrador de doses, modelo CRM™-35R: Capintec;
- Contador automático tipo poço, com cristal NaI(Tl), modelo D5002 cobra II: Packard-Canberra;
- Espectrofotômetro UV-visível, modelo U-2010: Hitachi Instruments;
- Cuba Eletroforese SDS-PAGE, modelo Hoefer SE-245: Amersham Biosciences
- Leitor de placas Elisa, modelo MR4000: Dyantech;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC): Waters;
- Coluna de exclusão molecular Protein-Pak Diol (OH) 10µm 7,5 x 300 mm: Waters;

- Coluna de exclusão molecular, TSK 2000 7,5 x 600 mm: TOSOHAAS;
- Coluna de exclusão molecular, TSK 3000 7,5 x 600 mm: TOSOHAAS;
- Cromatógrafo Líquido Rápido de Proteína ("Fast Protein Liquid Chromatography" - FPLC): Amersham;
- Coluna de exclusão molecular, HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution: Amersham Biosciences;
- Coluna de afinidade HiTrap r Protein A Fast Flow: Amersham Biosciences;
- Mini colunas compactadas de Sílica Gel, Sep-Pak : Waters;
- Coluna de gel filtração Sephadex G-25 (PD-10): Amersham Pharmacia Biotech;
- Suporte cromatográfico: ITLC-SG fibra de vidro (Gelman) e Papel Whatman 3MM (Whatman);
- Vidraria adequada e filtros;
- Material plástico descartável em geral (tubos, ponteiras, tubos cônicos, seringas, etc);
- Cabine de Fluxo laminar;
- Suporte universal e pinças universais para segurar a coluna;
- Software Minitab 14: Minitab, Inc;
- Câmara de cintilação, modelo Nucline TH22: Mediso (Medical Imaging Systems).

4.2 Lista de Reagentes

- Anticorpo monoclonal murínico contra cadeia pesada da miosina cardíaca (clone 3-48): Rougier Bio-Tech – Canadá;
- Anticorpo monoclonal ior-CEA-1: CIACM – Cuba;
- Anticorpo monoclonal AcMthera – RituxiAcM (anti-CD-20): Roche;
- Soro Albumina Humana 20 %, Berubumin 0,2mg/mL: ZLB Behring;
- Hemoglobina bovina: Sigma;

- Soro anti-notechis: CSL – Austrália;
- Soro Hiper-imune de cavalo anti-botrópico: Instituto Butantan;
- Veneno total de *Bothrops jararacussu*: Instituto Butantan;
- Pepsina imobilizada em agarose 25 kU: Sigma;
- PNGase F 500.000 U/mL (15.000 U): New England Biolabs – Inglaterra;
- 2-mercaptoetanol (2-ME): Sigma;
- Ditioneitol (DTT): Sigma-Aldrich;
- Reativo de Ellman: 5,5'-ditio-bis (Ácido 2-nitrobenzóico): Sigma;
- L-cisteína 97 % ($C_3H_7NO_2S$): Sigma;
- Nitrogênio gasoso (>99,9% pureza): White Martins;
- Solução fisiológica (SF) (NaCl 0,9%): Sanobiol
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), Merck;
- Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), p.a: Merck;
- Cloreto de sódio (NaCl), p.a: Merck;
- Hidróxido de sódio (NaOH), p.a: Merck;
- Etanol, p.a: Merck;
- Hidróxido de amônia (NH_4OH), p.a: Merck;
- Metiletilcetona (MEC): Synth (Labsynth);
- Água bidestilada: Purificador Milli-RX 45 – Millipore;
- Solução de pertecnetato de sódio ($Na^{99m}TcO_4^-$) eluída do gerador $^{99}Mo/^{99m}Tc$: IFEN – CNEN/SP (IPEN-TEC);
- Cloreto estanoso dihidratado ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$), p.a: Carlo Erba;
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), p.a: Cromato produtos Químicos (CRQ);
- Ácido acético glacial (CH_3COOH), p.a: Merck;
- Citrato de sódio hidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$): J.T. Baker;
- Ácido amino acético (NH_2CH_2COOH), U.S.P (glicina): Nuclear;
- Isopropanol, p.a: Synth;
- Saponina (QSA): Instituto Butantan;
- Heparina, Lique mine 5000 UI/mL: Roche;

- Hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), Pepsamar: Sanofi-Synthelabo Ltda;
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3), p.a: Cinética Química;
- Orto fenil diamino (OPD): Sigma;
- Dextran-70%: Sigma;
- Cloreto de cálcio (CaCl_2), p.a: Vertec;
- Ácido clorídrico (HCl), p.a: Merck;
- Ácido tricloroacético (TCA): Dinâmica;
- Sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) p.a: Reagen;
- Nitrato de prata (AgNO_3), p.a: Cennabras;
- Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), p.a: Merck;
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), p.a: Merck;

4.3 Preparo das soluções

4.3.1 Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol/L pH 7,2

Para preparo da solução (A) pesou-se 2,758 g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e dissolveu-se em 100 mL de água bidestilada; para a solução (B) pesou-se 5,678 g de (Na_2HPO_4) e dissolveu-se em 200 mL de água bidestilada. Misturou-se 170 mL de solução A e 20 mL da solução B e adicionados 190 mL de água bidestilada e 3,42 g de NaCl .⁽⁵³⁾

⑥

4.3.2 Tampão Fosfato 0,1 mol/L pH 8,0

Para preparo da solução (A) pesou-se 13,79 g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e dissolveu-se em 500 mL de água bidestilada; para a solução (B) pesou-se 2,838 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e dissolveu-se em 100 mL de água bidestilada. Misturou-se 500 mL de solução A e 20 mL da solução B e adicionou-se 520 mL de água bidestilada.⁽⁵³⁾

4.3.3 Tampão Fosfato 0,1 mol/L pH 7,4

Para preparo da solução (A) pesou-se 5,516 g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e dissolveu-se em 200 mL de água bidestilada; para a solução (B) pesou-se 14,19 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e dissolveu-se em 500 mL de água bidestilada. Misturou-se 95 mL de solução A e 405 mL da solução B e adicionou-se 500 mL de água bidestilada. ⁽⁵³⁾

4.3.4 Tampão Citrato-Ácido Cítrico 0,1 mol/L pH 3,5; 4,0 e 4,5

Para preparo da solução (A) pesou-se 35,71g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e dissolveu-se em 1000 mL de água bidestilada; para a solução (B) pesou-se 21,01 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) e dissolveu-se em 1000 mL de água bidestilada. Misturou-se 155 mL da solução A e 350 mL da solução B para obtenção do tampão pH 3,5. Para obtenção do tampão pH 4,0 e 4,5, misturou-se 200 mL da solução A com 280 mL da solução B e 300 mL da solução A e 250 mL da solução B respectivamente. ⁽⁵³⁾

4.3.5 Tampão Glicina 0,1 mol/L pH 2,8

Pesou-se 1,875 g de ácido amino acético ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) e dissolveu-se em 200 mL de água bidestilada. Para acertar o pH da solução foi usado HCl (1 mol/L). ⁽⁵³⁾

4.3.6 Tampão Bicarbonato de Amônio 0,1 mol/L

Pesou-se 7,906 g de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) e dissolveu-se em 1000 mL de água bidestilada. ⁽⁵³⁾

4.3.7 Solução de Cisteína

Para o preparo das soluções de cisteína pesou-se 0,006 g de L-cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) e dissolveu-se em 50 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 8,0, obtendo-se uma solução de 1,0 mmol/L. Os padrões de cisteína nas concentrações 0,75 mmol/L; 0,5 mmol/L; 0,25 mmol/L; 0,1 mmol/L e 0,01 mmol/L foram preparadas pela diluição da solução 1,0 mmol/L. ^(3, 57)

4.3.8 Reagente de Ellman

O reagente de Ellman foi preparado em uma concentração de 0,3 mg/mL, usando 3,0 mg do reagente de Ellman para 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0. ^(3, 57)

4.3.9 Solução de Imunização

Pesou-se 2,6 mg de veneno de *Bothrops jararacussu* e dissolveu-se em 1,5 mL de tampão PBS 0,1 mol/L. Um volume de 115 μL (200 μg) dessa solução foi misturada a 1,4 mg de saponina em 1,0 mL de tampão PBS 0,1 mol/L e 0,5 mL da suspensão de hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$). Completou-se o volume para 10 mL com tampão PBS 0,1 mol/L. ^(55, 56)

©

4.3.10 Corante Coomassie Blue R-250

Pesou-se uma massa de 1,25 g de Coomassie Blue R-250, adicionou-se um volume de 40 mL de Ácido Acético, 230 mL de metanol e 230 mL de água, com um volume final de 500 mL. ^(55, 56)

4.4 Preparo do fragmento de anticorpo F(ab')₂

O anticorpo íntegro foi proteoliticamente clivado (digestão com pepsina) para obtenção do fragmento F(ab')₂. A pepsina imobilizada em agarose foi utilizada para digestão. Essa enzima cliva o anticorpo na região da dobradiça, no lado carboxiterminal das ligações dissulfídicas, formando o fragmento F(ab')₂ e fragmentos Fc (restante da cadeia pesada cortada em muitos fragmentos pequenos). O fragmento F(ab')₂ tem exatamente a mesma característica de ligação ao antígeno que o anticorpo original ⁽¹⁵⁾.

Devido ao alto custo do anticorpo monoclonal antimiosina, o anticorpo anti-CEA (IgG₁) e Acs purificados do soro de camundongos imunizados com veneno de *Bothrops jararacussu* foram utilizados para padronização da metodologia de digestão.

Por ser um AcM da mesma subclasse, IgG₁, do anticorpo antimiosina e apresentar um menor custo, o anticorpo anti-CEA foi utilizado para avaliar a eficiência da digestão pela pepsina. Já os Acs obtidos pela imunização dos camundongos, disponíveis em maior quantidade, foram utilizados para otimização desse processo.

4.4.1 Imunização de camundongos para obtenção de anticorpos

Visando a obtenção de anticorpos, 20 fêmeas de camundongos Swiss foram inoculadas com veneno de *Bothrops jararacussu* e tiveram seu sangue colhido e o plasma, após ser separado por centrifugação e submetido ao ensaio imunoenzimático (ELISA), purificado para obtenção de anticorpos.

Durante todo o processo os camundongos foram inoculados, via subcutânea, no dorso, com soluções de 20 µg/mL de veneno. No primeiro inóculo utilizou-se adjuvante completo de Freund e após 15 dias, procedeu-se à coleta de sangue dos animais através do plexo retro-orbital, com o objetivo de pesquisar Acs específicos. No 2º inóculo, após 15 dias, o veneno foi diluído em adjuvante incompleto de Freund e passados 7 dias procedeu-se nova sangria. Nos 3º e 4º inóculos o veneno foi diluído em PBS e as coletas de sangue foram feitas a cada 7 dias. ^(54, 55)

O sangue dos animais foi colhido em tubos cônicos contendo 5 μL de heparina, para evitar a coagulação. O plasma foi separado dos elementos figurados do sangue por centrifugação e estocados (-80°C).

4.4.1.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A presença de Acs específicos pode ser detectada pelo emprego de diferentes ensaios. Alguns medem a ligação direta do anticorpo ao seu antígeno, sendo estes ensaios baseados em interações primárias, como é o caso do ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”).⁽⁵⁵⁾

O plasma, obtido dos animais imunizados com veneno, foi submetido ao ensaio de ELISA a fim de pesquisar a presença de Acs decorrentes do processo de imunização. Para tanto, o ELISA foi feito em micro placas, às quais foram adsorvidas o antígeno específico ($1,0\mu\text{g}/\text{poço}/100\mu\text{L}$), em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, durante toda noite a 4°C . Após sucessivas lavagens com PBS contendo 0,5% de Tween 20 (PBST), eventuais sítios de ligação foram bloqueados com solução de bloqueio (PBST + Leite mólico - $1\text{g}/100\text{mL}$) por 1 hora, à temperatura ambiente. Após novas lavagens, o plasma foi diluído, adicionado às placas e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Seguindo a fase de lavagem acima descrita, os conjugados de peroxidase anti IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b} de camundongo, diluídos em solução de bloqueio, foram adicionados nos poços predeterminados e incubados por 1 hora, à temperatura ambiente. As últimas lavagens foram seguidas pela adição de cromógeno OPD (o-fenil-n-diamina), 0,5 mg/mL em tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05 M pH 5,0), contendo 30% de H₂O₂ adicionado no momento do uso. A reação foi interrompida pela adição de 50 μL de ácido cítrico 0,2 M por poço e a absorbância, a 450 nm, foi determinada em leitor de micro placas Dynatech.⁽⁵⁵⁾

4.4.2 Fracionamento do plasma e purificação para obtenção de anticorpos

Para a obtenção de anticorpos (IgG), o plasma obtido dos animais imunizados foi purificado pela Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (“Fast

Protein Liquid Chromatography” - FPLC), usando uma coluna de afinidade “HiTrap r Protein A Fast Flow”, Amersham.

A amostra foi diluída em uma relação 1:2 em tampão PBS e aplicada na coluna. A eluição foi iniciada em pH básico (100% tampão PBS 0,1 mol/L pH 8,0) no qual, os Acs apresentam grande afinidade pela proteína A, ligando-se fortemente. Já os outros constituintes do soro (Globulinas, Albumina e etc) são eluídos. O final da eluição desses constituintes é acompanhado pela queda do pico que atinge a linha base. Nesse momento a eluição passa a ser realizada em pH ácido (100% tampão Glicina 0,1mol/L pH 2,8), sendo a IgG deslocada da proteína A e coletada em um tubo com tampão Tris/HCl pH 8,0, usado para alcalinizar o meio e impedir a denaturação do anticorpo.

4.4.3 Digestão do anticorpo pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção fragmento $F(ab')_2$

Anticorpos purificados do soro dos camundongos imunizados e o Ac anti-CEA, foram utilizados para a padronização e otimização da digestão, sendo as condições ótimas utilizadas na digestão do anticorpo antimiosina.

Visando uma otimização da digestão, utilizando-se anticorpos purificados do soro dos camundongos imunizados, realizou-se um planejamento experimental para estudar as seis variáveis mais importantes envolvidas no processo: tratamento prévio com deglicosidase (PNGase F), tempo de incubação, concentração de pepsina, pH da reação, temperatura e agitação.

Foram estudadas concentrações de pepsina de 10 unidades, 25 unidades, 40 unidades, 100 unidades e 400 unidades. A reação foi realizada em temperaturas de 23° C, 30° C e 37° C, com tempos de incubação de 8 horas, 16 horas e 24 horas e agitação de 50 rpm, 100 rpm e 150 rpm (TAB. 2).

A PNGase F é uma glicosidase que facilita a digestão do anticorpo pela pepsina por meio da remoção dos carboidratos que dificultam a ação da pepsina em seu sítio. A cada amostra (1 mg de anticorpo purificado do soro dos camundongos imunizados) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 foi adicionado 5,0 µL de PNGase F e incubou-se por 4 horas a 37° C.

