RODRIGO BARBOSA DE AGUIAR

**Aplicação diagnóstica e terapêutica de um novo anticorpo anti-FGF2
em processos de angiogênese em melanoma experimental**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Oncologia
Orientador: Jane Zveiter de Moraes

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2014**

RODRIGO BARBOSA DE AGUIAR

**Diagnostic and therapeutic application of a new anti-FGF2 antibody
in angiogenesis processes in experimental melanoma**

Dissertation presented at Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
for obtention of the degree of Doctor in
Sciences

Program of Oncology
Supervisor: Dr. Jane Zveiter de Moraes
Co-supervisor: Dr. Roger Chammas

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Aguiar, Rodrigo Barbosa de

Aplicação diagnóstica e terapêutica de um novo anticorpo anti-FGF2 em processos de angiogênese em melanoma experimental / Rodrigo Barbosa de Aguiar. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Jane Zveiter de Moraes.

Descritores: 1.Fator 2 de crescimento de fibroblastos 2.Anticorpos monoclonais
3.Melanoma 4.Angiogênese patológica

USP/FM/DBD-062/14

Do what you can, with what you have, where you are.

Theodore Roosevelt

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Jane Zveiter de Moraes, pela amizade e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas pela oportunidade de realizar este trabalho no Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo como pós-graduando pelo programa de Oncologia da Universidade de São Paulo (USP), pelo importante apoio e pelos ensinamentos durante esse período.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel, pela oportunidade e facilidade oferecida para a realização deste trabalho, permitindo que o mesmo pudesse ser conduzido no Centro de Medicina Nuclear da USP.

Ao Dr. Fábio Luiz Navarro Marques pelas discussões e pela importante contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Pablo Cabral, da Universidad de la Republica, pela disponibilidade e recursos necessários para realizar parte deste trabalho.

Ao departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da USP e ao programa de pós-graduação em Oncologia da USP, pela oportunidade de desenvolver um projeto de pós-graduação.

Aos colegas do grupo de Adesão Celular e Câncer: Adalberto Alves, Alexandre Sarmiento, Ana Carolina Cardoso, Andréia Otake, Angélica Patiño, Camila Melo, Carolina Rosal, Cristina Silva, Emerson Bernardes, Flávia Belarmino, Glauber Brito, Guilherme Francisco, Karina Furuzawa, Luciana Andrade, Luciana Pescatore, Mariana Ikoma, Priscila Cirilo, Rafael Ikemori, Renata Saito, Ronny Mitsuoka, Silvina Bustos, Sofia Santos, Silvia Guedes, Tatiane Furuya, Tharcísio Tortelli Jr, Mayara Jacomassi.

Colaboradores: Helano Freitas, Luciana Dorneles, Cláudia Nedel, Ana Cláudia Onuchic, Raimundo Araujo, Gabriela Malheiros, Luiza Lourenço, Mara Junqueira.

Aos colegas do grupo de Radiofarmácia, do Centro de Medicina Nuclear da USP, que me ajudaram durante a realização deste trabalho: Monick Evangelista, Carolina Luz, Danilo Carvalho, Alyne Laffrata, Júlia Gonzalez, Bruno Pássaro, Miriam Okamoto, Alexandre Garcez, Silvana Prando, Daniele Faria.

Às colegas do Centro de Investigaciones Nucleares da Universidad de la Republica, pelo auxílio na radiomarcagem de anticorpos: Ximena Camacho e Fernanda García.

Às colegas do departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo: Carolina Parise, Tábata de Almeida, Jéssica Sanches e Evandra.

Às colegas do Laboratório de Investigação Médica 59 da Faculdade de Medicina da USP, Nilsa e Iris, pela ajuda no processamento histológico de amostras de tecido.

Ao grupo de apoio técnico do CTO e do Laboratório de Radiofarmácia do CMN, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho: Ivanete, Willame, Jair, Lilliane, Marluce Porto, Josy, Ana Lúcia Garippo, Luciana Martins, André Orlanda, Maria Aparecida, Aline Presotto e Luiz.

Ao grupo de apoio administrativo e gerencial do CTO e do Laboratório de Radiofarmácia do CMN: Maria José Benevides, Rosilene Arruda, Cristina Grandal, Adriana Moraes, Estela, Sônia Querino, Lara Zimmermann, Márcia Freitas, Ana Lúcia, Kátia dos Anjos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro, fundamental durante o período de pós-graduação.

Obrigado!

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Angiogênese tumoral.....	3
1.2. Fator 2 de crescimento de fibroblastos.....	7
1.3. Terapia antiangiogênica em oncologia.....	8
1.4. Anticorpos monoclonais.....	10
1.5. Imunoterapia com anticorpos monoclonais.....	14
1.6. Anticorpos monoclonais com alvo na angiogênese tumoral.....	16
1.7. Imagem molecular por tomografia computadorizada por emissão de fóton único..	18
1.8. Radionuclídeos SPECT e tecnécio-99m.....	20
1.9. Radiomarcagem de anticorpos monoclonais.....	26
1.10. Anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7.....	27
2. OBJETIVO.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Cultura celular.....	33
3.2. Purificação de anticorpos monoclonais secretados por células de hibridoma.....	35
3.3. Animais de experimentação.....	36
3.4. Modelos experimentais de melanoma <i>in vivo</i>	37
3.5. Regimes de tratamento com anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7.....	39
3.6. Coleta de sangue e obtenção de soro.....	40
3.7. Detecção de anticorpos monoclonais.....	41
3.8. Eluição ácida de anticorpos em tumores.....	42
3.9. Processamento histológico.....	43
3.10. Coloração de cortes parafinados com hematoxilina e eosina (HE).....	44
3.11. Imuno-histoquímica para detecção de CD34.....	44
3.12. Imunofluorescência indireta para detecção de CD31.....	46

3.13. Análise morfométrica de vasos sanguíneos	47
3.14. Extração proteica de tumores subcutâneos B16-F10	47
3.15. Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>western blot</i>	48
3.16. Conjugação de anticorpos anti-FGF2 e ligante de CEA com 6- hidrazinonicotinamida	49
3.17. Espectrometria de massa	50
3.18. Radiomarcção de anticorpos monoclonais com tecnécio-99m	51
3.19. Cromatografia planar	52
3.20. Cromatografia líquida de alta eficiência	55
3.21. Estabilidade <i>in vitro</i> dos anticorpos ^{99m} Tc-marcados	56
3.22. Estabilidade <i>in vitro</i> dos anticorpos ^{99m} Tc-marcados frente a desafio com L-cisteína	57
3.23. Determinação do valor da constante de associação do anti-FGF2 3F12E7 IgG	57
3.24. Estudos <i>ex vivo</i> de distribuição biológica e depuração dos anticorpos radiomarcados	60
3.25. Aquisição e análise de imagens SPECT/CT	61
3.26. Estudo auto-radiográfico e de biodistribuição <i>ex-vivo</i> em camundongos portadores de nódulos pulmonares de B16-F10	65
3.27. Análise estatística	66
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL	 67
 PARTE I – APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-FGF2 EM MELANOMA EXPERIMENTAL	 71
4.I.1. Anti-FGF2 3F12E7 IgG reduz a taxa de crescimento de tumor subcutâneo B16-F10	71
4.I.2. MAb anti-FGF2 compromete a formação de nódulos metastáticos pulmonares de B16-F10.....	78
 PARTE II – RADIOMARCAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-FGF2 COM TECNÉCIO-99m PARA IMAGEM SPECT DE MELANOMA EXPERIMENTAL	85
 IIA. Radiomarcção de anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7 com ^{99m} Tc via agente quelante bifuncional HYNIC	87
4.IIA.1. Conjugação de anticorpos com HYNIC	88
4.IIA.2. Radiomarcção de mAbs anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2	93