Pelo fato da pepsina apresentar-se na forma de pepsinogênio, sem atividade proteolítica em $\text{pH} \geq 5,5$, a reação deve ser realizada em pH ácido, no qual o pepsinogênio transforma-se em pepsina, com atividade proteolítica. As amostras foram dialisadas contra tampão citrato/ácido cítrico pH 3,5, pH 4,0 e pH 4,5 durante toda noite a 4° C sob agitação constante para avaliar a importância do pH na reação.

TABELA 2. Planejamento experimental da digestão.

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL						
Ensaio	PNGase F	Tempo (horas)	Concentração Pepsina (U)	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
1	Não	8	100	4,5	37	150
2	Sim	8	100	3,5	23	150
3	Não	24	10	3,5	23	50
4	Sim	24	10	4,5	23	50
5	Não	8	40	4,5	23	50
6	Sim	8	40	3,5	23	50
7	Não	24	400	3,5	23	150
8	Sim	24	400	4,5	37	150
9	Sim	16	25	4,0	30	100
10	Sim	16	25	4,0	30	100

Os resultados obtidos com a execução desse planejamento foram analisados utilizando-se o programa Minitab 14, um software de estatística que permite calcular os efeitos das variáveis no processo a partir de correlações múltiplas.

4.4.4 Análise da digestão e purificação do fragmento digerido

Para determinar o rendimento da digestão e separar o fragmento F(ab')_2 do anticorpo íntegro e dos fragmentos Fc , foram utilizadas técnicas cromatográficas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas, além da eletroforese.

4.4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para analisar a digestão do anticorpo e purificar o fragmento F(ab')_2 , utilizou-se a cromatografia de exclusão molecular, na qual os componentes da amostra analisada são separados de acordo com o peso molecular.

As amostras foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em um sistema Waters equipado com uma coluna de exclusão molecular Toso-Haas TSK 2000 (7,5 x 600 mm) ou TSK 3000 (7,5 x 600 mm). A fase móvel utilizada foi bicarbonato de amônio 100 mmol/L pH 7,5 e o fluxo foi de 1mL/minuto.

4.4.4.2 Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC)

A Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas também foi utilizada para analisar o rendimento da digestão e purificar o fragmento F(ab')₂.

As amostras foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em um sistema Waters equipado com uma coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 High Resolution HiPrep 16/60 da marca Amersham Biosciences. A fase móvel utilizada foi tampão PBS 0,1 mol/L pH 7,2 e o fluxo foi de 0,35 mL/minuto.

4.4.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Trata-se de um procedimento no qual macromoléculas são separadas de acordo com sua carga ou tamanho pela migração diferencial através de uma matriz de gel sob influência de um campo elétrico. A eletroforese de proteínas é normalmente realizada em géis de agarose ou poliacrilamida com tamanho de poros característicos.⁽⁵⁶⁾

Um volume de 40 µL das amostras do anticorpo digerido foi diluído em 10 µL de tampão de amostra não reduzidos (sem β-mercaptoetanol), e aquecidas a 70° C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 15%. Também foram aplicados padrões de pesos moleculares conhecidos e a voltagem foi fixada em 90 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Blue 250-R.

4.5 Redução do anticorpo íntegro e do fragmento F(ab')₂

O anticorpo anti-CD20 íntegro e o fragmento F(ab')₂ do anti-CEA, obtido após a digestão, foram reduzidos utilizando-se como agentes redutores o 2-

mercaptoetanol (2-ME) ou o ditioneitol (DTT). Esses agentes redutores quebram as pontes dissulfídicas dentro da molécula do anticorpo com a conseqüente formação de grupos -SH livres, responsáveis pela marcação do anticorpo com o Tecnécio-99m.⁽³⁴⁾

O fragmento $F(ab')_2$ do anticorpo anti-CEA, obtido pela digestão com pepsina imobilizada em agarose, foi reduzido com o DTT em uma razão molar de 1:1000 (Ac:DTT) por 30 minutos sob agitação constante.

Visando uma otimização do processo de redução, realizou-se um planejamento experimental para estudar as 4 variáveis mais importantes envolvidas no processo: agente redutor utilizado, concentração do redutor, tempo de reação e agitação. Para o desenvolvimento desse planejamento foi utilizado o anticorpo anti-CD20 (IgG₁) íntegro, sendo as condições ótimas utilizadas na redução do anticorpo antimiosina.

A redução foi realizada com 1 mg de anticorpo (anti- CD20), utilizando-se o 2-ME ou o DTT em relações molares de 1:500, 1:1000 e 1:1500 (Ac:redutor). As reações foram incubadas por 15 minutos, 30 minutos e 45 minutos e sob agitação constante de 300 rpm, 850 rpm e 1400 rpm. (TAB. 3 e TAB. 4)

TABELA 3. Planejamento experimental da redução com 2-mercaptoetanol.

Redutor 2-ME			
Ensaio	Concentração (Ac:redutor)	Tempo (min)	Agitação (rpm)
1	1:500	15	1400
2	1:1500	15	300
3	1:500	45	300
4	1:1500	45	1400
5	1:1000	30	850
6	1:1000	30	850

TABELA 4. Planejamento experimental da redução com ditioneitol.

Redutor DTT			
Ensaio	Concentração (Ac:redutor)	Tempo (min)	Agitação (rpm)
1	1:500	15	1400
2	1:1500	15	300
3	1:500	45	300
4	1:1500	45	1400
5	1:1000	30	850
6	1:1000	30	850

Os rendimentos obtidos pela execução desse planejamento foram analisados com o programa Minitab 14, sendo a importância das variáveis envolvidas no processo determinadas por correlações múltiplas.

4.5.1 Purificação do anticorpo íntegro e do fragmento F(ab')₂ reduzido

Para purificar o anticorpo e o fragmento reduzido e eliminar o excesso de agente redutor, após o tempo de reação, a solução resultante foi aplicada em uma coluna Sephadex G-25 (PD-10) e eluída com tampão PBS frio nitrogenado para retirar oxigênio (O₂) do meio. A coluna foi equilibrada antes da aplicação do anticorpo com aproximadamente 30 mL tampão PBS. Foram coletadas 12 frações de 1 mL em tubos de vidro.

4.5.2 Avaliação da concentração protéica do anticorpo reduzido

As frações colhidas nas colunas de purificação foram analisadas em espectrofotômetro UV-visível, medida da absorbância a 280 nm, utilizando-se cubetas de quartzo e o tampão PBS como branco.

A concentração protéica de cada fração foi determinada utilizando-se a equação 1.

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

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

As frações referentes ao anticorpo reduzido foram reunidas e o concentrado esterilizado em membrana filtrante 0,22 μm , aliquoteado e refrigerado (4-8°C).⁽⁵⁵⁾

4.5.3 Determinação do número de grupos –SH formados

O método mais usado para a determinação dos grupos –SH é o método de Ellman, no qual 5,5'-ditio-2-nitrobenzoato (DTNB) é usado para reagir com grupos –SH para produzir uma substância amarela com absorbância máxima em 412 nm.^(3, 57) Este método é simples, rápido e direto. Seguiu-se o procedimento descrito abaixo:

1. A 50 µL da solução de anticorpo reduzido e purificado, 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 à temperatura ambiente;
4. Mediu-se a absorbância 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-se a equação 2 e o número de grupos –SH por molécula de anticorpo foi determinado pela equação 3.

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

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

4.5.3.1 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 412 nm. Como solução de referência usou-se 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0.

4.6 Marcação do anticorpo íntegro e do fragmento reduzido com ^{99m}Tc

Os grupos livres (-SH) obtidos após a redução das pontes dissulfídicas da molécula de anticorpo pelo agente redutor, se unem ao ^{99m}Tc formando ligações $^{99m}\text{Tc-S-}$.⁽¹⁷⁾

A otimização da marcação foi feita com o Ac íntegro anti-CD20 e as melhores condições aplicadas ao anticorpo antimiosina. Foram estudadas a influência do uso de diferentes redutores (2-ME e DTT) na redução do anticorpo sobre o rendimento de marcação, diferentes concentrações do íon estanho Sn^{2+} (2,5 μg , 3,0 μg , 5,0 μg , 25 μg e 50 μg), diferentes tempos de incubação (30 e 60 minutos), e diferentes pHs (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0).

A marcação do anticorpo reduzido com tecnécio-99m foi realizada pelo método direto, com a redução do pertecnetato via Sn^{2+} , da seguinte forma:

1. Retirou-se do refrigerador um frasco de anticorpo reduzido e purificado (em solução) e esperou-se atingir à temperatura ambiente (20-25 °C);
2. O $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi dissolvido em solução de HCl 0,1 mol/L (previamente nitrogenada por 30 minutos);
3. O anticorpo reduzido foi adicionado a um frasco de reação, seguido pela adição da solução de HCl contendo $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e da solução de pertecnetato eluído do gerador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc ;
4. A solução foi agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 60 minutos para reação;
5. Após reação o pH da mistura foi medido e o controle da marcação realizado.

4.6.1 Controle de qualidade dos anticorpos marcados

A influência 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 do 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 radiomarcação 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 marcação de moléculas não biológicas com ^{99m}Tc .⁽³⁾

4.6.1.1 Determinação da pureza radioquímica

As impurezas radioquímicas formadas decorrentes 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.⁽³⁾

A qualidade final do radiofármaco foi avaliada inicialmente utilizando-se a cromatografia ascendente, em seguida a cromatografia em colunas Sep-Pak Sílica (Waters) e Sephadex G-25 (PD-10) da Amersham também passaram a ser utilizadas.

Na cromatografia ascendente, a amostra do produto é aplicada sobre um suporte (fase estacionária) e arrastada por um solvente (fase móvel). Na fase estacionária foi usado fitas de papel Whatman 3MM (1 x 10 cm) e fitas (fibra de vidro) ITLC-SG (1,5 x 10 cm) embebidas em uma solução de soro albumina humana

5%. 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). Essas análises foram realizadas em duplicatas, para minimizar o erro.

Os valores do Fator de Retenção (Rf) das possíveis espécies químicas presentes após a marcação para cada sistema cromatográfico estudado estão listados na TAB. 5.⁽³⁾

TABELA 5. Fator de retenção das diferentes espécies.

ESPÉCIE	*Rf		
	SF	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 livre (TcO ₄ ⁻)	1,0	1,0	1,0

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

Na cromatografia em coluna Sep-Pak Sílica, a coluna foi ativada com 3 mL de etanol seguida pela injeção de ar e 3 mL de água e uma segunda injeção de ar. A amostra foi aplicada à coluna e a atividade determinada em curiômetro. A coluna foi então eluída inicialmente com SF (3 mL) e em seguida com a mistura etanol:amônia:água (EtOH:NH₄OH:H₂O) na proporção 2:1:5 (v:v:v), sendo as frações coletadas (3 mL) contadas em curiômetro e a troca de eluente realizada após a atividade tornar-se residual. Por fim, a atividade restante na coluna foi determinada em curiômetro.

Na cromatografia em coluna Sephadex G-25 (PD-10), a coluna foi previamente eluída com 20-30 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,4. A amostra foi então aplicada à coluna que teve a atividade determinada e em seguida foi eluída com diversas frações de 1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Essas frações foram coletadas e tiveram a atividade determinada em curiômetro.

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 412 nm. Como solução de referência usou-se 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0.

4.6 Marcação do anticorpo íntegro e do fragmento reduzido com ^{99m}Tc

Os grupos livres (-SH) obtidos após a redução das pontes dissulfídicas da molécula de anticorpo pelo agente redutor, se unem ao ^{99m}Tc formando ligações $^{99m}\text{Tc-S-}$.⁽¹⁷⁾

A otimização da marcação foi feita com o Ac íntegro anti-CD20 e as melhores condições aplicadas ao anticorpo antimiosina. Foram estudadas a influência do uso de diferentes redutores (2-ME e DTT) na redução do anticorpo sobre o rendimento de marcação, diferentes concentrações do íon estanho Sn^{2+} (2,5 μg , 3,0 μg , 5,0 μg , 25 μg e 50 μg), diferentes tempos de incubação (30 e 60 minutos), e diferentes pHs (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0).

A marcação do anticorpo reduzido com tecnécio-99m foi realizada pelo método direto, com a redução do pertecnetato via Sn^{2+} , da seguinte forma:

1. Retirou-se do refrigerador um frasco de anticorpo reduzido e purificado (em solução) e esperou-se atingir à temperatura ambiente (20-25 °C);
2. O $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi dissolvido em solução de HCl 0,1 mol/L (previamente nitrogenada por 30 minutos);
3. O anticorpo reduzido foi adicionado a um frasco de reação, seguido pela adição da solução de HCl contendo $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e da solução de pertecnetato eluído do gerador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc ;
4. A solução foi agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 60 minutos para reação;
5. Após reação o pH da mistura foi medido e o controle da marcação realizado.

4.6.1 Controle de qualidade dos anticorpos marcados

A influência 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 do 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 radiomarcação 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 marcação de moléculas não biológicas com ^{99m}Tc .⁽³⁾

4.6.1.1 Determinação da pureza radioquímica

As impurezas radioquímicas formadas decorrentes 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.⁽³⁾

A qualidade final do radiofármaco foi avaliada inicialmente utilizando-se a cromatografia ascendente, em seguida a cromatografia em colunas Sep-Pak Sílica (Waters) e Sephadex G-25 (PD-10) da Amersham também passaram a ser utilizadas.

Na cromatografia ascendente, a amostra do produto é aplicada sobre um suporte (fase estacionária) e arrastada por um solvente (fase móvel). Na fase estacionária foi usado fitas de papel Whatman 3MM (1 x 10 cm) e fitas (fibra de vidro) ITLC-SG (1,5 x 10 cm) embebidas em uma solução de soro albumina humana

5%. 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). Essas análises foram realizadas em duplicatas, para minimizar o erro.

Os valores do Fator de Retenção (Rf) das possíveis espécies químicas presentes após a marcação para cada sistema cromatográfico estudado estão listados na TAB. 5.⁽³⁾

TABELA 5. Fator de retenção das diferentes espécies.

ESPÉCIE	*Rf		
	SF	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 livre (TcO ₄ ⁻)	1,0	1,0	1,0

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

Na cromatografia em coluna Sep-Pak Sílica, a coluna foi ativada com 3 mL de etanol seguida pela injeção de ar e 3 mL de água e uma segunda injeção de ar. A amostra foi aplicada à coluna e a atividade determinada em curiômetro. A coluna foi então eluída inicialmente com SF (3 mL) e em seguida com a mistura etanol:amônia:água (EtOH:NH₄OH:H₂O) na proporção 2:1:5 (v:v:v), sendo as frações coletadas (3 mL) contadas em curiômetro e a troca de eluente realizada após a atividade tornar-se residual. Por fim, a atividade restante na coluna foi determinada em curiômetro.

Na cromatografia em coluna Sephadex G-25 (PD-10), a coluna foi previamente eluída com 20-30 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,4. A amostra foi então aplicada à coluna que teve a atividade determinada e em seguida foi eluída com diversas frações de 1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Essas frações foram coletadas e tiveram a atividade determinada em curiômetro.

4.7 Anticorpo Antimiosina

4.7.1 Digestão do anticorpo antimiosina pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção fragmento $F(ab')_2$

Após a otimização dos processos de digestão, redução e marcação utilizando-se os anticorpos purificados do soro dos camundongos imunizados e os Acs anti-CEA e anti-CD20, as condições encontradas como ideais foram utilizadas para o anticorpo antimiosina.

A uma massa de 1 mg do anticorpo antimiosina em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 foi adicionado 5,0 μ L de PNGase F e incubou-se por 4 horas a 37° C. A amostra foi então dialisada contra tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 4,0 a 4° C durante toda a noite sob agitação constante.

O pH da amostra foi confirmado como pH 4,0 e em seguida, a pepsina imobilizada em agarose (25 unidades) foi adicionada e a amostra incubada por 24 horas a 37° C sob agitação constante (650 rpm).

Para analisar a digestão do anticorpo e purificar o fragmento $F(ab')_2$, foi utilizado HPLC. A amostra foi aplicada a uma coluna de exclusão molecular, Toso-Haas TSK 3000, na qual os componentes da amostra analisada são separados de acordo com o peso molecular. A fase móvel utilizada foi bicarbonato de amônio 100 mmol/L pH 7,5 e o fluxo foi de 1mL/minuto.

4.7.2 Redução do anticorpo íntegro e do fragmento $F(ab')_2$

O fragmento $F(ab')_2$, obtido após a digestão do anticorpo antimiosina íntegro, foi reduzido ao fragmento Fab' utilizando-se como agente redutor o DTT em uma razão molar de 1:1000 (Ac:DTT), sendo a mistura incubada por 30 minutos sob agitação constante (850 rpm). O anticorpo antimiosina íntegro também foi reduzido sob as mesmas condições para marcação subsequente.

O fragmento $F(ab')_2$ e o anticorpo íntegro reduzidos, foram então aplicados a uma coluna Sephadex G-25 (PD-10) para eliminar o excesso de agente redutor e

purificação do reduzido. A coluna foi equilibrada previamente com aproximadamente 30 mL tampão PBS. Foram coletadas 12 frações de 1 mL em tubos de vidro, sendo a absorbância (280 nm) de cada fração lida em espectrofotômetro UV-visível e a concentração protéica determinada utilizando-se a equação 1 (item 4.5.2, página. 58).

O rendimento da redução foi determinado utilizando-se o método de Ellman. O número de mmol/L de anticorpo reduzido foi determinado utilizando-se a equação 2 e o número de grupos -SH por molécula de anticorpo foi determinado pela equação 3 (item 4.5.3, página 59).

4.7.3 Marcação do anticorpo íntegro e seu fragmento F(ab')₂ com tecnécio-99m

Após redução com DTT e purificação, o anticorpo antimiosina íntegro e seu fragmento F(ab')₂ foram marcados com tecnécio-99m pelo método direto, com a redução do pertecnetato via Sn²⁺, da seguinte forma:

1. Retirou-se do refrigerador um frasco com amostra reduzida e purificada (100 µg do anticorpo íntegro ou 25 µg do Fab') e esperou-se atingir à temperatura ambiente (20-25 °C);
2. Uma massa de 0,011875 g de SnCl₂.2H₂O foi dissolvida em 200 mL da solução de HCl 0,1 mol/L (previamente nitrogenada por 30 minutos);
3. A amostra (Ac íntegro ou Fab') foi adicionada a um frasco de reação, seguida pela adição de 100 µL tampão acetato pH 4,5 (pH mais indicado), 80 µL da solução de HCl contendo SnCl₂.2H₂O (equivalente a 2,5 µg Sn²⁺) e um volume da solução de pertecnetato (equivalente a 37 MBq) eluído do gerador de ⁹⁹Mo-^{99m}Tc;
4. A solução foi agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 60 minutos para reação.

A pureza radioquímica da marcação foi avaliada utilizando-se a cromatografia ascendente (fitas de papel Whatman 3MM e fitas ITLC-SG), a cromatografia em

colunas Sep-Pak Sílica (Waters) e a cromatografia em coluna PD-10 (Amersham) conforme descrito no item 4.6.1.1. Os resultados obtidos pelos diferentes métodos foram comparados com o objetivo de determinar a confiabilidade e reprodutibilidade de cada um dos métodos empregados.

4.7.4 Estudo da Biodistribuição

A biodistribuição do anticorpo antimiosina íntegro marcado com Tecnécio-99m foi realizada em camundongos Swiss normais (fêmeas adultas, pesando entre 20-30 g) após jejum de 24 horas.

O estudo foi realizado utilizando-se método invasivo. Após a administração de 2,50 MBq / 100 μ L do antimiosina-^{99m}Tc purificado, na veia caudal lateral, os animais, em respectivos tempos pré-fixados ($t = 1, 4$ e 24 horas), foram puncionados na veia do sinus orbital com capilar de vidro heparinizado especial para coleta de 100 μ L da alíquota sangüínea, sendo imediatamente sacrificados para retirada dos órgãos que, depois de lavados e pesados, tiveram a radioatividade determinada em um contador tipo poço, calibrado para o radionuclídeo ^{99m}Tc.

Nesse estudo, além da amostra sangüínea e do rabo foram retirados os seguintes órgãos considerados de interesse: cérebro, tireóide, pulmão, coração, baço, fígado, estômago, rins, intestino delgado e intestino grosso, além de parte do músculo da coxa.

A porcentagem de atividade presente em cada órgão de interesse foi calculada a partir de um padrão real. Para determinar esse padrão real foram utilizadas a contagem (cpm) média do padrão de atividade administrada e a contagem (cpm) do rabo de cada animal seguindo a equação:

Todos os estudos de biodistribuição em animais foram realizados de acordo com as normas da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), permanecendo com água e ração durante todo o período de experimentação.

Padrão Real $\equiv$ cpm padrão atividade administrada – cpm do rabo (EQ. 4)

onde cpm = contagem por minuto

Esse padrão de atividade administrada foi preparado pela diluição da dose administrada em balão volumétrico de 10 mL, com água destilada e contagem de três diferentes alíquotas de 1 mL do padrão diluído. Calculou-se a média das três determinações e multiplicou-se por 10, determinando-se a “cpm padrão atividade administrada”.

Com base no padrão real calculado, para cada animal, a porcentagem de dose presente em cada órgão de interesse foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Atividade/órgão} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{padrão real}} \times 100 \quad (\text{EQ. 5})$$

$$\% \text{ Atividade órgão/ grama} = \frac{\% \text{ Atividade/órgão}}{\text{peso do órgão (g)}} \quad (\text{EQ. 6})$$

As porcentagens de atividade presente no sangue e no músculo dos animais foram determinadas de acordo com as seguintes equações:

$$\% \text{ Atividade sangue/mL} = \frac{\text{cpm sangue}(100 \mu\text{L}) \times 10}{\text{padrão real}} \quad (\text{EQ. 7})$$

$$\% \text{ Atividade/sangue total} = \% \text{ Atividade sangue/mL} \times \text{volemia} \quad (\text{EQ. 8})$$

Sendo a volemia calculada de acordo com a equação:

$$\text{Volemia} = \text{Peso do animal (g)} \times 0,0778 \text{ (mL/g)} \quad (\text{EQ. 9})$$

$$\text{Atividade músculo/grama} = \frac{\text{cpm músculo / peso músculo}}{\text{Padrão real}} \quad (\text{EQ.10})$$

$$\% \text{ Atividade/músculo Total} = \% \text{ Dose músculo/grama} \times 40\% \text{ peso animal} \quad (\text{EQ.11})$$

4.7.5 Estudo cintilográfico do antimiosina-^{99m}Tc

O estudo cintilográfico do anticorpo antimiosina íntegro marcado com tecnécio-99m foi realizado em ratos *Wistar*, pesando 250-300 gramas. Foram utilizados animais saudáveis e animais com infarto agudo do miocárdio induzido por procedimento cirúrgico.

O radiofármaco (antimiosina-^{99m}Tc) foi obtido pela marcação do anticorpo antimiosina íntegro reduzido (100 µg) com 1850 MBq de pertecnetato em um volume de 2 mL. Após 60 minutos de reação em temperatura ambiente, o radiofármaco foi purificado em coluna PD-10 e uma dose de 90 MBq/300 µL foi administrada na veia caudal de cada rato.

Foram realizadas imagens estáticas dos ratos, em decúbito dorsal, em tempos pré-fixados (t = 1, 4 e 24 horas). As imagens foram adquiridas utilizando a câmara de cintilação em matriz 256 x 256 por 300 segundos cada. O colimador utilizado foi o de baixa energia e alta resolução ("Low Energy High Resolution" – LEHR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Preparo do fragmento de anticorpo F(ab')₂

Como citado anteriormente, devido ao alto custo do anticorpo monoclonal antimiosina, para otimização do processo de digestão, foram utilizados o Ac anti-CEA (subclasse IgG₁) e Acs purificados do soro de camundongos imunizados com veneno de *Bothrops jararacussu*.

5.1.1 Imunização de camundongos para obtenção de anticorpos

5.1.1.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado com plasma dos camundongos para pesquisar a presença de Acs específicos decorrentes do processo de imunização com veneno *Bothrops jararacussu*. Na leitura das placas em leitor de micro placas Dynatech foram observados resultados positivos até a diluição de aproximadamente 1:50000. Esses resultados confirmaram a produção de uma quantidade satisfatória de Acs específicos, comprovando assim a eficiência do protocolo de imunização utilizado.

5.1.2 Fracionamento do plasma e purificação para obtenção de anticorpo

O plasma obtido dos animais imunizados foi purificado pela Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas ("Fast Protein Liquid Chromatography" - FPLC), usando uma coluna de afinidade (HiTrap r Protein A Fast Flow), para a obtenção de Acs (IgG).

Observa-se claramente na FIG. 1 que conforme esperado, quando o soro é eluído em pH básico (100% tampão PBS 0,1 mol/L pH 8,0) os Acs ligam-se fortemente à proteína A, sendo os outros constituintes do soro (Globulinas,

Albumina e etc) eluídos (1º Pico). Após a mudança do pH (linha tracejada) para pH ácido (100% tampão Glicina 0,1mol/L pH 2,8), a IgG é removida da proteína A (2º Pico). Isso comprova a alta afinidade dos Acs pela proteína A em pH básico, permitindo assim a utilização de um método simples e eficaz para purificação de Acs do plasma.

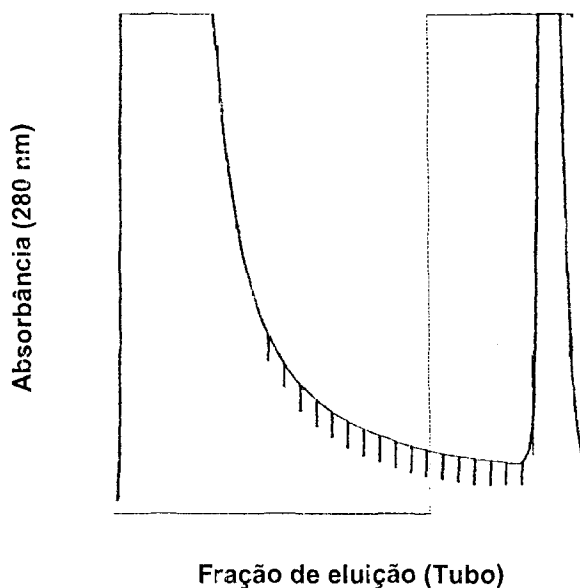


FIGURA 1. Perfil cromatográfico em FPLC da purificação do plasma de camundongos imunizados com veneno de *Boihrops jararacussu* em coluna de afinidade (HiTrap r Protein A Fast Flow).

5.1.3 Digestão do anticorpo pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção do fragmento $F(ab')_2$

As técnicas cromatográficas utilizadas (FIG. 2, FIG. 3 e FIG. 6) e a eletroforese (FIG. 7) comprovaram a eficiência e a especificidade da pepsina imobilizada em agarose para clivar a molécula de anticorpo íntegro em uma região específica, formando assim o fragmento $F(ab')_2$.

5.1.4 Análise da digestão e purificação do fragmento digerido

Para avaliar o rendimento da digestão e separar o fragmento digerido, $F(ab')_2$, do anticorpo íntegro e dos fragmentos F_c foram utilizadas as técnicas HPLC e FPLC, além da eletroforese.

5.1.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Após a execução do planejamento experimental da digestão, as amostras digeridas foram aplicadas ao HPLC e os perfis cromatográficos obtidos foram comparados ao perfil cromatográfico do anticorpo íntegro para identificação dos compostos formados.

Ao comparar os tempos de retenção dos picos na FIG. 3, 1º Pico (15,60 minutos), 2º Pico (23,87 minutos) e 3º Pico (25,52 minutos), com o tempo de retenção do anticorpo íntegro (13,74 minutos), na FIG. 2, supõe-se que a digestão foi eficiente. Por apresentar um tempo de retenção maior, ou seja, uma menor massa do que o anticorpo íntegro, o 1º Pico da FIG. 3 provavelmente é referente ao fragmento $F(ab')_2$ e os dois outros picos aos fragmentos F_c , que apresentam uma massa menor ainda.

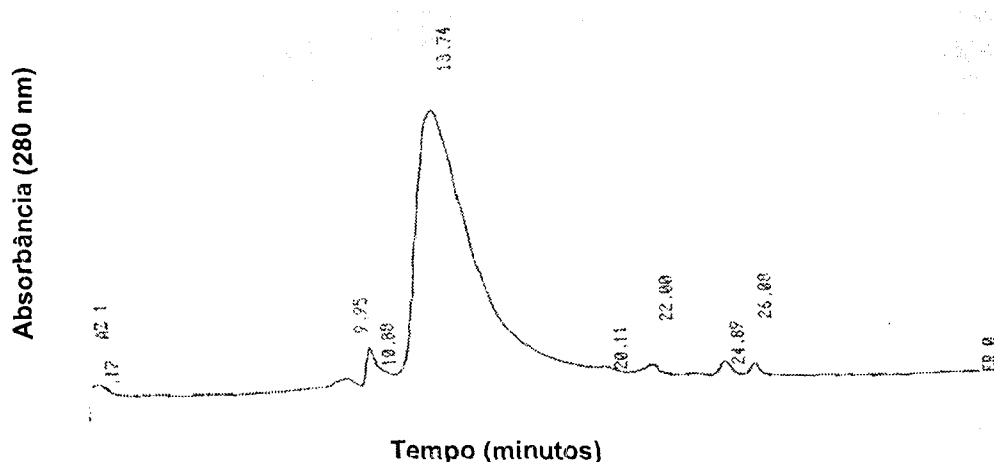


FIGURA 2. Cromatograma de HPLC da amostra de anticorpo íntegro (anticorpo de camundongo imunizado com veneno de *Bothrops jararacussu*) em coluna de exclusão molecular (TSK 2000 7,5 x 600 mm, Toso-Haas).