4.IIA.3.	Constante de dissociação aparente do anticorpo ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7	105
4.IIA.4.	Estabilidade <i>in vitro</i> de mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2.....	108
IIB.	Imagem SPECT/CT de melanoma experimental B16-F10 com anticorpo anti-FGF2 ^{99m}Tc -marcado	111
4.IIB.1.	Estudo de biodistribuição de mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 em camundongos portadores de melanoma subcutâneo B16-F10	112
4.IIB.2.	Imagem SPECT/CT de mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 em camundongos portadores de melanoma subcutâneo B16-F10	123
4.IIB.3.	Imagem SPECT/CT de mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-controle de isotipo 1F5H2 em camundongos portadores de nódulo pulmonar de B16-F10.....	134
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	145
6.	CONCLUSÃO	155
7.	REFERÊNCIAS	157

ANEXO I – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética

ANEXO II – Aplicação de células de hibridoma gama-irradiadas como estratégia para administração de anticorpos monoclonais

ANEXO III – Participação de anti-FGF2 3F12E7 IgG em processos de cicatrização tecidual

LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS

%	Por cento
%ID	Percentual de dose injetada
%ID/g	Percentual de dose injetada por grama de tecido
~	Aproximadamente
+	Mais/positivo
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
≥	Maior que ou igual a
®	Registrado
μA	Microampère
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
¹¹¹ In	Isótopo de massa 111 do índio
¹²³ I	Isótopo de massa 123 do iodo
¹²⁵ I	Isótopo de massa 125 do iodo
¹³⁷ Ba	Isótopo de massa 137 do bário
¹³⁷ Cs	Isótopo de massa 137 do cézio
^{137m} Ba	Isótopo metaestável de massa 137 do bário
27G	Calibre de agulha com 0,4 cm de diâmetro externo

^{99}Mo	Isótopo de massa 99 do molibdênio
^{99}Mo	Íon molibdato
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Isótopo metaestável de massa 99 do tecnécio
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Íon pertecnetato
$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	Tecnécio coloidal
^{99}Ru	Isótopo de massa 99 do rutênio
^{99}Tc	Isótopo de massa 99 do tecnécio
Å	Ångström ($=10^{-10}$ m)
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo; do inglês <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Al_2O_3	Óxido de alumínio
ANOVA	Análise de variância
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos; mesmo que FGF2
Bq	Becquerel = 1 desintegração por segundo
BSA	Albumina sérica bovina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento; do inglês <i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CEA	Antígeno carcinoembrionário
céls.	Células
Ci	Curie ($1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10}$ desintegrações por segundo = 37 MBq)
Cl^-	Íon cloreto
cm	Centímetro
cm^3	Centímetro cúbico
CO_2	Dióxido de carbono

COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPM	Contagens por minuto
CPP	Contagens por pixel
CRC	Carcinoma colorretal
CT	Tomografia computadorizada; do inglês <i>computed tomography</i>
CTO	Centro de Investigação Translacional em Oncologia
Cys	Cisteína
Da	Dalton
DAB	3,3-diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dr.	Doutor
DTIC	Dacarbazina
EDTA	Ácido dietilenotriaminotetraacético
ELISA	Ensaio imunoenzimático; do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPR	Permeabilidade e retenção aumentadas; do inglês <i>enhanced permeability and retention</i>
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FA	Farmacopéia Americana
Fab	Fragmento de imunoglobulina que se liga ao antígeno; do inglês <i>antigen-binding fragment</i>
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulina
FcR	Receptor para a fração cristalizável de imunoglobulina
FcγR	Receptor para a fração cristalizável de imunoglobulina G

FDA	Agência reguladora de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos; do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FE	Farmacopéia Européia
FGF2	Fator 2 de crescimento de fibroblastos
FGFR	Receptor para o fator de crescimento de fibroblasto
Fig.	Figura
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
frag.	Fragmento
g	Aceleração da gravidade ($= 9,8 \text{ cm/s}^2$)
Gy	Gray (1 Gy = 1 — = 100 rad); dose de radiação ionizante absorvida
h	Hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HE	Coloração com hematoxilina e eosina
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
hFGF2	FGF2 humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência; do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
HYNIC	6-hidrazinonicotinamida
IgG	Imunoglobulina G
ip	Intraperitoneal(mente)
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ITAM	Sequência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina; do inglês immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM	Sequência de inibição de imuno-receptor baseada em tirosina; do inglês immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
iTLC-SG	Papel para cromatografia instantânea em camada delgada impregnado com sílica gel
iv	Inóculo endovenoso, via veia caudal
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
keV	Quiloeletronvolt
kg	Kilograma
kV	Quilovolt
kVp	Quilovolt pico
m	Massa; unidade de medida
M	Molar
m/v	Proporção massa/volume
m/z	Razão massa/carga
mAb	Anticorpo monoclonal
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz; do inglês <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MBq	Megabecquerel
mCi	MiliCurie (1 mCi = 37 MBq)
mFGF2	FGF2 murino
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro

mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz
MRI	Imagem de ressonância magnética; do inglês <i>magnetic resonance imaging</i>
mtorr	Militorr (1 torr = 1 mmHg); unidade de pressão
Na ^{99m} TcO ₄	Pertecnetato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
NIH	Instituto Nacional de Saúde dos EUA; do inglês <i>National Institute of Health</i>
nm	Nanometro
NO ₃ ⁻	Íon nitrato
°	Grau (1° = — rad)
°C	Grau Celsius
OCT	Meio de congelamento; do inglês <i>Optimal Cutting Temperature</i>
OD	Densidade óptica; do inglês <i>Optical Density</i>
OH ⁻	Íon hidróxido
OPD	Orto-fenilenodiamina
OSEM	Algoritmo iterativo de subconjuntos ordenados - maximização da expectativa; do inglês <i>ordered subset expectation maximization</i>
p	Nível estatístico de significância
pág.	Página
PBS	Solução salina fosfato-tamponada
PDGF	Fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas

PET	Tomografia por emissão de pósitrons; do inglês <i>Positron Emission Tomography</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Prof.	Professor
PRq	Pureza radioquímica
PSA	Antígeno de membrana específico de próstata
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RCC	Carcinoma renal
R _f	Fator de retardamento
RIA	Radioimunoensaio
ROI	Região de interesse; do inglês <i>region of interest</i>
RPMI	Meio de cultivo celular <i>Roswell Memorial Park Institute</i>
sc	Subcutâneo/subcutaneamente
SDS	Detergente dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamina contendo SDS
SnCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto estanoso diidratado
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único; do inglês <i>single-photon emission computed tomography</i>
Suc	Succinimidyl
T _{1/2}	Meia-vida
TGF	Fator de crescimento transformante
™	Marca registrada; do inglês <i>trademark</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Tricina	N-[Tris(hidroximetil)-metil]glicina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

UdelaR	Universidad de la Republica
US\$	Dólar (dólares); moeda norte-americana
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts
v/v	Proporção volume/volume
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
vs	Versus
W	Watts; unidade de medida
W1	Papel cromatográfico Whatman 1
β	Beta
γ	Gama
λ	Constante de decaimento

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática do gatilho angiogênico em tumores.....	4
FIGURA 2. Linha do tempo do desenvolvimento de anticorpos monoclonais.....	10
FIGURA 3. Estrutura molecular de anticorpo.....	12
FIGURA 4. Resolução espacial dos equipamentos SPECT e PET de uso pré-clínico e clínico	20
FIGURA 5. Esquema simplificado do decaimento de ^{99}Mo a $^{99\text{m}}\text{Tc}$	22
FIGURA 6. Obtenção de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a partir de geradores $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	23
FIGURA 7. Curva atividade-tempo para gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	24
FIGURA 8. Fração do eluato de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ocupada por $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em função do tempo	25
FIGURA 9. Modelo farmacodinâmico proposto para o anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7	28
FIGURA 10. Vetor de expressão uP-hFGF2 utilizado para imunização de camundongos para produção de células de hibridoma secretoras de anti-FGF2 3F12E7 IgG.	29
FIGURA 11. Método de cromatografia planar ascendente utilizado para determinar a pureza radioquímica de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG	54
FIGURA 12. Plataforma SPECT/CT Triumph TM (Gamma Medica-Ideas, EUA)	64
FIGURA 13. Imunorreatividade e pureza dos anticorpos monoclonais 3F12E7 e 1F5H2	70
FIGURA 14. Tratamento com mAb 3F12E7 interfere no crescimento de tumor subcutâneo B16-F10	73