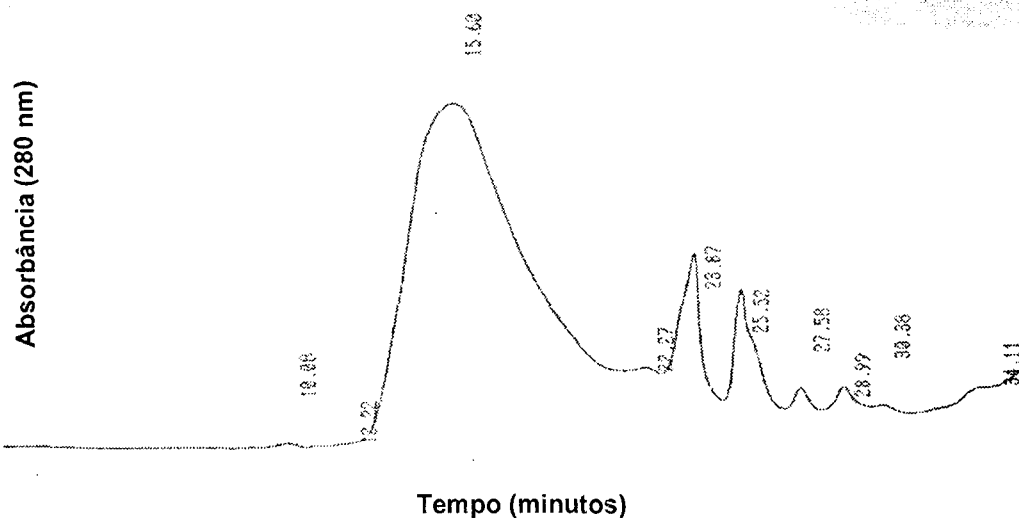


FIGURA 3. Cromatograma de HPLC da amostra 09 (planejamento experimental) em coluna de exclusão molecular (TSK 2000 7,5 x 600 mm, Toso-Haas).

Como o HPLC determina a área dos picos a partir da absorbância da molécula em 280 nm e sendo essa absorbância relacionada à concentração de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), a área dos picos não representa a real concentração do composto, mas sim a absorbância do mesmo.

Para avaliar o rendimento da digestão utilizando o programa Minitab 14, foi necessário quantificá-la. Primeiramente, tentou-se usar a razão entre o tempo de retenção dos picos formados pela digestão e o tempo de retenção do anticorpo íntegro para determinação de um índice, mas como os valores foram muito próximos optou-se pelo uso da diferença entre os tempos de retenção, já que essa apresentava valores mais distantes (TAB. 6). Essa diferença entre os tempos de retenção foi chamada de Índice de Fragmentação e foi utilizada para avaliar o rendimento da digestão com o programa Minitab 14. Os índices entre 0,64 e 2,18 foram entendidos como satisfatórios, pois representam a formação dos fragmentos desejados, sendo essa variação grande, devido aos diferentes compostos formados, como o fragmento $F(ab')_2$ deglicosilado e o $F(ab')_2$ não deglicosilado pela PNGase F.

TABELA 6. Planejamento experimental da digestão. Variáveis utilizadas e Índices de Fragmentação encontrados após digestão.

RESULTADOS PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL							
Ensaio	PNGase F	Tempo (horas)	Concentração Pepsina (U)	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Índice Fragmentação
1	NÃO	8	100	4,5	37	150	0,69
2	SIM	8	100	3,5	23	150	2,18
3	NÃO	24	10	3,5	23	50	1,25
4	SIM	24	10	4,5	23	50	0,64
5	NÃO	8	40	4,5	23	50	0,00
6	SIM	8	40	3,5	23	50	2,05
7	NÃO	24	400	3,5	23	150	0,91
8	SIM	24	400	4,5	37	150	0,34
9	SIM	16	25	4,0	30	100	1,86
10	SIM	16	25	4,0	30	100	1,80

Pela análise estatística (TAB. 7) observou-se três tendências: forte (tratamento com PNGase F), média (concentração de pepsina) e fraca (a agitação). Quanto maior o T, menor o P e maior a importância da variável.

Assim com base nos efeitos dessas variáveis, percebe-se que elas apresentam uma maior importância no processo e colaboram de forma mais significativa, sendo suas alterações de maior impacto no rendimento. As variáveis com sinal positivo aumentam o rendimento quando são aumentadas, já as variáveis com sinal negativo aumentam o rendimento quando são diminuídas.

TABELA 7. Análise estatística do planejamento experimental da digestão usando programa Minitab 14.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DIGESTÃO					
Variável	Efeitos	Coefficiente	SE Coef.	T	P
PNGase F	0,773	0,386	0,05408	7,14	0,089
Tempo	0,003	0,001	0,06401	0,02	0,988
Concentração	-1,545	-0,773	0,018264	-4,23	0,148
PH	2,209	1,104	1,12533	0,98	0,506
Temperatura	-0,441	-0,221	0,26678	-0,83	0,560
Agitação	1,411	0,706	0,30031	2,35	0,236

Efeito = efeito da variável no processo

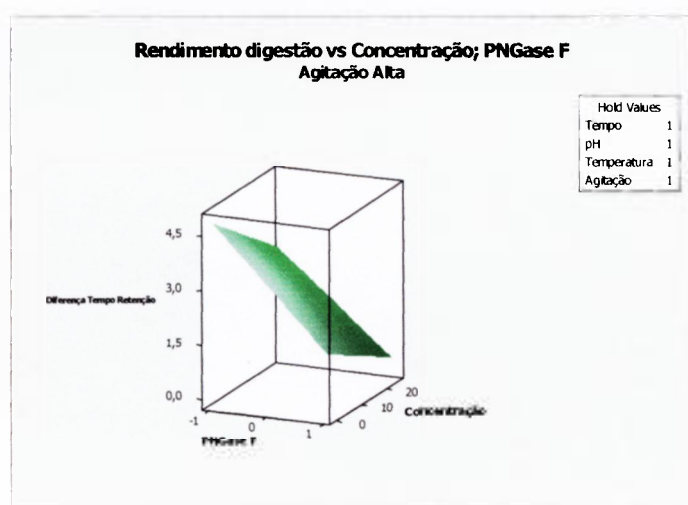
Coefficiente = efeito / 2

SE Coef. = erro do coef.

T = Coef / SE Coef.

P = probabilidade

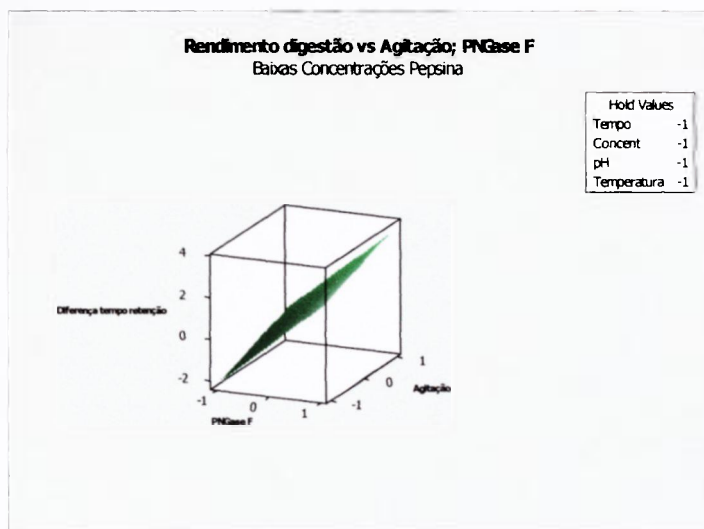
Ao analisarmos os gráficos de superfície de resposta abaixo, FIG. 4 e FIG.5, observa-se as condições nas quais foram obtidos os melhores rendimentos da digestão (diferenças entre 0,69 e 2,18). Na FIG. 4, a agitação foi fixada no maior valor e o rendimento analisado em função da concentração de pepsina e do tratamento com PNGase F. Essas duas variáveis estão codificadas no gráfico, no caso da concentração, os valores estudados (10 - 400 unidades) estão representados entre "-1" e "25", já para a PNGase F o valor "-1" refere-se ao não tratamento com a enzima e o valor "+1" refere-se ao tratamento. Nota-se que os melhores resultados são obtidos em concentrações de pepsina menores e com o tratamento com a PNGase F.



CODIFICAÇÃO VARIÁVEIS		
	Concentração Pepsina (U)	PNGase F
-1	10	SEM
0	25	
1	40	COM
10	100	
25	400	

FIGURA 4. Gráfico de superfície de resposta do rendimento da digestão vs concentração de pepsina e o tratamento com PNGase F na agitação máxima.

Já na FIG. 5 a concentração de pepsina foi fixada no menor valor e o rendimento analisado em função do tratamento com PNGase F e da agitação. Assim como no gráfico anterior as variáveis encontram-se codificadas, sendo o valor "-1" referente ao menor valor utilizado, o valor "+1" referente ao maior valor utilizado e o valor "0" referente ao valor médio da variável. Confirmou-se o que foi observado na figura anterior, sendo os melhores resultados obtidos em agitação maior e com o tratamento com a PNGase F.



CODIFICAÇÃO VARIÁVEIS		
	Agitação (rpm)	PNGase F
-1	50	SEM
0	100	
1	150	COM

FIGURA 5. Gráfico de superfície de resposta do rendimento da digestão vs tratamento com PNGase F e a agitação em baixas concentrações de pepsina.

5.1.4.2 Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC)

Ao analisar a FIG. 6, observa-se a formação de dois picos. Como o primeiro pico apresenta um tempo de retenção menor, maior peso molecular, acredita-se que esse pico seja referente ao anticorpo íntegro (1º Pico). Já o segundo pico, apresenta um tempo de retenção maior, sendo assim referente a uma molécula de peso molecular um pouco menor, possivelmente o fragmento $F(ab')_2$ (2º Pico), comprovando assim a digestão do anticorpo pela pepsina.

O fato do 1º Pico apresentar uma área maior do que a área apresentada pelo 2º Pico não evidencia o baixo rendimento dessa digestão já que a molécula de anticorpo íntegro apresenta uma maior quantidade de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), sendo esses aminoácidos os responsáveis pela absorvância em 280 nanômetros, comprimento de onda utilizado.

Uma observação importante nesse cromatograma é a sobreposição dos picos, isso evidencia além da digestão parcial que a separação entre o anticorpo íntegro e o fragmento $F(ab')_2$ não foi adequada. Essa separação inadequada provavelmente está relacionada à baixa resolução da coluna.

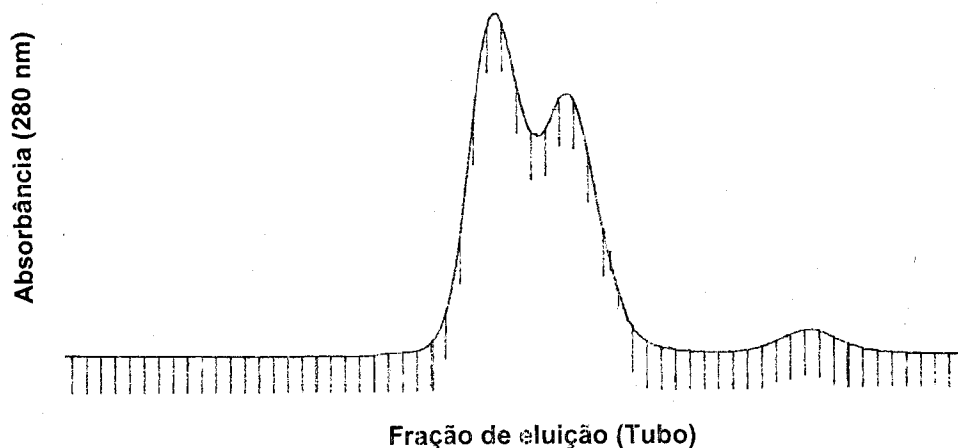


FIGURA 6. Perfil cromatográfico em FPLC com uma coluna de exclusão molecular, Sephacryl S-200, da amostra de anticorpo Anti-CEA digerido pela pepsina imobilizada em agarose.

5.1.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para verificar a eficiência da pepsina na digestão do anticorpo íntegro e o rendimento dessa digestão.

As frações referentes ao 1º Pico e 2º Pico da FIG. 6, foram submetidas a eletroforese para confirmar a digestão do anticorpo.

Ao analisar a FIG. 7, observa-se no primeiro poço as bandas formadas pelo padrão de peso molecular utilizado. As três bandas seguintes (2º, 3º e 4º poços) são referentes às frações do primeiro pico (150 kDa), as outras três (5º, 6º e 7º poços) são referentes ao segundo pico (100 kDa) e a última referente à amostra de anticorpo íntegro (150 kDa) antes da digestão que foi usada como controle.

Os dados observados na FIG. 7, confirmam assim a digestão do anticorpo pela pepsina com a formação do fragmento $F(ab')_2$.

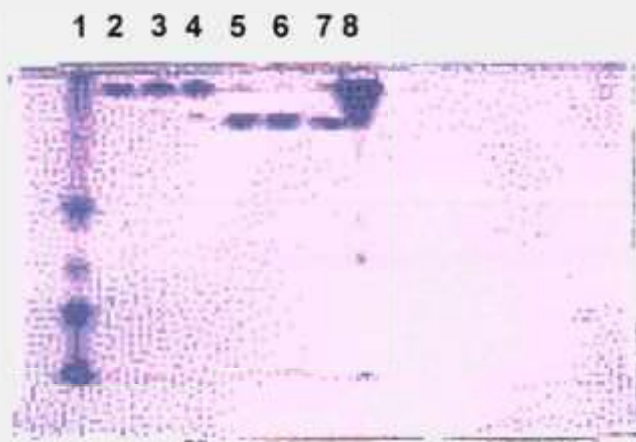


FIGURA 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da amostra de anticorpo Anti-CEA digerido pela pepsina imobilizada em agarose.

5.2 Redução do anticorpo íntegro e do fragmento $F(ab')_2$

O número de grupos $-SH$ /molécula, formados após a redução do fragmento $F(ab')_2$ do anticorpo anti-CEA e do anticorpo íntegro anti-CD20 (planejamento experimental), foi determinado. Usando esse número, a importância das variáveis estudadas no planejamento experimental (anti-CD20) foram determinadas com o software Minitab 14, sendo as condições mais adequadas utilizadas na redução do anticorpo antimiosina íntegro e seu fragmento $F(ab')_2$.