FIGURA 15. Secreção <i>in vivo</i> eficiente de anticorpos monoclonais por células de hibridoma irradiadas	74
FIGURA 16. Eluição ácida de imunoglobulina de tumores	75
FIGURA 17. Tratamento com mAb anti-FGF2 3F12E7 purificado interfere na taxa de crescimento de tumor subcutâneo B16-F10 e reduz número de vasos CD31 ⁺	77
FIGURA 18. Anticorpo anti-FGF2 secretado por células de hibridoma 3F12E7 gama-irradiadas interfere no crescimento de nódulos pulmonares de melanoma	80
FIGURA 19. Anti-FGF2 3F12E7 IgG reduz a densidade microvascular em nódulos metastáticos B16-F10 no pulmão	83
FIGURA 20. Roteiro de atividades para estudos <i>in vitro</i> de ^{99m} Tc-IgG.....	87
FIGURA 21. Diagrama esquemático da ligação de HYNIC a proteínas	89
FIGURA 22. Anticorpo anti-FGF2 3F12E7 é efetivamente conjugado com HYNIC ...	91
FIGURA 23. Perfil cromatográfico de ^{99m} Tc-HYNIC-3F12E7 IgG em sistemas de cromatografia planar.....	98
FIGURA 24. Perfil cromatográfico de ^{99m} Tc-HYNIC-1F5H2 IgG em sistemas de cromatografia planar.....	99
FIGURA 25. Perfil radiocromatográfico de ^{99m} Tc-Sn coloidal em SEC-HPLC	100
FIGURA 26. Perfil cromatográfico de ^{99m} Tc-HYNIC-IgG em SEC-HPLC	101
FIGURA 27. Curva de ligação específica de ^{99m} Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em função do aumento da concentração desse anticorpo radiomarcado	107
FIGURA 28. Estabilidade radioquímica de mAb ^{99m} Tc-marcados	109
FIGURA 29. Roteiro de atividades para estudo da distribuição corpórea de ^{99m} Tc-IgG.....	111

FIGURA 30. Captação de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em pulmão contendo nódulos tumorais B16-F10 em camundongos C57Bl/6 avaliada em ensaios de biodistribuição <i>ex vivo</i>	122
FIGURA 31. Plano experimental para aquisição de imagens SPECT/CT <i>in vivo</i> e estudos farmacocinéticos <i>ex vivo</i> de camundongos portadores de tumor subcutâneo ..	126
FIGURA 32. Renderização de volume tridimensional de imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 pós-inóculo de anticorpo radiomarcado.....	127
FIGURA 33. Imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 portadores de tumor subcutâneo B16-F10 4 h pós-inóculo de anticorpo radiomarcado	129
FIGURA 34. Imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 portadores de tumor subcutâneo B16-F10 24 h pós-inóculo de anticorpo radiomarcado	131
FIGURA 35. Captação de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em tumores B16-F10 em camundongos C57Bl/6	133
FIGURA 36. Plano experimental para aquisição de imagens SPECT/CT <i>in vivo</i> em camundongos portadores de nódulo pulmonar de B16-F10.....	137
FIGURA 37. Imagens CT e SPECT/CT do tórax de camundongo C57Bl/6, portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10, após inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG.....	138
FIGURA 38. Imagens CT e SPECT/CT do tórax de camundongo C57Bl/6, portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10, após inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-controle de isotipo 1F5H2 IgG	140
FIGURA 39. Imagens CT e SPECT/CT do tórax de camundongos C57Bl/6, desprovidos de nódulos tumorais, pós-inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG	142

FIGURA 40. Análise auto-radiográfica *ex vivo* correlaciona radioatividade de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 IgG em secção pulmonar com regiões de nódulos tumorais143

FIGURA 41. Análise auto-radiográfica *ex-vivo* de secção de pulmões contendo nódulos tumorais, obtidos de animais injetados com ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA IgG.....144

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Moduladores da angiogênese tumoral.....	6
TABELA 2. Padrão de expressão de FcγR e afinidade (K_A) para subclasses de IgG murino e humano.	14
TABELA 3. Anticorpos monoclonais atualmente aprovados pelo FDA para uso em oncologia e seus mecanismos de ação.	16
TABELA 4. Radionuclídeos utilizados para imagem molecular por SPECT.	21
TABELA 5. Sistemas de cromatografia planar utilizados para aferir pureza radioquímica de anticorpos ^{99m}Tc -marcados.	53
TABELA 6. Caracterização de ^{99m}Tc -HYNIC-IgG.....	96
TABELA 7. Estudo farmacocinético de ^{99m}Tc -HYNIC- IgG em camundongos C57Bl/6 portadores ou não de tumor subcutâneo B16-F10 4 h pós-inóculo	120
TABELA 8. Estudo farmacocinético de ^{99m}Tc -HYNIC-IgG em camundongos C57Bl/6 portadores ou não de tumor subcutâneo B16-F10 4 h pós-inóculo	121
TABELA 9. Custo estimado por anticorpo monoclonal.....	150

RESUMO

Aguiar RB. *Aplicação diagnóstica e terapêutica de um novo anticorpo anti-FGF2 em processos de angiogênese em melanoma experimental* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Evidências sugerem que o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), produzido por melanomas, possui importante papel no crescimento tumoral, angiogênese e metástase. Assim, o uso de anticorpo monoclonal (mAb) que reconhece e bloqueia a atividade de FGF2 é uma abordagem a ser considerada em oncologia. O propósito desse estudo foi avaliar a aplicação diagnóstica e terapêutica de um novo anticorpo anti-FGF2, 3F12E7 IgG1, em melanoma experimental B16-F10. Para isso, camundongos C57Bl/6 foram implantados subcutaneamente (ou intravenosamente, para ensaios de metástase) com células de melanoma murino B16-F10 (5×10^5 células/animal). Quando tumores alcançaram 3-4 mm de diâmetro (ou 24 h pós-inóculo de células B16-F10, no caso de ensaios de metástase), camundongos foram tratados com anti-FGF2 3F12E7 IgG. Animais controle receberam igual volume do veículo ou quantidade de anticorpo controle de isotipo. Grupos: animais tratados com (1) anti-FGF2 3F12E7 IgG1; (2) ligante de CEA IgG1 (controle de isotipo); e (3) veículo. O tratamento dos camundongos portadores de tumor com anti-FGF2 IgG resultou, comparado com os controles salina e de isotipo, em uma redução no número de focos metastáticos nos pulmões (ANOVA, $p < 0,05$), em ensaios de metástase experimental, bem como em uma menor taxa de crescimento de tumores subcutâneos ($n=7$ /grupo). Esse resultado é acompanhado por uma redução na densidade vascular do tumor, conforme determinado

por imunomarcção para CD34 ou CD31. A captação tumoral de anti-FGF2 3F12E7 IgG foi avaliada por métodos de medicina nuclear, usando esse anticorpo radiomarcado com tecnécio-99m. Estudos SPECT/CT *in vivo* e de biodistribuição *ex vivo* revelaram que ^{99m}Tc-anti-FGF2 3F12E7 IgG pode atingir eficientemente tumores subcutâneos e metastáticos de B16-F10. Assim, esses dados sugerem que anti-FGF2 3F12E7 IgG pode ser uma estratégia antitumoral promissora para melanoma, bem como uma potencial ferramenta de imagem a ser explorada, atuando como um possível traçador para rastrear tumores FGF2-positivos e mapear esse estímulo angiogênico no microambiente tumoral. Aprovado pelo comitê de ética (CAPPesq): número 0942/09.

Descritores: Fator 2 de crescimento de fibroblastos; Anticorpos monoclonais; Melanoma; Angiogênese patológica.

ABSTRACT

Aguiar RB. *Diagnostic and therapeutic application of a new anti-FGF2 antibody in angiogenesis process in experimental melanoma* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Compelling evidence suggests that fibroblast growth factor 2 (FGF2), produced by melanomas, plays important role in tumor growth, angiogenesis and metastasis. Therefore, the use of a monoclonal antibody (mAb) that recognizes and blocks FGF2 activity is seen as an approach to be considered in oncology. The purpose of this study was to evaluate the diagnostic and therapeutic application of a new anti-FGF2 antibody, 3F12E7 IgG1, in experimental melanoma B16-F10. For this, C57Bl/6 mice were subcutaneously (or intravenously, for experimental metastasis assay) implanted with murine melanoma B16-F10 cells (5×10^5 cells/animal). When tumors reached 3-4 mm in diameter (or 24 h after B16-F10 cells injection, in the case of metastasis assay), mice started receiving anti-FGF2 3F12E7 IgG. Control mice received equal volume of vehicle or isotype control IgG amount. Groups: (1) anti-FGF2 3F12E7 IgG1-treated, (2) CEA-binding IgG1-treated (isotype control) and (3) vehicle-treated mice. The treatment of tumor-bearing mice with anti-FGF2 IgG, compared with saline and isotype controls, led to a reduction in the number of metastatic foci in the lungs (ANOVA test, $p < 0.05$), in experimental metastasis assays, as well as to a lower subcutaneous tumor growth rate ($n=7$ per group). This result is accompanied by a reduction in the tumor vascular density, as determined by CD34 or CD31 staining. The anti-FGF2 3F12E7 IgG tumor uptake was evaluated by nuclear medicine approaches, using this antibody radiolabeled

with technetium-99m. *In vivo* SPECT/CT and *ex vivo* biodistribution studies revealed that ^{99m}Tc-anti-FGF2 IgG could efficiently achieved B16-F10 subcutaneous and metastatic tumors. Thus, these data suggest that the anti-FGF2 3F12E7 IgG may be a promising antitumor strategy for melanoma, as well as a potential imaging tool to be explored, working as a possible tracer to identify FGF2-positive tumors and map this angiogenic stimulus in the tumor microenvironment. Ethics committee (CAPPesq) approval number 0942/09.

Descriptors: Fibroblast Growth Factor 2; Monoclonal antibody; Melanoma; Pathologic angiogenesis.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo, sendo responsável, no Brasil, pela segunda maior causa de mortes (<http://www.inca.gov.br/>) e, mundialmente, por uma de cada oito mortes, causando mais óbitos que AIDS, tuberculose e malária juntas (Global Cancer Facts and Figures 2007).

Dentre os tipos de neoplasias, o melanoma, apesar de pouco frequente, encontra-se entre as formas mais letais, sendo responsável pela maior parte (aproximadamente 80%) dos casos de óbito por câncer de pele (Lewis TB et al., 2005). Sua incidência tem aumentado nos últimos anos em praticamente todos os países, particularmente em indivíduos de pele clara (Rigel DS et al., 1997, Armstrong BK et al., 1994), correspondendo ao tipo de câncer que mais rapidamente cresce em número de casos, com um aumento anual de 3-7% no número de indivíduos afetados em populações caucasianas (Rigel DS et al., 1997; Beddingfield FC, 2003).

Com origem multifatorial a partir de melanócitos (Satyamoorthy K et al., 2002), suas células são capazes de se adaptar em diversos microambientes, o que, aliado a sua considerável habilidade de invasão tecidual, contribui para seu alto potencial metastático, responsável pela elevada mortalidade associada ao melanoma maligno (Satyamoorthy K et al., 2002; Cancer Facts and Figures 2013)

A progressão de melanomas ocorre em diferentes etapas: nevo nevocelular, nevo displásico, melanoma in situ, melanoma de crescimento radial (índice Breslow $\leq 0,75$ mm) e melanoma metastático (índice Breslow $> 0,75$ mm). Sua progressão está associada ao desenvolvimento de rica rede vascular, bem como ao aumento da

proporção de células tumorais portadoras de receptor de laminina, o qual permite sua adesão à parede vascular (Rastrelli M et al., 2013).

Apesar de uma significativa taxa de cura por ressecção cirúrgica (taxa de sobrevida superior a 95%) quando diagnosticado precocemente, sua forma metastática é altamente refratária a abordagens sistêmicas como quimioterapia e imunoterapia (Wascher TC, 2003). Ensaios pré-clínicos e clínicos apontam que as atuais medidas terapêuticas direcionadas ao melanoma metastático apresentam benefícios apenas transitórios, com quimiorresistência por parte dos tumores (Bergers G e al., 2008), além de exemplos de células no estroma tumoral que inesperadamente aumentam a invasão e metástase do tumor após tratamento com quimioterápico (Stockmann C et al., 2008).

Um exemplo disso é o tratamento com dacarbazina (5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol)-4-carboxamida, DTIC), considerado por muitos anos uma das poucas terapias disponíveis para melanoma (Miller DM et al., 2014). Apesar de sua comprovada eficácia em pacientes com melanoma metastático (Chapman PB et al., 1999), DTIC está associado à respostas clínicas apenas temporárias, sem melhoras na sobrevida do indivíduo (Guerry D, 1992). Mantêm-se, assim, um prognóstico muito baixo para pacientes com melanoma disseminado, com uma expectativa de vida de cinco anos para menos de 10% dos casos e uma média de sobrevida de 7,5 meses (Barth A et al., 1995; Balch CM et al., 2001), apesar da grande variedade de esforços terapêuticos que têm sido desempenhados.

Diante de tal cenário, torna-se clara a necessidade de estudos que busquem o desenvolvimento de novas opções de tratamento mais eficazes no combate a essa neoplasia. Entre as abordagens que têm sido colocadas como promissoras estão drogas antiangiogênicas.

1.1. Angiogênese tumoral

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasculatura pré-existente (Carmeliet P et al., 2000). Além de garantir um suporte adequado de oxigênio e nutrientes às células neoplásicas, a formação de uma complexa rede de microcapilares que irriga o tumor fornece uma rota para drenagem eficiente de metabólitos e para a disseminação de células tumorais, via corrente sanguínea ou linfática, para órgãos à distância (Boudreau N et al., 2003). Assim, em adição aos fatores genéticos e epigenéticos promotores de câncer, a formação de novos vasos tem papel crucial na propagação e progressão tumoral.

Dados clínicos e experimentais indicam que no início de seu crescimento a maioria das neoplasias não induz angiogênese. Essas lesões hiperplásicas existem *in situ* em um estado dormente por meses ou até mesmo anos, em decorrência do balanço entre proliferação celular e apoptose, sem o desenvolvimento de um aporte sanguíneo.

A transição de uma hiperplasia pré-vascular para um tumor vascularizado é conhecida como gatilho angiogênico (do inglês *angiogenic switch*) (**Fig. 1**). Evento intrínseco da tumorigênese, o gatilho angiogênico é resultado de uma inclinação do balanço entre fatores pró- e antiangiogênicos secretados por células do microambiente tumoral em prol dos promotores de angiogênese. Diversos sinais podem ativar o gatilho angiogênico em tumores, o que inclui estresse metabólico (por exemplo, baixo pH e baixa pressão de oxigênio), estresse mecânico (em decorrência da proliferação das células tumorais), resposta inflamatória e eventos genéticos e epigenéticos (Carmeliet et al., 2000).

Em nível molecular, a angiogênese é controlada por dois braços reguladores: fatores pró- e antiangiogênicos. Essas moléculas representam um complexo de eventos

orquestrados que são fortemente regulados por fatores micro e macro-ambientais em um aparente estado de fluxo dinâmico no tumor. Sua produção é dependente do sítio do tumor primário, além de poder ser alterada ao longo da progressão tumoral e durante o curso da terapia antineoplásica (Carmeliet P et al., 2000).