5.2.1 Purificação do fragmento e anticorpo íntegro reduzidos e avaliação da concentração protéica

Pela concentração protéica dos Acs, determinada pela equação 1, observa-se que o fragmento $F(ab')_2$ e o anticorpo íntegro reduzidos, ao serem purificados em coluna PD-10, foram eluídos sempre entre as frações 2, 3 e 4. (TAB. 8, TAB. 9 e TAB. 10).

Tabela 8. Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução do fragmento $F(ab')_2$ do anticorpo anti-CEA.

REDUÇÃO FRAGMENTO $F(ab')_2$ anti-CEA		
Fração	Abs (280 nm)	Concentração (mg/mL)
03	0,027	0,019
04	0,045	0,032

Observa-se uma pequena concentração do fragmento reduzido após a purificação em coluna PD-10. Essa baixa concentração pode ser explicada pela grande perda de massa durante as etapas do processo de digestão, já que iniciou-se a digestão com uma massa de 1mg do anticorpo anti-CEA.

TABELA 9. Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução com DTT do anticorpo íntegro anti-CD20 (planejamento experimental).

REDUÇÃO DTT			
Ensaio	Fração	Abs (280nm)	Concentração (mg/mL)
1	Fração 03	1,005	0,718
	Fração 04	0,056	0,040
2	Fração 02	0,094	0,067
	Fração 03	1,054	0,753
3	Fração 02	0,457	0,326
	Fração 03	0,952	0,680
4	Fração 02	0,097	0,069
	Fração 03	0,964	0,689
5	Fração 02	0,157	0,112
	Fração 03	1,234	0,881
6	Fração 02	0,569	0,406
	Fração 03	1,028	0,734

TABELA 10. Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução com 2-ME do anticorpo íntegro anti-CD20 (planejamento experimental).

REDUÇÃO 2-ME			
Ensaio	Fração	Abs (280nm)	Concentração (mg/mL)
1	Fração 03	1,091	0,779
	Fração 04	0,106	0,076
2	Fração 02	0,314	0,224
	Fração 03	0,985	0,704
3	Fração 02	0,113	0,081
	Fração 03	0,947	0,676
4	Fração 02	0,197	0,141
	Fração 03	0,798	0,570
5	Fração 02	0,522	0,373
	Fração 03	0,849	0,606
6	Fração 02	0,752	0,537
	Fração 03	0,529	0,378

As concentrações do anticorpo anti-CD20, FIG. 9 e FIG. 10, foram utilizadas no cálculo do rendimento da redução, sendo consideradas somente as frações que apresentam uma concentração maior que 0,5 mg/ml (destaque).

5.2.2 Determinação do número de grupos –SH reduzidos

A determinação do número de grupos –SH/molécula formado em cada condição de redução foi determinada pelo método de Ellman.

Utilizando as concentrações protéicas determinadas na equação 1 e as curvas de calibração, descritas no item seguinte (5.2.2.1), calculou-se o número de grupos –SH/molécula pelas equações 2 e 3 para os dois agentes redutores (TAB. 11 e TAB. 12). Esses números foram então analisados utilizando o programa Minitab 14 como sendo o rendimento da redução, permitindo avaliar a importância de cada variável no processo.

TABELA 11. Planejamento experimental da redução com 2-mercaptoetanol.

Variáveis utilizadas e resultados obtidos.

Redutor 2-ME				
Ensaio	Conc.	Tempo	Agitação	-SH/molécula
1	1:500	15	1400	3,85
2	1:1500	15	300	9,59
3	1:500	45	300	10,21
4	1:1500	45	1400	5,26
5	1:1000	30	850	22,28
6	1:1000	30	850	25,70

TABELA 12. Planejamento experimental da redução com ditioneitol. Variáveis utilizadas e resultados obtidos.

Redutor DTT				
Ensaio	Conc.	Tempo	Agitação	-SH/molécula
1	1:500	15	1400	2,51
2	1:1500	15	300	9,56
3	1:500	45	300	11,47
4	1:1500	45	1400	5,41
5	1:1000	30	850	14,81
6	1:1000	30	850	17,98

Pela análise estatística (TAB. 13 e TAB. 14), obtida utilizando o programa Minitab 14, observou-se uma boa reprodutibilidade nos resultados em relação aos dois redutores (2-ME e DTT). A observação de uma curvatura significativa indica fortemente a existência de um ponto de máximo. Para determinar de forma mais precisa esse ponto máximo seria necessário fazer experimentos com os pontos axiais.

TABELA 13. Análise do planejamento experimental da redução com 2-ME.

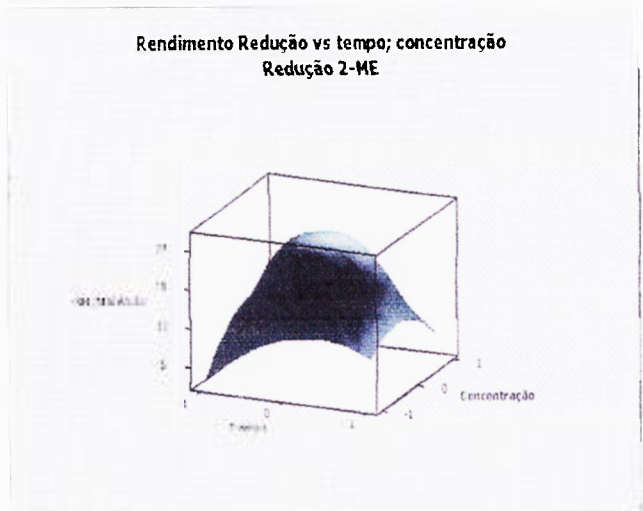
ANÁLISE REDUÇÃO 2-MERCAPTOETANOL(2-ME)					
Variável	Efeito	Coeficiente	SE coef.	T	P
Concentração	0,395	0,197	1,209	0,16	0,897
Tempo	1,015	0,507	1,209	0,42	0,747
Agitação	-5,345	-2,673	1,209	-2,21	0,270
	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Curvatura	374,642	374,642	674,642	64,06	0,079

TABELA 14. Análise do planejamento experimental da redução com DTT.

ANÁLISE REDUÇÃO COM DITIOTREITOL (DTT)					
Variável	Efeito	Coeficiente	SE coef.	T	P
Concentração	0,510	0,255	1,121	0,23	0,858
Tempo	2,420	1,210	1,121	1,08	0,476
Agitação	-6,540	-3,270	1,121	-2,92	0,210
	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Curvatura	111,630	111,630	111,630	22,22	0,133

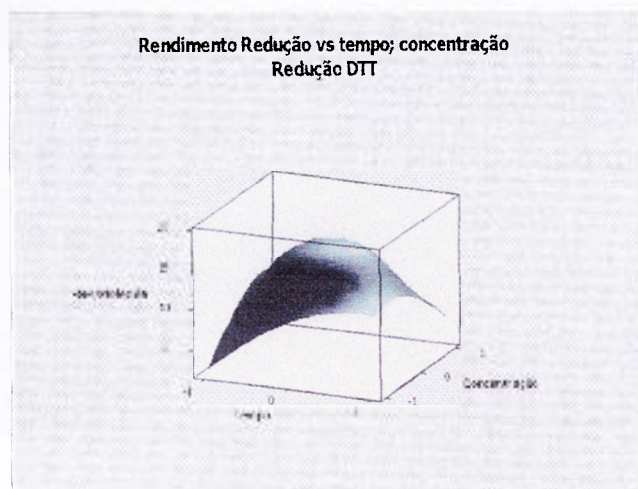
Os gráficos de superfície de resposta abaixo, FIG. 8 e FIG. 9, mostram claramente as condições nas quais são obtidos os melhores rendimentos com cada um dos dois agentes redutores. As variáveis estão codificadas nos gráficos, sendo o valor “-1” referente ao menor valor utilizado, o valor “+1” referente ao maior valor utilizado e o valor “0” referente ao valor médio da variável.

Observa-se que quando utilizou-se uma concentração de redutor na razão molar de 1:1000 (anticorpo:redutor) e uma incubação de 30 minutos sob agitação de 850 rpm foram atingidos os melhores rendimentos, sendo assim, essas condições foram repetidas para redução do fragmento F(ab')₂ do anticorpo antimiosina íntegro.



CODIFICAÇÃO VARIÁVEIS		
	Concentração Redutor	Tempo
-1	1:500	15
0	1:1000	30
+1	1:1500	45

FIGURA 8. Gráfico de superfície de resposta do rendimento vs concentração do redutor e tempo de incubação na redução com 2-ME.



CODIFICAÇÃO VARIÁVEIS		
	Concentração Redutor	Tempo
-1	1:500	15
0	1:1000	30
+1	1:1500	45

FIGURA 9. Gráfico de superfície de resposta do rendimento vs concentração do redutor e tempo de incubação na redução com DTT.

5.2.2.1 Construção da curva padrão de cisteína

Utilizando-se soluções de cisteína com concentrações entre 0,25 e 1,0 mmol/L foram obtidas curvas de calibração, segundo método de Ellman. Essas curvas foram utilizadas para determinar o número de grupos -SH/molécula formados pela redução do anticorpo íntegro após execução do planejamento experimental (anti-CD20). Para cada amostra analisada foi traçada uma curva no mesmo dia.

Os gráficos abaixo (FIG. 10, FIG. 11 e FIG. 12) representam as curvas traçadas nos dias referentes aos ensaios 1 e 4, ensaios 2 e 3 e ensaios 5 e 6 respectivamente.

Observa-se uma excelente correlação linear entre a concentração de cisteína e a absorbância nas três curvas ($r^2 = 0,9927$; $r^2 = 0,9934$ e $r^2 = 0,9965$).

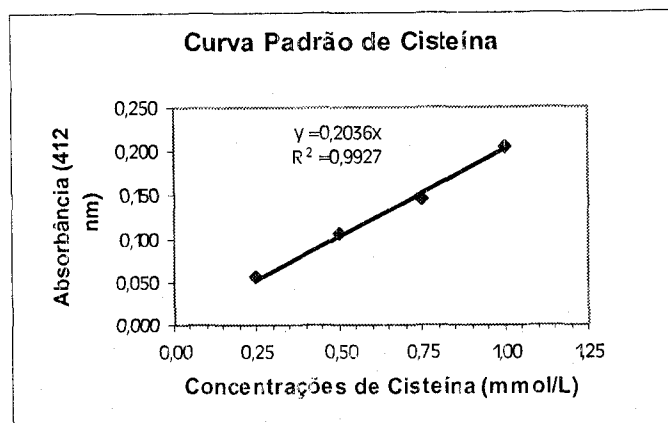


FIGURA 10. Curva padrão de cisteína usada para análise das amostras 1 e 4 do planejamento da redução com 2-ME e DTT.

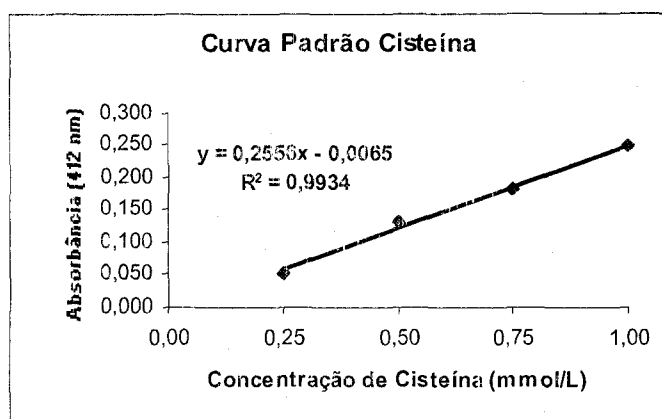


FIGURA 11. Curva padrão de cisteína usada para análise das amostras 2 e 3 do planejamento da redução com 2-ME e DTT

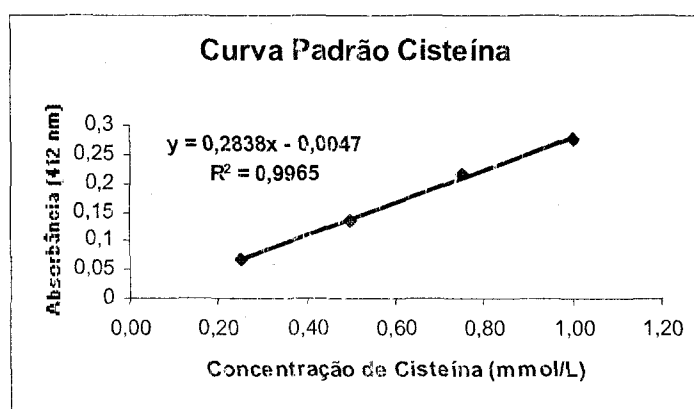


FIGURA 12. Curva padrão de cisteína usada para análise das amostras 5 e 6 do planejamento da redução com 2-ME e DTT.

5.3 Marcação do fragmento reduzido com tecnécio-99m

Seguindo os dados da bibliografia, as amostras do fragmento de anticorpo, reduzidas previamente pelo 2-ME e pelo DTT, foram inicialmente marcadas com tecnécio-99m (37 MBq) em pH 4,0, com uma massa de estanho (Sn^{2+}) de 2,5 μg e uma incubação de 60 minutos à temperatura ambiente.^(3, 12, 31, 52)

Esses parâmetros foram então variados com o objetivo de determinar a condição que proporciona os melhores rendimentos, sendo essa condição utilizada para marcação do fragmento do anticorpo antimiosina reduzido.

5.3.1 Controle de qualidade dos anticorpos marcados

Para determinação da condição ótima foi realizado o controle de qualidade do anticorpo marcado. Foram determinadas as quantidades de tecnécio-99m livre (TcO_4^-), de colóide (TcO_2) e do composto anticorpo- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, sendo essa última utilizada como parâmetro de rendimento.

5.3.1.1 Determinação da pureza radioquímica

Os gráficos, FIG. 13 e FIG.14, mostram os rendimentos das marcações em função da concentração de Sn^{2+} determinados pela cromatografia ascendente e pela cromatografia em mini colunas Sep-Pak Silica, respectivamente. ©

Observa-se que os melhores rendimentos, nos dois casos, foram obtidos com concentrações de estanho (Sn^{2+}) de 2,5 μg .

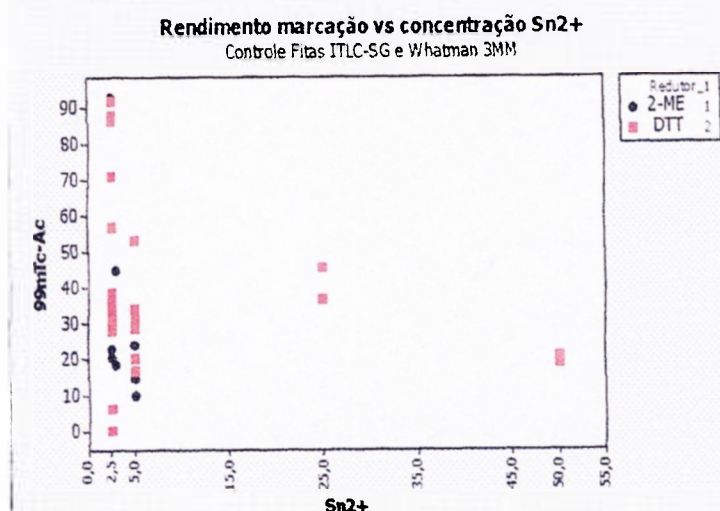


FIGURA 13. Rendimento da marcação vs $[Sn^{2+}]$ determinado pela cromatografia ascendente (fitas Whatman 3MM e ITLC-SG).