A angiogênese é uma coreografia altamente coordenada de migração, proliferação e apoptose de diversos tipos celulares. Muitas dessas funções celulares são controladas por complexos eventos de sinalização intracelulares, originados de uma variedade de receptores de superfície celular.

Figura 1. Representação esquemática do gatilho angiogênico em tumores. Células neoplásicas podem coexistir em tumores dormentes, nos quais a divisão celular é balanceada por apoptose, e em massa tumoral vascularizada, de crescimento ativo. O gatilho angiogênico ocorre quando o balanço entre fatores pró- e antiangiogênicos inclina-se a favor das moléculas promotoras de angiogênese, tais como VEGF, FGF, PDGF e MMPs, resultando na transição do estado de hiperplasia dormiente para o de tumores vascularizados, o que possibilita o rápido crescimento da neoplasia e a ocorrência de metástases. A linha pontilhada indica coexistência entre proliferação, dormência e morte celular.

Diversos fatores pró-angiogênicos (**Tabela 1**) têm sido identificados por induzir direta ou indiretamente a proliferação e diferenciação de células endoteliais. Dentre os reguladores positivos da angiogênese mais comumente descritos estão: (a) a família do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF); (b) o fator de crescimento de fibroblasto (FGF); (c) o fator de necrose tumoral (TNF); (d) o fator de crescimento transformante (TGF); (e) as angiopoietinas. Essas e outras moléculas angiogênicas, juntamente com seus mecanismos de ação, encontram-se sistematizadas na Tabela 1. Esses fatores são produtos não apenas de células tumorais como também de células infiltrantes ao tumor, o que inclui células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas, plaquetas, células inflamatórias, e células tumorais (Chung AS et al., 2010).

O outro braço regulatório da angiogênese é representado pelos inibidores de angiogênese. Opostos à atividade dos pró-angiogênicos, um grande número de agentes antiangiogênicos endógenos tem sido funcionalmente caracterizado. Ao menos 27 diferentes proteínas e outras pequenas moléculas atuam como inibidores endógenos de angiogênese, muitas das quais são fragmentos derivados da matriz extracelular, como a endostatina, um produto de clivagem proteolítica de colágeno XVIII, e canstatina e tumstatina, dois fragmentos proteolíticos de colágeno IV. Esses fragmentos são liberados por proteólise da matriz e da membrana basal vascular por enzimas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), catepsinas e elastases. Assim, a atividade desse grupo heterogêneo de antiangiogênicos é regulada em nível de expressão gênica, secreção e ativação proteolítica (Chung AS et al., 2010; Carmeliet P et al., 2000).

Diferentemente do observado em condições fisiológicas, os tumores apresentam um desequilíbrio desses fatores em direção a agentes pró-angiogênicos, resultando numa vasculatura caótica e irregular decorrente da proliferação descontrolada de células endoteliais (Carmeliet P et al., 2000).

Tabela 1. Moduladores da angiogênese tumoral

Fatores pró-angiogênicos	Mecanismo e ação
Família do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)	Estimula proliferação e motilidade de células endoteliais; regula a interação entre células endoteliais, de modo a interferir na permeabilidade vascular; participa do recrutamento de células do sistema imune promotoras de crescimento tumoral e angiogênese.
VEGF-C, -D	Estimula (linfo)angiogênese tumoral.
PIGF	Induz angiogênese em tumores.
Angiopietina (ANG) / Tie2	Tie2 é hiperexpresso em diversos carcinomas. Além de induzir migração de células endoteliais, atua no remodelamento e na maturação da rede vascular em tumores.
Fator 1 e 2 de crescimento de fibroblastos (FGF-1, -2)	Atua no remodelamento de matriz extracelular e na proliferação e migração de células endoteliais. Encontra-se hiper-expresso em diversos tipos de tumores.
Fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas e seus receptores (PDGF/PDGFR)	Mitógeno e quimioatratante para pericitos, fibroblastos e outras células mesenquimais; regula angiogênese indiretamente através da indução de VEGF.
Fator de crescimento transformante β (TGF-β)	TGF β estimula produção de matriz extracelular; hiper-regula expressão de integrinas e de VEGF; modula a proliferação e migração de células endoteliais; participa da formação de tubos capilares; interfere na estabilização de vasos sanguíneos e na interação célula endotelial-pericito.
Fator de necrose tumoral α (TNF-α)	Estimula angiogênese e diferenciação celular.
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	Estimula angiogênese e vasodilatação via tromboxano A ₂ ; regula processos celulares como apoptose.
Delta-like ligant 4 (DLL4) / via de Notch	DLL4 é hiper-regulado em vasos sanguíneos tumorais. Sua inibição compromete a vascularização e o crescimento de tumores.
Efrinas (Eph)	Hiper-reguladas em linhagens de tumor mamário metastático; exercem papel importante na formação de vasos sanguíneos.
Endotelina (ET)	ET-1 hiper-regula a expressão de VEGF pela estabilização de HIF-1; interfere na secreção de proteases por células tumorais.
óxido nítrico sintase (NOS)	Estimula angiogênese e vasodilatação.
Citocinas / quimiocinas Exemplos: IL-8 (CXCL8), ENA-78 (CXCL5), GRO (CXCL1-3), GCP-2 (CXCL6) e outros	Papel pleiotrópico na angiogênese.
Integrinas	Afetam a motilidade, mecanotransdução e proliferação celular, interferindo, assim, em um amplo espectro de processos pró-angiogênicos.
VE-caderinas	Estabilizam junções de células endoteliais nas paredes dos vasos; aumentam a sobrevivência das células endoteliais pela transmissão de sinal anti-apoptótico de VEGFs.
Ativadores de plasminogênio	Remodelação da matriz extracelular; liberação e ativação de fatores de crescimento.
Metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs)	Degradam proteínas da matriz extracelular e ativam fatores pró-angiogênicos; interferem na migração de células endoteliais e no remodelamento da rede vascular.

Adaptado de Chung AS et al., 2010.

Como o melanoma, comparado com outros tumores sólidos, apresenta uma robusta angiogênese, com alta densidade microvascular (Flaherty KT et al., 2004), técnicas direcionadas ao controle da formação de novos vasos sanguíneos são uma interessante oportunidade terapêutica a ser investigada no tratamento dessa neoplasia.

1.2. Fator 2 de crescimento de fibroblastos

Entre os elementos que têm sido identificados como reguladores positivos da angiogênese, destacamos aqui o fator 2 de crescimento de fibroblastos (FGF2). Também conhecido como fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), FGF2 é membro de uma ampla família de proteínas de funções pleiotrópicas envolvida com o crescimento, diferenciação, migração e sobrevivência de diferentes tipos celulares (Hicklin DJ et al., 2001; Powers CJ et al., 2000).

Inicialmente purificado como polipeptídeo de ligação à heparina em extratos de glândula pituitária bovina (Abraham JA et al., 1986), o FGF2 está entre os primeiros fatores angiogênicos a ser identificado (Moscatelli D et al., 1986; Shing Y et al., 1984), sendo capaz de, além de induzir o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, atuar como um fator oncogênico no crescimento de tumores (Powers CJ et al., 2000). A participação de FGF2 na progressão tumoral tem sido apontada por significativas correlações entre a sua expressão e o estágio em que o tumor se encontra (Yamanaka Y et al., 1993; Azuma M et al., 1997), bem como sua detecção em níveis elevados no soro e urina de pacientes com amplo espectro de tumores (Nguyen M et al., 1994).

Apesar de desprovido de peptídeo sinal, essa molécula é secretada à matriz extracelular, onde se liga a glicosaminoglicanos tipo heparan. Deste reservatório, o FGF2 pode atuar nas células alvo tanto por via parácrina como também autócrina,

conforme sugerido por evidências experimentais (Yamanaka Y et al., 1993; Powers CJ et al., 2000; Presta M et al., 2005).

Trabalhos na literatura relatam o papel desse fator na neovascularização de tumores (Kibbey MC et al., 1992; Miyake H et al., 1996; Wang Y et al., 1997). Ensaios *in vivo* com linhagens tumorais mostram uma correlação entre hiper-regulação da expressão de FGF2 e um aumento da neovascularização e potencial metastático (Miyake H et al., 1996). Ainda, experimentos com uso de cDNA anti-sense para FGF2 ou que adotam uma imunização ativa de camundongos com peptídeo correspondente ao domínio de ligação à heparina de FGF2 resultam na inibição da neovascularização tumoral (Plum SM et al., 2000; Coppola G et al., 1997).

Uma vez que essa associação entre FGF2 e densidade microvascular também é observada em melanomas (Wang Y et al., 1997), interferências na via de sinalização desse fator, virtualmente expresso em todos os melanomas metastáticos (al-Alousi S et al., 1996a, al-Alousi S et al., 1996b), representam uma opção de terapia antiangiogênica a ser abordada para essa enfermidade.

1.3. Terapia antiangiogênica em oncologia

A mudança do alvo do tratamento de câncer das populações de células tumorais, excepcionalmente heterogêneas, para a vasculatura tumoral, considerada mais homogênea e geneticamente estável, é um marco revolucionário no tratamento de câncer. A princípio, essa abordagem oferece meios para tratar neoplasias sistemicamente contornando três problemas classicamente associados à quimioterapia citotóxica: aquisição de resistência às drogas, elevada toxicidade e acesso limitado das

drogas ao microambiente do tumor (Hicklin DJ et al., 2001). Tão importante quanto, a terapia direcionada contra a vasculatura tumoral pode ser efetiva contra uma variedade de tumores.

A combinação de tratamento antiangiogênico com terapias citotóxicas tem se mostrado bastante efetiva no combate a doenças metastáticas, com trabalhos indicando uma significativa potencialização da redução do número de metástases pulmonares mediante essa abordagem quimioterápica conjunta (Kakeji Y et al., 1997). Assim, não é surpreendente que nos últimos anos o campo da terapia antiangiogênica direcionada ao câncer tenha atraído muita atenção.

A terapia antiangiogênica tornou-se uma realidade a partir da aprovação do medicamento bevacizumabe (Avastin®, Genentech Inc., EUA) em dezembro de 2004 pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA), um dos principais órgãos reguladores do uso de medicamentos, para seu uso intravenoso em combinação com quimioterapia convencional em câncer colorretal (CRC). A partir daí, diversos outros inibidores de angiogênese têm sido investigados, não apenas para o tratamento de CRC, mas para uma ampla variedade de tumores, incluindo carcinoma de células renais, de cabeça e pescoço, câncer de pulmão, de mama e de próstata (Hurwitz H et al., 2004; Gerber HP et al., 2005).

Mais de 800 ensaios clínicos envolvendo agentes antiangiogênicos estão correntemente em andamento, segundo o NIH (National Institutes of Health, EUA; web-site <http://www.clinicaltrials.gov/>). Esses estudos buscam inibir a angiogênese tumoral através de estratégias que: (a) Inibem vias de sinalização angiogênicas através da redução da biodisponibilidade de fatores pró-angiogênicos ou da inibição de seus receptores; (b) Hiper-regulam a liberação de inibidores endógenos; e (c) Atuam diretamente na vasculatura tumoral.

1.4. Anticorpos monoclonais

O conceito de uso de anticorpos como um agente alvo-dirigido para tumores foi proposto por Paul Ehrlich no início do século XX (Ehrlich P, 1906). Com o advento da tecnologia de hibridomas em 1975, deu-se início à produção de anticorpos monoclonais, a partir do que começaram a emergir diversas estratégias terapêuticas e diagnósticas com base nessa proteína (**Fig. 2**) (Weiner LM et al., 2010).

Figura 2. Linha do tempo do desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Legenda: mAb escrito em azul, anticorpo quimérico; em vermelho, anticorpo humanizado; em roxo, anticorpo humano; em verde, anticorpo murino. Adaptado de Weiner LM et al., 2010.

Anticorpos são glicoproteínas pertencentes à superfamília de imunoglobulinas (Buss NA et al., 2012). Anticorpos, também conhecido como imunoglobulinas, são glicoproteínas solúveis, de aproximadamente 150 kDa, encontradas no soro e em fluídos teciduais decorrente de sua secreção por células B. Essas proteínas têm um papel central na resposta imune adaptativa, sendo produzidas em resposta ao contato com partículas estranhas imunogênicas, nas quais o anticorpo se liga especificamente. A interação IgG-antígeno ocorre entre o paratopo, sítio da imunoglobulina onde o antígeno se liga, e o epítopo, sequência antigênica reconhecida pelo anticorpo (Schroeder HW et al., 2010).

Caracterizados como proteínas heterodiméricas, os anticorpos são estruturalmente compostos por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves (L; ~25 kDa) e duas cadeias pesadas (H; ~50 kDa), conectadas entre si através de diversas pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína conservados. As cadeias leves contêm apenas um único domínio constante, enquanto que as cadeias pesadas são compostas por três desses domínios, conforme se verifica na **Fig. 2** (Schroeder HW et al., 2010).

Cada uma das cadeias pode ser separada funcionalmente em domínio H2N-terminal variável, que se liga ao antígeno, e domínio HOOC-terminal constante, que especifica suas funções efectoras, como ativação do complemento ou ligação a receptores Fc. Assim, as imunoglobulinas são funcionalmente compostas por duas regiões, as quais podem ser separadas em fragmentos distintos resultantes da digestão por papaína. Quando incubados com essa enzima, os anticorpos são separados em três fragmentos: dois Fab (~ 25 kDa), de sequência variável, que contém o domínio H2N-terminal que se liga ao antígeno, e um fragmento Fc (fragmento cristalizável; ~50 kDa), composto pelo domínio constante HOOC-terminal (**Fig. 3**) (Schroeder HW et al., 2010).

Figura 3. Estrutura molecular de anticorpo. Seu formato em Y composto de duas cadeias polipeptídicas pesadas (H) e duas cadeias leves (L), as quais são covalentemente ligadas por pontes dissulfeto. A cadeia leve do anticorpo tem dois domínios, identificados como VL e CL. Cadeia pesada composta por três domínios constantes (CH1, CH2, CH3) e um domínio variável (VH). Adaptado de Schroeder HW et al., 2010.

Diferenças no domínio constante dos anticorpos permitem agrupá-los em cinco diferentes classes, com diferenças estruturais e em sua função na resposta imune: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Destas, IgG é a mais encontrada na circulação sanguínea, sendo extensivamente estudada e utilizada em imunoterapias (Weiner LM et al., 2010). Ainda, com base nas diferenças estruturais, antigênicas e funcionais da região constante da cadeia pesada, particularmente CH1 e CH3, IgGs humanas são sub-classificadas em quatro classes: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, distintas em sua flexibilidade e afinidade funcional (Schroeder HW et al., 2010).

O fragmento Fc liga-se a receptores de imunoglobulinas (FcR), de modo a estabelecer uma interação entre o compartimento imune humoral e o compartimento celular. Em humanos, são identificadas três classes de FcRs para IgGs: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), as quais diferem não apenas estruturalmente como também quanto à afinidade para IgG: FcγRI possui afinidade de ligação superior a de FcγRII e FcγRIII. No sistema murino, FcRs são classificados em quatro membros: mFcγRI, mFcγRIIB, mFcγRIII, mFcγRIV. A maioria dos FcγRs, quando ligados a IgGs, deflagram sinalização celular via sequência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina (ITAM; do inglês *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). A exceção é FcγRIIb, que contém uma sequência de inibição de imuno-receptor baseada em tirosina (ITIM; do inglês *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), cuja ativação por IgGs regula negativamente a atividade de receptores contendo ITAM. FcRs de ativação e inibição atuam em um balanço orquestrado, de modo que a razão regula a resposta celular imunológica resultante (Schroeder HW et al., 2010; Vonderheide RH et al., 2013).