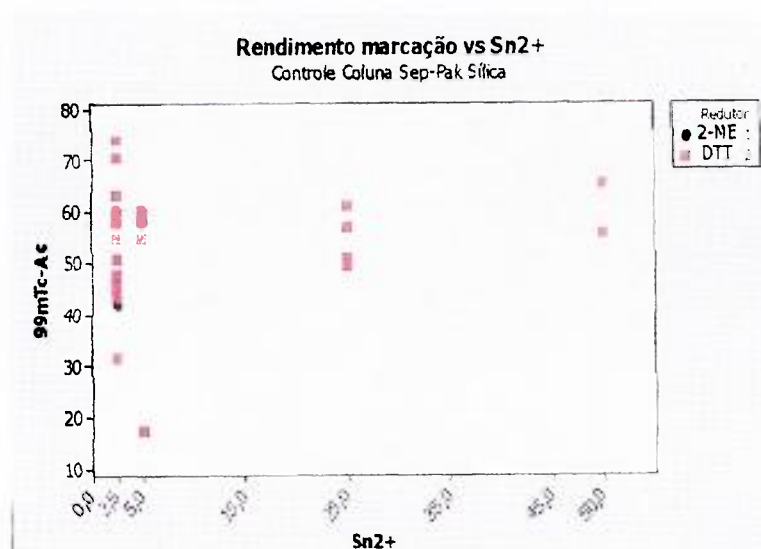


FIGURA 14. Rendimento da marcação vs $[Sn^{2+}]$ determinado pela cromatografia em mini colunas compactadas (Sep-Pak Sílica).

Os gráficos, FIG. 15 e FIG.16, mostram os rendimentos das marcações em função do pH determinados pela cromatografia ascendente e pela cromatografia em mini colunas Sep-Pak Sílica respectivamente.

No controle realizado pela cromatografia em fitas assim como no controle realizado em mini coluna Sep-Pak, os maiores rendimentos de marcação foram obtidos quando a reação foi incubada no pH 4,5 - 5,0.

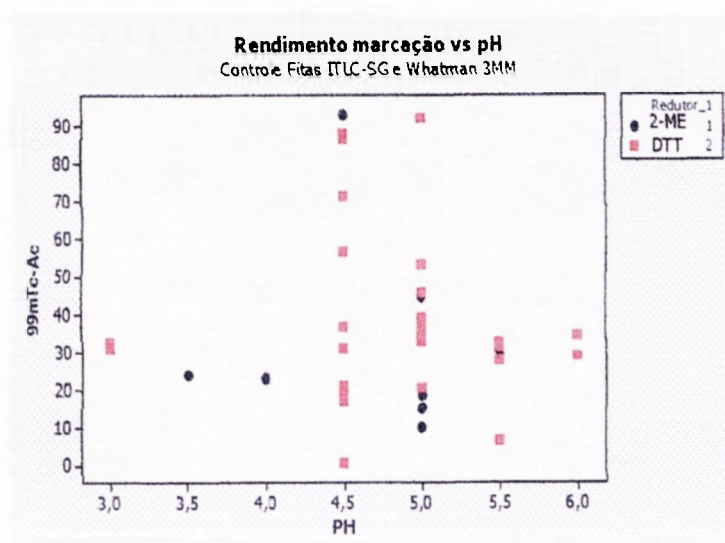


FIGURA 15. Rendimento da marcação vs pH determinado pela cromatografia ascendente (fitas Whatman 3MM e ITLC-SG).

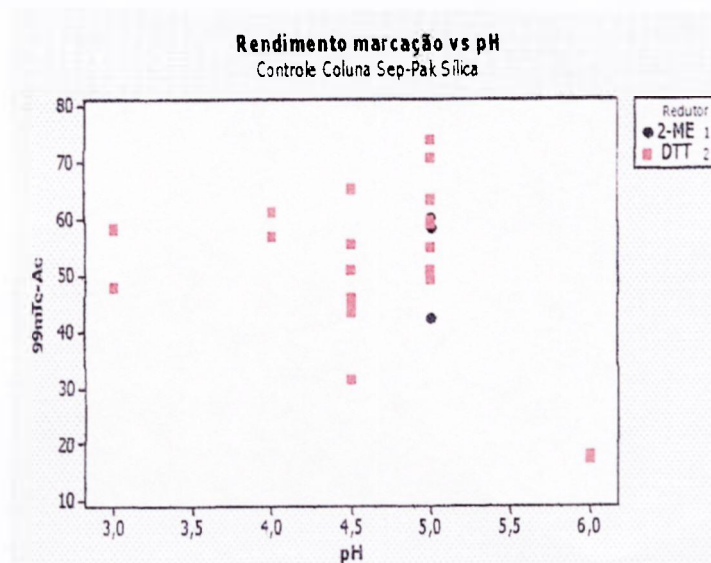


FIGURA 16. Rendimento da marcação vs pH determinado pela cromatografia em mini colunas compactadas (Sep-Pak Sílica).

Observa-se que os rendimentos obtidos pelo método da cromatografia em mini coluna Sep-Pak Sílica são mais reprodutíveis, estando concentrados em uma área menor do gráfico. Isso indica que o método apresenta uma melhor precisão do que o método da cromatografia em fita. Mesmo assim, observa-se ainda uma grande variação no rendimento de marcação para uma mesma condição experimental.

Outro método cromatográfico empregando coluna Sephadex G-25 (PD-10) eluída com tampão PBS 0,1 M pH 7,4 foi utilizado, sendo a pureza radioquímica determinada por esse método comparada à encontrada com outras técnicas com o objetivo de determinar se a variabilidade refere-se à marcação em si ou ao método cromatográfico empregado. Esses resultados estão apresentados no item 5.4.3.

5.4 Anticorpo Antimiosina

5.4.1 Digestão do anticorpo antimiosina pela pepsina imobilizada em agarose para obtenção fragmento $F(ab')_2$

Ao comparar os tempos de retenção dos picos na FIG. 18, Pico 2 (23,017 minutos), Pico 3 (23,429 minutos) e Pico 4 (25,005 minutos), com o tempo de retenção do anticorpo íntegro (17,624 minutos), FIG. 17, observa-se que a digestão foi eficiente. Por apresentar um tempo de retenção maior, ou seja, uma menor massa do que o anticorpo íntegro, os Picos 2,3 e 4 (FIG. 18) são provavelmente referentes ao fragmento $F(ab')_2$ e outros produtos formados pela digestão do anticorpo íntegro.

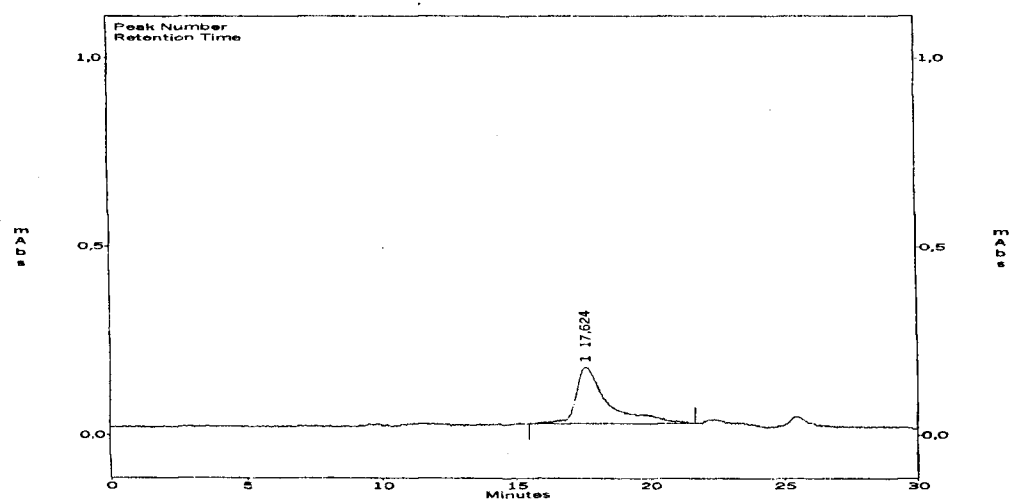


FIGURA 18 Cromatograma de HPLC da amostra de anticorpo íntegro (anticorpo antimiosina) em coluna de exclusão molecular (TSK 3000 7,5 x 600 mm, Toso-Haas).

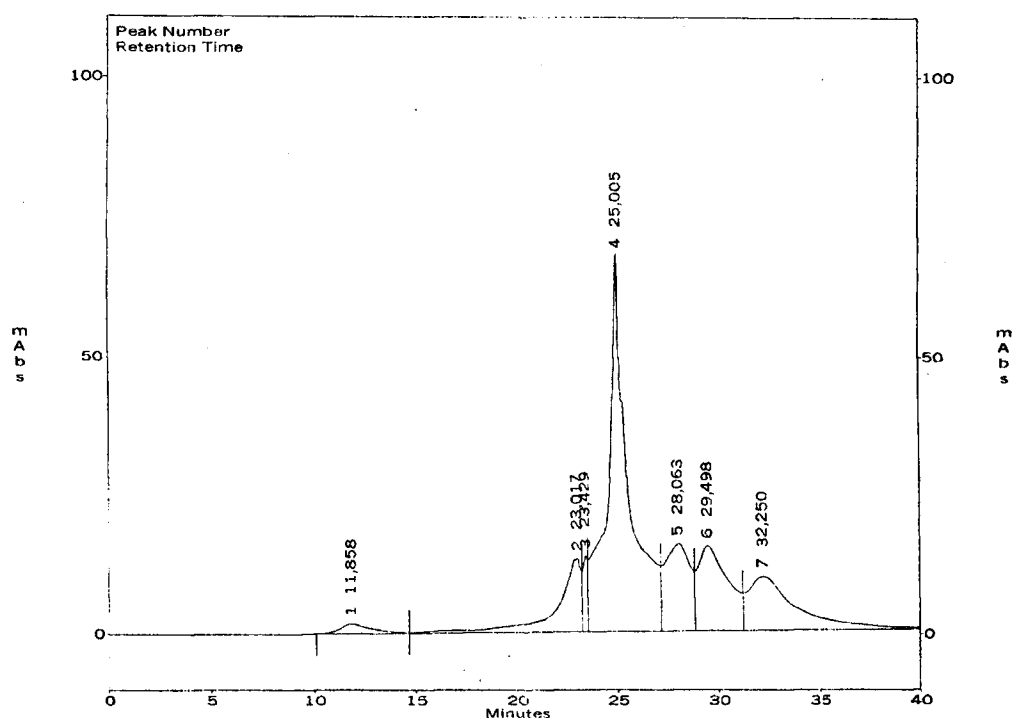


FIGURA 17. Cromatograma de HPLC da amostra de anticorpo antimiosina digerido, pela pepsina imobilizada em agarose, em coluna de exclusão molecular (TSK 3000 7,5 x 600 mm, Toso-Haas).

Devido a sua maior resolução na faixa de peso molecular do Ac, a coluna TSK 3000 foi utilizada para a análise da digestão do anticorpo antimiosina e purificação do fragmento digerido em substituição a coluna TSK 2000, previamente utilizada. Isso explica a diferença no tempo de retenção observada para o mesmo composto quando comparados os cromatogramas obtidos pelas duas colunas.

5.4.2 Redução do anticorpo íntegro e do fragmento $F(ab')_2$

Após a redução do anticorpo antimiosina íntegro e do fragmento $F(ab')_2$ utilizando-se o DTT em uma razão molar de 1:1000 (Ac:DTT) e uma incubação de 30 minutos sob agitação constante (850 rpm), as amostras foram aplicadas em uma coluna Sephadex G-25 (PD-10) para eliminar o excesso de agente redutor e purificar o reduzido.

Assim como esperado, observou-se que tanto o anticorpo íntegro quanto seu fragmento $F(ab')_2$, após redução, foram eluídos sempre entre as frações 2, 3 e 4 (TAB. 15 e TAB. 16).

TABELA 15 Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução do anticorpo antimiosina íntegro com DTT.

ANTICORPO ANTIMIOSINA INTEGRO		
Fração	Absorbância (280 nm)	Concentração (mg/ml)
3	1,002	0,716
4	0,383	0,274

TABELA 16 Concentração protéica das frações eluídas em coluna PD-10 na redução do fragmento $F(ab')_2$ com DTT.

FRAGMENTO $F(ab')_2$ ANTICORPO ANTIMIOSINA		
Fração	Absorbância (280 nm)	Concentração (mg/ml)
3	0,032	0,023
4	0,035	0,025

O rendimento da redução foi determinado utilizando-se o método de Ellman. O número de mmol/L de anticorpo reduzido foi determinado utilizando-se a equação 2 e o número de grupos -SH por molécula de anticorpo foi determinado pela equação 3. O anticorpo antimiosina reduzido com o DTT apresentou 13,28 grupos -SH/molécula de anticorpo, comprovando assim sua redução eficiente. Por apresentar uma massa muito pequena o fragmento $F(ab')_2$ reduzido foi marcado sem a determinação do número de grupos -SH formados, já que o método de Ellman não apresenta sensibilidade para determinação de concentrações muito baixas de cisteína.

5.4.3 Marcação do anticorpo íntegro e seu fragmento $F(ab')_2$ com tecnécio-99m

O anticorpo antimiosina íntegro foi reduzido com DTT e marcado com ^{99m}Tc segundo as condições encontradas como ótimas (pH 4,5 e concentrações do íon estanho de 2,5 μg). A pureza radioquímica da marcação foi avaliada utilizando-se a cromatografia ascendente (fitas de papel Whatman 3MM e fitas ITLC-SG), a cromatografia em colunas Sep-Pak Sílica (Waters) e a cromatografia em colunas Sephadex G-25 (PD-10 - Amersham). Os resultados obtidos pelos diferentes métodos (TAB. 17) foram comparados com o objetivo de determinar a confiabilidade e reprodutibilidade de cada um dos métodos empregados.

TABELA 17 Rendimento da marcação do anticorpo antimiosina íntegro determinado pela cromatografia ascendente (fitas Whatman 3MM e fitas ITLC-SG), cromatografia em coluna Sep-Pak Sílica e cromatografia em coluna PD-10.