FcγR também podem ser classificados quanto à sua afinidade por IgG: receptores de alta afinidade, com um K_a maior que 10^7 M^{-1} , ou de baixa afinidade ($K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$) (Bruhns P, 2012). Esses receptores são expressos em grande variedade de células de origem hematopoiética, bem como em células endoteliais e tumorais (Schroeder HW et al., 2010) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Padrão de expressão de FcγR e afinidade (K_A) para subclasses de IgG murino e humano.

Camundongo					
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Expressão
FcγRI _{ITAM}	NL	+++	++	+	Mono/MØ, DC*
FcγRIIb _{ITIM}	++	+	++	NL	B, Mono/MØ, neutr, DC, baso, MC, eos
FcγRIII _{ITAM}	++	++	+	NL	NK, NKT, Mono/MØ, neutr, DC, baso, MC, eos
FcγRIV _{ITAM}	NL	+++	+++	NL	Mono/MØ, neutr
Humano					
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Expressão
FcγRI _{ITAM}	+++	NL	+++	+++	Mono/MØ, neutr, DC, MC
FcγRIIA _{ITAM}	++	+	+	+	Mono/MØ, neutr, DC, baso, MC, eos, plaquetas
FcγRIIb _{ITIM}	+	+	+	+	B, Mono/MØ, neutr, DC, baso
FcγRIIC _{ITAM}	+	+	+	+	NK, Mono/MØ, neutr
FcγRIIIA _{ITAM}	++	+	++	+	NK, Mono/MØ

Afinidade (K_A) de ligação FcγR:IgG apresentada como: +, baixa ($<10^6 \text{ M}^{-1}$); ++, moderada ($>10^6 \text{ M}^{-1}$); ou +++, forte ($<10^7 \text{ M}^{-1}$). Legenda: _{ITAM}, contém sequência citoplasmática de ativação ITAM; _{ITIM}, contém sequência citoplasmática de inibição ITIM; *células dendríticas derivadas de monócitos; NL, não há ligação; mono/MØ, monócitos/macrófagos; MC, mastócitos; neutr, neutrófilos; baso, basófilos; eos, eosinófilos. Adaptado de Bruhns P, 2012 e Vonderheide RH et al., 2013.

1.5. Imunoterapia com anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais é uma classe emergente de agentes terapêuticos em desenvolvimento. Só em 2010, o mercado global de mAbs foi de US\$ 48 bilhões, o que representa aproximadamente 5% do mercado farmacêutico, estimado em US\$ 850 bilhões (Fekete S et al., 2013)

O desenvolvimento de mAbs dirigidos a ligantes e receptores celulares tem resultado em avanços na terapia do câncer, com benefícios clínicos significativos em

diversos tipos de tumores, incluindo melanoma, para o qual é demonstrado uma importante correlação entre o desenvolvimento de resposta antitumoral promovida por anticorpos terapêuticos IgG e a sobrevida de pacientes com melanoma (Cassard L et al., 2006). Dentre as vantagens dos anticorpos monoclonais, estão uma boa tolerância imunológica e alta especificidade pelo alvo.

Interessante, do total de candidatos anticâncer com alvo conhecido, 33% são específicos para apenas 5 alvos: IGF1R, RAILR2, EGFR, CTLA4 e fibronectina. Destes, EGFR sozinho está entre os dez alvos antigênicos mais frequentes para todos os anticorpos monoclonais antineoplásicos em estudos clínicos entre 1980 e 2005, sugerindo que o desenvolvimento de anticorpos monoclonais pode ser focado em novas estratégias terapêuticas (Nelson AL et al., 2010). **Tabela 3** aponta para alguns anticorpos monoclonais atualmente aprovados pelo FDA para uso no tratamento de neoplasias (Scott AM et al., 2012).

De modo geral, anticorpos terapêuticos podem atuar (a) de forma direta, através reconhecimento e bloqueio de fatores de crescimento extracelulares, citocinas ou receptores de vias de sinalização envolvidos da progressão do tumor; como também (b) de forma indireta, por meio de sua ligação a antígenos de superfície celular e a depleção destas via deflagração de resposta mediada pela porção Fc. Esses efeitos indiretos incluem citotoxicidade dependente de complemento (CDC; do *inglês complement-dependent cytotoxicity*) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC; do *inglês antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Esse é o caso do rituximabe (Rituxan/Mabthera; Genentech/Roche/Biogen Idec), um anticorpo específico para CD20, cuja eficácia depende de ADCC (Strome SE et al., 2007).

Tabela 3. Alguns anticorpos monoclonais atualmente aprovados pelo FDA para uso em oncologia.

Nome	Alvo	Formato do anticorpo	Indicação de tratamento
Rituximabe (Rituxan/Mabthera; Genentech/Roche/Biogen Idec)	CD20	IgG1 quimérico	Linfoma Non-Hodgkin
Trastuzumabe (Herceptin; Genentech/Roche)	HER2	IgG1 humanizado	Câncer de mama
Alemtuzumabe (Campath/MabCampath; Genzyme/Bayer)	CD52	IgG1 humanizado	Leucemia linfocítica crônica
Cetuximabe (Erbix; ImClone Systems/Bristol-Myers Squibb)	EGFR	IgG1 quimérico	Câncer colorretal
Bevacizumabe (Avastin; Genentech)	VEGF	IgG1 humanizado	Câncer colorretal, mama e pulmão
Panitumumabe (Vectibix; Amgen)	EGFR	IgG2 humano	Câncer colorretal
Ipilimumab (Yervoy®)	CTLA-4	IgG1 humanizado	Melanoma metastático
Ofatumumabe (Arzerra; Genmab/GlaxoSmithKline)	CD20	IgG1 humano	Leucemia linfocítica crônica

Legenda: CTLA4, citotoxicidade por antígeno 4 associado a linfócitos T; EGFR, receptor do fator de crescimento epidermal; FDA, Food and Drug Administration; IgG, imunoglobulina G; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial. Tabela adaptada de Scott AM et al., 2012.

1.6. Anticorpos monoclonais com alvo na angiogênese tumoral

Estratégias que tem com alvo eventos do microambiente tumoral cruciais para a progressão do tumor tem se mostrado benéficas terapeuticamente, tanto em abordagens pré-clínicas como clínicas. Anticorpos com alvo em processos como angiogênese tem se colocado como uma ferramenta promissora no tratamento oncológico. Um exemplo é o bevacizumabe (rhuMAb-VEGF, Avastin®, Genentech, EUA), um anticorpo monoclonal (mAb) humanizado recombinante que se liga e neutraliza a atividade biológica de VEGF-A. Desenvolvido a partir do mAb anti-VEGF murino A4.6.1, o

bevacizumabe foi humanizado através de técnicas avançadas de engenharia genética, de modo que o anticorpo resultante conserve a especificidade da molécula original. A meia vida plasmática dessa proteína é de 17-21 dias (Rosen LS, 2002).

Numerosos ensaios clínicos demonstram que seu uso intravenoso potencializa o efeito antineoplásico de esquemas terapêuticos convencionais. Tal droga apresenta uma atividade antitumoral sinérgica com quimioterápicos citotóxicos tanto em modelo animal como em ensaios clínicos, tendo sido aprovada em 2004 pelo FDA como tratamento de primeira linha, em combinação com 5-fluorouracil (5-FU), irinotecano e leucovorina, destinado a pacientes com câncer de cólon metastático (Hurwitz H et al., 2004; Gerber HP et al., 2005).