RENDIMENTO DA MARCAÇÃO DO ANTICORPO ANTIMIOSINA (N=6)			
Método	Whatman 3MM / ITLC-SG	Sep-Pak Sílica	PD-10
Rendimento	45,21 $\pm$ 2,95	53,18 $\pm$ 4,40	90,06 $\pm$ 1,53

Observa-se pelos rendimentos mostrados na TABELA 17 que o método cromatográfico em coluna PD-10 foi o método que apresentou uma maior exatidão e precisão, já que os rendimentos determinados por esse método estão mais próximos dos valores encontrados na bibliografia ^(12, 62) e apresentam um pequeno desvio padrão. Um rendimento médio de $90,06 \pm 1,53\%$ foi obtido, sendo o produto marcado purificado por esse método e utilizado para estudo da biodistribuição e obtenção de imagens cintilográficas do anticorpo íntegro marcado.

O fragmento $F(ab')_2$ reduzido com DTT também foi marcado com ^{99m}Tc segundo as condições encontradas como ótimas (pH 4,5 e concentrações do íon estanho de 2,5 μg). A pureza radioquímica da marcação foi avaliada utilizando-se a cromatografia em coluna PD-10, sendo observada uma porcentagem de 9,36% do produto (antimiosina- ^{99m}Tc), 13,54% do tecnécio-99m livre (TcO_4^-) e 77,10% do tecnécio-99m hidrolizado (TcO_2).

Uma segunda marcação foi realizada com o fragmento $F(ab')_2$ reduzido com DTT. Por ser utilizada uma massa de fragmento quatro vezes menor que a utilizada na marcação do anticorpo íntegro (100 μg), a concentração do íon estanho utilizada na primeira marcação (2,5 μg) foi ajustada proporcionalmente, visando diminuir a formação de TcO_2 . Observou-se, porém uma diminuição na formação do produto e uma maior formação de TcO_2 . Foi observada uma porcentagem de 6,90% de antimiosina- ^{99m}Tc , 4,20% de TcO_4^- e 88,90% de TcO_2 .

Por ser um processo constituído por várias etapas, uma grande perda de massa foi observada durante a obtenção do fragmento $F(ab')_2$ reduzido. Após a padronização com outros anticorpos (planejamento experimental), a digestão de 1 mg do anticorpo antimiosina íntegro seguida pela redução do fragmento $F(ab')_2$ permitiu a obtenção de uma massa entre 20-30 μg do fragmento reduzido. Esse fragmento foi então marcado (2 marcações) e os rendimentos encontrados foram muito baixos (9,36% e 6,90%). Esses baixos rendimentos da marcação, provavelmente estão relacionados à pequena massa de fragmento $F(ab')_2$ reduzido (25 μg) utilizada na marcação.

5.4.4 Estudo da Biodistribuição

Os resultados do estudo biológico com o anticorpo antimiosina íntegro (TAB. 18, TAB. 19, FIG. 19 e FIG. 20), demonstram que o perfil de biodistribuição do radiofármaco foi compatível com a biodistribuição descrita na literatura para um radiofármaco constituído por anticorpo monoclonal.^(37, 42)

Observa-se uma baixa captação no estômago e na tireóide, evidenciando a pequena concentração de ^{99m}Tc livre. Com o passar do tempo, essa captação diminui, comprovando uma boa estabilidade do produto *in vivo*.

A alta captação no fígado demonstra que o radiofármaco é metabolizado nesse órgão. Já a alta captação nos rins após 1 hora, indica que a excreção inicial desse radiofármaco ocorre por via renal. Uma alta captação no intestino foi observada com 4 e 24 horas, indicando que após esse tempo a via de excreção predominante desse radiofármaco é a via intestinal.

Não foi observada uma grande captação no cérebro, demonstrando que o radiofármaco, assim como esperado, provavelmente não atravessa a barreira hemato-encefálica.

O coração apresentou uma baixa captação, indicando pequena afinidade do radiofármaco pelo miocárdio sadio.

A captação sanguínea foi extremamente baixa e diminuiu rapidamente com o passar do tempo. Isso evidencia uma pequena concentração de material circulante e um rápido clareamento sanguíneo do radiofármaco. Esse rápido clareamento sanguíneo sugere que o Ac íntegro apresenta uma cinética rápida, podendo ser utilizado na sua forma íntegra sem necessidade da fragmentação, um processo trabalhoso e com baixos rendimentos.

TABELA 18 Porcentagem atividade/órgão em camundongos Swiss normais.

ÓRGÃOS	% ATIVIDADE / ÓRGÃO		
	1 HORA	4 HORAS	24 HORAS
CÉREBRO	0,150 ± 0,019	0,100 ± 0,022	0,048 ± 0,012
TIREÓIDE	0,397 ± 0,161	0,573 ± 0,079	0,184 ± 0,038
PULMÃO	1,054 ± 0,097	0,698 ± 0,117	0,376 ± 0,055
CORAÇÃO	0,351 ± 0,025	0,251 ± 0,027	0,156 ± 0,034
BAÇO	1,070 ± 0,136	0,553 ± 0,227	0,402 ± 0,109
FÍGADO	23,263 ± 1,877	14,599 ± 4,122	8,494 ± 2,262
ESTÔMAGO	2,125 ± 0,187	2,070 ± 0,591	0,707 ± 0,176
MÚSCULO	0,084 ± 0,002	0,049 ± 0,009	0,029 ± 0,004
RINS	4,564 ± 0,381	4,244 ± 0,421	2,537 ± 0,346
INT. DELGADO	4,091 ± 0,286	5,540 ± 0,907	3,590 ± 0,515
INT. GROSSO	1,392 ± 0,146	3,015 ± 0,583	5,775 ± 0,589
SANGUE	0,265 ± 0,010	0,160 ± 0,030	0,058 ± 0,008

(N = 4)

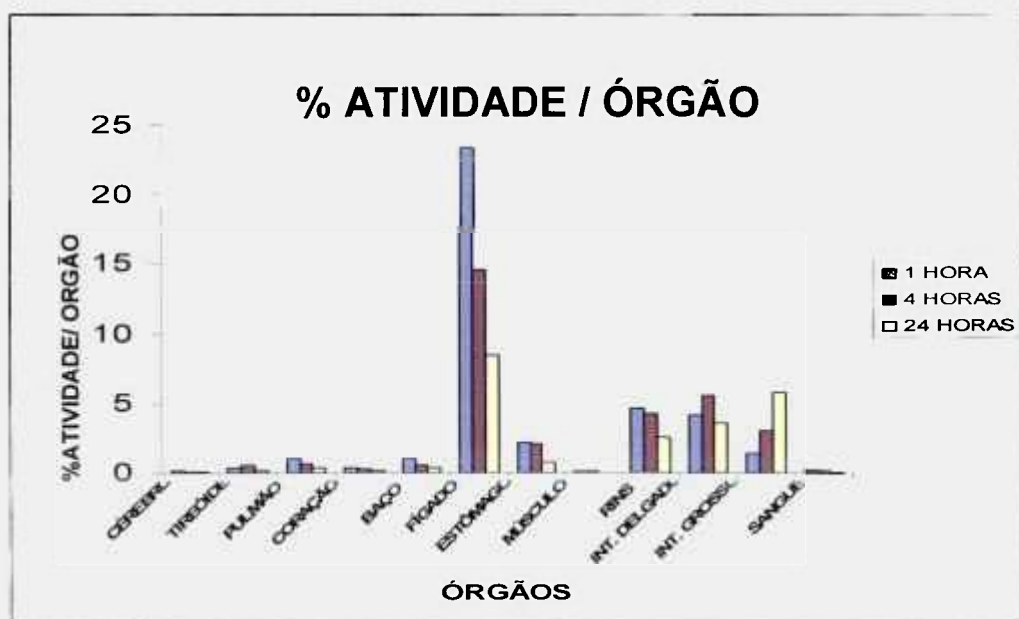


FIGURA 19 Gráfico de barras da porcentagem atividade/órgão em camundongos Swiss normais.

TABELA 19 Porcentagem atividade órgão/grama em camundongos *Swiss* normais.

ÓRGÃOS	% ATIVIDADE ÓRGÃO / GRAMA		
	1 HORA	4 HORAS	24 HORAS
CÉREBRO	0,351 ± 0,036	0,234 ± 0,075	0,120 ± 0,030
PULMÃO	5,312 ± 0,497	3,739 ± 0,816	1,569 ± 0,230
CORAÇÃO	4,173 ± 0,836	2,490 ± 0,571	1,352 ± 0,302
BAÇO	11,890 ± 1,514	8,585 ± 2,760	6,022 ± 1,403
FÍGADO	20,882 ± 2,233	12,936 ± 3,833	7,522 ± 1,046
ESTÔMAGO	7,949 ± 0,831	7,229 ± 1,928	2,569 ± 0,501
MÚSCULO	0,008 ± 0,000	0,005 ± 0,001	0,003 ± 0,001
RINS	15,746 ± 0,345	15,317 ± 0,893	8,663 ± 0,225
INT. DELGADO.	3,647 ± 0,660	4,842 ± 1,605	3,416 ± 0,895
INT. GROSSO	2,099 ± 0,395	5,291 ± 1,260	8,772 ± 1,893
SANGUE / mL	0,128 ± 0,002	0,081 ± 0,017	0,029 ± 0,005

(N= 4)

FIGURA 20 Gráfico de barras da porcentagem atividade órgão/grama em camundongos *Swiss* normais.

5.4.5 Estudo cintilográfico do antimiosina- ^{99m}Tc

As imagens cintilográficas realizadas, usando ratos *Wistar*, após 4 horas da administração do radiofármaco (FIG. 21), evidenciaram uma maior captação do antimiosina- ^{99m}Tc na região cardíaca no animal infartado quando comparado ao animal normal, comprovando assim a especificidade do anticorpo antimiosina pela miosina cardíaca exposta pelo miócito após o infarto agudo do miocárdio.

Uma grande captação medular do radiofármaco foi observada, o que pode dificultar a visualização da região cardíaca infartada devido a uma sobreposição.

A imagem da região de interesse ("Region of Interest" – ROI) confirmou que a captação na região do coração (círculo) foi maior no animal infartado. Uma porcentagem de 17,56% da atividade foi encontrada no animal infartado. Já no animal normal essa porcentagem na mesma região foi de 10,33%.

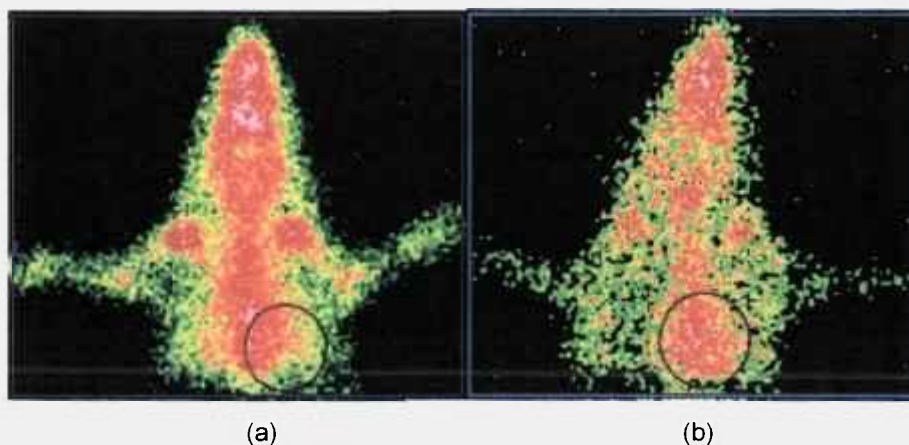


FIGURA 21. Imagens cintilográficas de rato *Wistar* 4 horas após administração do antimiosina- ^{99m}Tc . (a) animal normal, (b) animal infartado.

6. CONCLUSÕES

A marcação do fragmento $F(ab')_2$ do anticorpo monoclonal antimiosina com tecnécio-99m não mostrou-se viável devido ao alto custo do anticorpo íntegro e às dificuldades encontradas na obtenção desse fragmento, com uma grande perda de massa durante o processo (baixo rendimento). Para obtenção de uma quantidade satisfatória do fragmento seria necessário partir de uma massa muito maior de anticorpo íntegro, mas como esse anticorpo apresenta um alto custo isso torna pouco viável sua utilização.

Por outro lado, a marcação do anticorpo íntegro com tecnécio-99m apresentou bons rendimentos. A biodistribuição, em camundongos *Swiss* normais, indicou uma cinética bastante rápida e as imagens cintilográficas, em ratos *Wistar*, mostraram que esse radiofármaco apresenta boa especificidade pela região infartada. Devido à sua cinética favorável, um rendimento alto, maior simplicidade na preparação e alta especificidade, a utilização do anticorpo íntegro mostrou-se mais viável do que a utilização do fragmento $F(ab')_2$ para desenvolvimento de um radiofármaco utilizado no diagnóstico do infarto agudo do miocárdio.

Durante o desenvolvimento desse trabalho, observou-se também:

1. O protocolo de imunização utilizado foi eficiente, permitindo a produção de uma grande quantidade de anticorpos.
2. A purificação do plasma de camundongos usando uma coluna de afinidade Proteína A foi eficiente, comprovando a alta afinidade dos anticorpos pela proteína A em pH básico.
3. A digestão do anticorpo íntegro pela pepsina imobilizada em agarose permitiu a obtenção do fragmento $F(ab')_2$, comprovando a ação proteolítica dessa enzima.
4. Melhores rendimentos na digestão são observados com o tratamento prévio do anticorpo pela deglicosidase PNGase F.
5. A concentração de pepsina e a agitação apresentam influência na digestão.
6. O DTT e o 2-ME foram eficientes na quebra das ligações dissulfeto (redução do anticorpo).
7. A agitação teve uma importante influência no rendimento da redução.

8. A cromatografia em coluna PD-10 permitiu a purificação eficiente do fragmento reduzido, sempre entre as frações 2, 3 e 4.
9. O número de grupos $-SH$ formados após redução do anticorpo foi compatível com a literatura.^(3, 12)
10. Melhores rendimentos de marcação foram obtidos em pH 4,5 e quando utilizada uma massa de 2,5 μg de Sn^{2+} .
11. O método de cromatografia em coluna PD-10 apresentou uma melhor precisão e exatidão quando comparado à cromatografia ascendente (fitas Whatman 3MM e ITLC-SG) e à cromatografia em coluna Sep-Pak Sílica para determinação da pureza radioquímica da marcação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos, J.S. **Obtenção de grupamento prostético radioiodado para marcação de proteínas por via indireta.** São Paulo, 2001. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
2. Oliveira GN. **Processamento Digital de Imagens Cintilográficas em Medicina Nuclear.** Rio de Janeiro, 1974. (Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro).
3. Dias, CRBR. Estudo de marcação dos anticorpos monoclonais ior-cea-1 e ior-egf/r3 com ^{99m}Tc . São Paulo, 2005. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
4. Chandra R. *Introductory Physics of Nuclear Medicine.* 40.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p. 9-23, 43-53, 141-155, 157-170.
5. Banerjee S, Pillai MRA, Ramamoorthy, N. ***Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals.*** *Seminars in Nuclear Medicine*, v . XXXI, n. 4, p. 260 - 270, 2001.
6. Mather SJ. ***New horizons in radiopharmaceuticals.*** IAEA Bulletin, v.45/1, p.62 – 65, 2003.
7. Lavinas T. **Purificação do molibdênio-99, obtido a partir da fissão nuclear do urânio-235, utilizando-se a resina Chelex-100.** São Paulo, 1998. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
8. Araújo, E.B. **Conjuntos de reativos liofilizados de compostos diaminoditiólicos para marcação com Tecnécio-99m. Estudo farmacocinéticos e elaboração de modelos compartimentalizados dos respectivos complexos.** São Paulo, 1995. (Dissertação de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
9. Site: www.wikipedia.org/wiki/Sistema_imunitário Acessado em: 25/09/2006.
10. Janeway CA, Travers P, Walport M and Capra JD. ***Imunobiologia: O Sistema imunológico na saúde e na doença.*** 4^ª ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2000.
11. Naish SJ, Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, et al. ***Immunochemical staining methods.*** California: DAKO Corporation, 1989.

12. Mather SJ and Ellison D. **Reduction-mediated Technetium-99m labeling of monoclonal antibodies.** *J Nucl Med* 1990;31:692-697.
13. Senior R, Bhattacharya S, Manspeaker P, et al. **^{99m}Tc -antimyosin antibody imaging for the detection of acute myocardial infarction in human beings.** *Am Heart J* 1993;126:536-542.
14. Taillefer R, Boucher L, Lambert R, et al. **Technetium-99m antimyosin antibody (3-48) myocardial imaging: human biodistribution, safety and clinical results in detection of acute myocardial infarction.** *Eur J Nucl Med* 1995;22:453-464.
15. Khaw BA, Gold HK, Yasuda T, et al. **Scintigraphic quantification of myocardial necrosis in patients after intravenous of myosin-specific antibody.** *Circulation* 1986;74:501-508.
16. Saha GB. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy.** 4^o.ed. New York: Springer, 1998. p. 81-93, 98-111, 136-146, 284-293.
17. Comet M, Vidal M. **Radiopharmaceutiques: chimik des radiotraceurs et applications biologiques.** Grenaseer: Presses Universitaires de Grenaseer, 1998. p. 365-370, 379-381.
18. Site: www.wikipedia.org/wiki/Sistema_circulatorio Acessado em: 25/09/2006.
19. Site:
www.nuclear.radiologia.nom.br/trabalho/estudo/anatomia/estdirig/sistcirc.htm
Acessado em: 25/09/2006.
20. Site: <http://lesnau.vilabol.uol.com.br/coracao.htm> Acessado em: 25/09/2006.
21. Khaw BA, Beller GA, Haber E, et al. **Localization of cardiac myosin-specific antibody in myocardial infarction.** *J Clin Invest* 1976;58:439-446.
22. Khaw BA, Scott J, Fallon JT, et al. **Myocardial injury: Quantitation by cell sorting initiated with antimyosin fluorescent spheres.** *Science* 1982;217:1050-1052.
23. Rezkalla S, Kloner RA, Khaw BA, et al. **Detection of experimental myocarditis by monoclonal antimyosin antibody, Fab fragment.** *Am Heart J* 1989;117:391-395.
24. Camargo AC. **Otimização dos procedimentos de preparação, marcação e controle de qualidade do glucarato- ^{99m}Tc para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio.** São Paulo, 2007. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

25. Khaw BA, Strauss W, Carvalho A, et al. **Technetium-99m labeling of antibodies to cardiac myosin Fab and to Human Fibrinogen.** *J Nucl Med* 1982;23:1011-1019.
26. Thakur MI, DeFulvio JD. **Determination of reduced disulfide groups in monoclonal antibodies.** *BioTechniques* 1990;8:512-516.
27. Nedelman MA, Shealy DJ, Boulin R, et al. **Rapid infarct imaging with a technetium-99m-labeled antimyosin recombinant single-chain Fv: Evaluation in a canine model of acute myocardial infarction.** *J Nucl Med* 1993;34:234-241.
28. Pettit WA, Deland FH, Bennett SJ, et al. **Improved protein labeling by Stannous Tartrate reduction of Pertechnetate.** *J Nucl Med* 1980;21:59-62.
29. John E, Thakur ML, Wilder S, et al. **Technetium-99m-labeled monoclonal antibodies: Influence of Technetium-99m binding Sites.** *J Nucl Med* 1994;35:876-881.
30. Pak KY, Nedelman MA, Tam SH, et al. **Stability and Immunoreactivity of Technetium-99m antibody fragments by a direct labeling method.** [Abstract]. *J Nucl Med* 1990;31:905-906.
31. Schwarz A and Hoechst AS. **A novel approach to Tc-99m-labeled monoclonal antibodies** [Abstract]. *J Nucl Med* 1987;28:721.
32. Stalteri MA, Mather SJ. **Technetium-99m labelling of the anti-tumor antibody PR1A3 by photoactivation.** *Eur J Nucl Med* 1996;23:178-187.
33. Sykes TR, Woo TK, Baum RP, Qi P and Noujaim A. **Direct Labeling of Monoclonal Antibodies with Technetium-99m by Photoactivation.** *J Nucl Med* 1995;36:1913-1922.
34. Rhodes BA, Zamora PA, Newell KD, et al. **Technetium-99m labeling of murine monoclonal antibody fragments.** *J Nucl Med* 1986;27:685-693.
35. Castiglia SG, Duran A, Fisman G and Horenstein AL. **^{99m}Tc Direct Labeling of Anti-CEA Monoclonal Antibodies: Quality Control and Preclinical Studies.** *Nucl. Med. Biol* 1995;22:367-372.
36. Griffiths GL, Goldenberg DM, Jones AL and Hansen HJ. **Preparation of a Pure ^{99m}Tc-F(ab')₂ Radioimmunoconjugate by Direct Labeling Methods.** *Nucl. Med. Biol.* 1994;21:649-655.

37. Paik CH, Phan LNB, Hong JJ, Sahami MS, Heald SC, Reba RC, Steigman J and Eckelman WC. **The Labeling of High Affinity Sites of Antibodies with ^{99m}Tc .** *Int.Nucl.Med.Biol* 1985;12:3-8.
38. Sapienza MT, Hamada ES, Silva CPG. **^{99m}Tc -Human Polyclonal Immunoglobulin Labelling and Preliminary Results on Clinical Application.** São Paulo (Brasil): Centro de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo. 1995.
39. Wilson DS, Wu J, Peluso P, Nock S. **Improved method for pepsinolysis of mouse IgG₁ molecules to F(ab')₂ fragments.** *J. Immunol. Methods* 2002;260:29-36.
40. Ferro-Flores G and Hashimoto K. **Direct Labeling of Monoclonal Antibodies and Antibody Fragments with ^{188}Re Using a Weak Competing Ligand.** *Radiochim. Acta* 1997;79:63-70.
41. Garron JY, Moinereau M, Pasqualini R and Saccavini JC. **Direct ^{99m}Tc Labeling of Monoclonal Antibodies: Radiolabeling and *In Vitro* Stability.** *Nucl. Med. Biol* 1991;18:695-703.
42. Hnatowich DJ, Mardirossian G, Rusckov/ski M, Forgarasi M, Virzi F and Winnard P. **Directly and Indirectly Technetium-99m-Labeled Antibodies – A Comparison of In vitro and Animal in vivo Properties.** *J Nucl Med* 1993;34:109-119.
43. Dean RT, Weber R, Pak K, Boutin R, Buttram S, Nedelman M and Lister-James J. **New facile methods for stably labeling antibodies with technetium-99m.** *Bioconjug. Chem* 1992.
44. Bautovich G, Angelides S, Lee FT, Greenough R, Bundesen P, Murray P, Schmidt P, Waugh R, Harris J, Cameron K, Lambrecht RM and Basten A. **Detection of Deep Venous Thrombi and Pulmonary Embolus with Technetium-99m-DD-3B6/22 Anti-fibrin Monoclonal Antibody Fab' Fragment.** *J Nucl Med* 1994;35:195-202.
45. Abrams MJ, Juweid M, Kate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, Fuccello AJ, Strauss WH, Rubin RH and Fischman AJ. **Technetium-99m- Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivate for Imaging Focal Sites of Infection in Rats.** *J Nucl Med* 1990;31:2022-2028.
46. Kasina S, Rao TN, Srinivasan A, Sanderson JA, Fitzner JN, Reno JM, Beaumier PL and Fritzberg AR. **Development and Biologic Evaluation of a**

- Kit for Preformed Chelate Technetium-99m Radiolabeling of an Antibody Fab Fragment Using a Diamide Dimercaptide Chelating Agent.** *J Nucl Med* 1991;32:1445-1451.
47. Frame LH, Lopez JA, Khaw BA, et al. **Early membrane damage during coronary reperfusion in Dogs: Detection by radiolabeled anticardiac myosin (Fab')₂.** *J Clin Invest* 1983;72:535-544.
 48. Willerson JT. **Detection of acute myocardial infarcts by infarct-avid imaging [Editorial].** *J Nucl Med* 1991;32:269-271.
 49. Pak KY, Nedelman MA, Kanke M, et al. **An instant kit method for labeling antimyosin Fab' technetium-99m: Evaluation in an experimental myocardial infarct model.** *J Nucl Med* 1992;33:144-149.
 50. Vaccarino RA, Sanchez JE, Johnson LL, et al. **Imaging of cardiac transplation rejection in primates using two new antimyosin agents.** *J Nucl Med* 1992;33:1994-1999.
 51. Senior R, Weston J, Bhattacharya S, et al. **Specific binding of 99mTc-antimyosin to necrotic human myocardium: Clinicopathologic correlations.** *Am Heart J* 1991;122:857-859.
 52. Iwasaki T, Aihara Y, Kanda T, Oriuchi N, Endo K, Katoh H, Suzuki T and Nagai R. **Immunoscintigraphy of Aortic Dissection with ^{99m}Tc-Labeled Murine Anti-Smooth Muscle Myosin Monoclonal Antibody in Rats.** *J Nucl Med* 2001;42:130-137.
 53. Morita T, Assumpção RMV. **Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização, preparação e purificação.** 2 ° ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 1987.
 54. Harlow E., Lane D. **Antibodies: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. p. 626-631.
 55. Alves JB. **Aspectos da resposta imune frente a antígenos protéicos irradiados com ⁶⁰Co.** São Paulo, 2004. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
 56. Spencer PJ. **Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* irradiado com ⁶⁰Co.** São Paulo, 1995. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
 57. "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 Mexico 8 al 12 Octubre, 2001. Proyecto Arcal LII - Organismo Internacional de Energia Atómica.
58. Junqueira e Carneiro. **Biologia Celular e Molecular**. 7^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2000. p. 41-43, 124-133.
 59. Obrador D, Ballester M, Carrió I, et al. **High prevalence of myocardial monoclonal antimyosin antibody uptake in patients with chronic idiopathic dilated cardiomyopathy**. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:1289-1293.
 60. Vieira EC, Figueiredo EA, Gomes MV. **Química Fisiológica**. 2^o ed. Belo Horizonte: Atheneu, 1995. p. 33-37.
 61. Guyton AC. **Fisiologia Humana**. 60 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1998. p.78-84.
 62. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. **Fisiologia do Exercício**. 30 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1992. p. 227-229.
 63. Sorenson JA and Phelps ME. **Physics in Nuclear Medicine**. 2^o ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1987. p. 13-21, 143-151, 391-451, 543-548.
 64. Shung KK, Smith MB and Tsui B. **Principles of Medical Imaging**. 1^o ed. California: Academic Press, 1992. p. 164-180, 195-207.
 65. Matzku S and Stahel RA. **Antibodies in Diagnosis and Therapy – Technologies, Mechanisms and Clinical Data**. 1^o ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1999. p. 49-80, 135-158.
 66. Fukuda H.; Kubota K. **Recent developments and future aspects of nuclear medicine in oncology**. International Congress Series, 1228, p. 107 – 116, 2002.
 67. Volkert WA, Hoffman TJ. **Therapeutic radiopharmaceuticals**. *Chem. Rev.*, v.99, n.9, p. 2269 – 2292, 1999.
 68. Ercan MT, Arshady R. **In microheads, microcapsules & liposomes**. London: STC Books, 1999. p. 283 – 342.
 69. Protocolo Marcação, Controle de Qualidade e Avaliação Clínica de Anticorpos Monoclonais por Cintilografia. São Paulo (Brasil): Centro de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nuclear. 1996
 70. Janeway CA, Travers P, Walport M and Capra JD. **Immunobiology**. 50 ed. New York e Londres: Garland Sciences, 2001.

71. Inouye K, Ohnaka S. **Pepsin digestion of a mouse monoclonal antibody of IgG1 class formed F(ab')₂ fragments in which the light chains as well as the heavy chain were truncated.** *J. Biophys. Methods* 2001; 48: 23-32.
72. Martin ER, Moya-Mur JL, Casanova M, Ballester M and Crespo-Diez A. **Role of noninvasive antimyosin imaging in infants and children with clinically suspected myocarditis.** *J. Nucl. Med* 2004; 45: 429-437.
73. Eckelman WC, Paik CH and Steigman J. **Three Approaches To Radiolabeling Antibodies with ^{99m}Tc.** *Nucl Med Biol* 1989;16:171-176.
74. Chakrabarti MC, Le N, Paik CH, De Graff WG and Carrasquillo JA. **Prevention of Radiolysis of Monoclonal Antibody during Labeling.** *J Nucl Med* 1996;37:1384-1388.
75. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J and Bunn PA. **Determination of Immunoreactive Fraction of Radiolabeled Monoclonal Antibodies by Linear Extrapolation to Binding at Infinite Antigen Excess.** *J. Immunol. Methods* 1984;72:77-89.
76. Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikle DN, Wong JYC, Shively JE and Raubitschek AA. **Tumor Targeting of Radiometal Labeled Anti-CEA Recombinant T84.66 Diabody and T84.66 Minibody: Comparison to Radioiodinated Fragments.** *Bioconjugate Chem.* 2001;12:220-228.
77. Köhler G and Milstein C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature* 1975;256:495-497.
78. Goding JW. **Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.** 2° ed. San Diego, California: Academic Press. 1986. p. 4-11, 130-133, 288-291.
79. Hudson L, Hay FC. **Practical Immunology.** 3° ed. Blackwell Scientific Publications, 1989. p. 6-8, 65-75, 107-110, 212-224, 281-292, 302-319, 388-391, 467-474.
80. Jones AG and Davison A. **The relevance of basic technetium chemistry to nuclear medicine.** *J Nucl Med* 1982;23:1041-1043.