Em estudo fase III delineado por Hurwitz e colaboradores, a adição de bevacizumabe à combinação citotóxica irinotecano/5-fluorouracila administrado em bolus/leucovorina em portadores de CRC metastático não tratado previamente resultou em aumento estatisticamente significativo da taxa de resposta à quimioterapia (44,8% versus 34,8%; $P=0,004$), da sobrevida média livre de progressão (10,6 versus 6,2 meses; $P<0,001$) e da sobrevida global média (20,3 versus 15,6 meses; $P<0,001$) (Hurwitz H et al., 2004).

Resultados promissores também têm sido obtidos em carcinoma renal (RCC) metastático, para o qual a combinação de bevacizumabe a interferon alfa aumenta em cinco meses a sobrevida média livre de progressão. Além de CRC e RCC metastáticos, o bevacizumabe está regulamentado pelo FDA para uso em casos de câncer de mama, de pulmão e em glioblastoma. Em decorrência desses resultados positivos com o uso desse anticorpo monoclonal antiangiogênico, atualmente mais de 400 ensaios clínicos envolvendo essa droga estão em andamento (Clinical Trials.gov web-site).

Além do bevacizumabe, drogas que utilizam anticorpos monoclonais (mAbs) como forma de atingir seu alvo terapêutico tem emergido como uma das maiores classes de novos agentes aprovados para tratamento de câncer na última década. Ao menos sete mAbs (**Tabela 3**) receberam aprovação do FDA para uso clínico no tratamento de tumores sólidos e hematológicos (Zhang Q et al., 2007a), com mais de 25% do total de agentes farmacológicos em desenvolvimento sendo baseados em anticorpos e dezenas de outros anticorpos monoclonais sendo testados em ensaios pré-clínicos e clínicos (Carter P et al., 2001; Reff ME et al., 2002).

O número médio de novos anticorpos monoclonais a entrarem em estudos clínicos por ano para tratamento de câncer cresceu de aproximadamente 10, no início dos anos 2000, para mais de 30 em 2011, o que indica que esse número tende a aumentar cada vez mais. Dentre suas vantagens frente à quimioterapia convencional está longa meia vida, baixa toxicidade e alta afinidade e especificidade desses anticorpos (Hicklin DJ et al., 2001).

1.7. Imagem molecular por tomografia computadorizada por emissão de fóton único

O termo imagem molecular refere-se ao uso de métodos de imagem não invasivos para monitorar *in vivo* sinais originários de moléculas, frequentemente na forma de um radiotraçador injetado, e a sua interação com alvos celulares específicos (Meikle SR et al., 2005).

Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ocupa um importante nicho no campo de imagem molecular, em virtude de sua excelente sensibilidade em detectar fótons gama e de sua alta resolução (Khalil MM et al., 2013).

Imagens SPECT são adquiridas através da detecção de raios gama provenientes do decaimento do radiotraçador injetado. Os detectores de cintilação são opticamente acoplados a tubo fotomultiplicador, que converte os raios eletromagnéticos em sinais elétricos. Os dados gerados são reconstruídos por métodos de retroprojeção filtrada ou métodos de reconstrução iterativa, como o algoritmo de subconjuntos ordenados e máxima expectativa (OSEM; do inglês *ordered subset expectation maximization*) (Hudson HM et al., 1994).

A introdução de plataformas híbridas, combinando câmera SPECT e scanner CT em um único equipamento “revolucionou o campo de medicina nuclear convencional” (Bockisch A, et al., 2009). A fusão de imagens SPECT com o referencial anatômico do mesmo animal, obtido por tomografia computadorizada de raios X (CT; do inglês *computed tomography*) ou MRI (imagem de ressonância magnética; do inglês *magnetic resonance imaging*), permite avaliar a captação da molécula marcada em uma determinada região de interesse. Isso é particularmente importante quando essa molécula é um anticorpo ou peptídeo com alvo em um antígeno específico, expresso diferencialmente em determinados tecidos (por exemplo, tumor) (Khalil MM et al., 2013).

É interessante observar que essas estratégias de imagem molecular são passíveis de aplicação tanto em modelos experimentais, através do uso de plataformas para pequenos animais, como também em humanos, o que as tornam ferramentas atrativas na tradução do conhecimento básico e pré-clínico à efetiva aplicação em pacientes.

Resolução espacial e sensibilidade de detecção são duas características importantes que tem importante papel no campo de imagem molecular usando traçadores SPECT e PET. Apesar de gama câmaras em uso clínico fornecerem resolução tomográfica de aproximadamente 10 mm, alguns equipamentos SPECT pré-

clínicos podem fornecer resolução espacial submilimétrica, através do uso de geometria de multi-pinhole dedicado (Khalil MM et al., 2013). **Fig. 4** define a posição do microSPECT na matriz de imagem molecular.

FIGURA 4. Resolução espacial de equipamentos SPECT e PET de uso pré-clínico e clínico. Adaptado de Khalil MM et al., 2013.

1.8. Radionuclídeos SPECT e tecnécio-99m

Radionuclídeos são núcleos atômicos instáveis que se estabilizam através de seu decaimento radioativo. Dos mais de 3000 radionuclídeos existentes, apenas cerca de 30 são rotineiramente usados em atividades de medicina nuclear, sendo a maioria artificial, gerada a partir de irradiação em reatores nucleares, ciclotrons ou em aceleradores de larga escala (Hamoudeh M et al., 2008). **Tabela 4** apresenta isótopos comumente empregados em imagens SPECT, emissores de raios gama.

Tabela 4. Radionuclídeos utilizados para imagem molecular por SPECT.

Radionuclídeo	Tipo de emissão	Meia-vida	$E_{\max}$ (keV)	Produção
^{131}I	γ (81.2%), β^-	8 dias	(γ): 284, 364, 637	^{131}Te (β) ^{131}I
^{67}Ga	γ	78,3 h	93, 184, 300, 393	^{68}Zn (n,p) ^{67}Ga
^{111}In	γ	67,2 h	171, 245	^{111}Cd (p,n) ^{111}In
^{123}I	γ	13,2 h	159	^{121}Sn (α ,2n) ^{123}I
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	γ	6,0 h	140	gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

Adaptado de Hamoudeh M et al., 2008.

Destes, tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) é o carro-chefe dos serviços de medicina nuclear. Aproximadamente 80% de todas as aplicações de imagem nuclear rotineiras são baseadas em $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o que traduz em uma estimativa de 50 milhões de doses de radiofármacos para diagnóstico anualmente no mundo todo (Liu S, 2008).

O elevado número de compostos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -marcados é resultado de suas propriedades nucleares, da fácil disponibilidade por um baixo custo e do baixo índice de reações adversas desses agentes, contribuindo para a sua ampla utilização (Marques et al, 2001; Liu S, 2008).

Tecnécio é o elemento de menor número atômico ($Z=43$) para o qual não existe isótopo estável. Seu nome deriva da palavra grega technetos (τεχνητος), que significa artificial. Descoberto na década de 1940 por Perrier e Segrè, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é produto do decaimento de ^{99}Mo (molibdênio-99), um isótopo de meia-vida ($T_{1/2}$) de 66 h. **Fig. 5** apresenta esquema simplificado da sequência de decaimento de ^{99}Mo (Zolle I, 2007).

O elemento radiometálico $^{99\text{m}}\text{Tc}$ possui meia-vida ($T_{1/2}$) de aproximadamente 6 h. Decai 100% por transição isomérica para ^{99}Tc ($T_{1/2} = 2,5 \times 10^5$ anos) através da

emissão de fóton monocromático de ~140 keV, energia adequada para aquisição de imagens cintilográficas (Zolle I, 2007).

Figura 5. Esquema simplificado do decaimento de ^{99}Mo a $^{99\text{m}}\text{Tc}$. ^{99}Mo decai (88%; emissão β^-) para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($T_{1/2}=66 \text{ h}$), o qual desintegra-se através da emissão de fótons gama (140 keV) para ^{99}Tc . Cerca de 12% de ^{99}Mo decai diretamente para a espécie de longa meia vida ^{99}Tc . Adaptado de Marques et al., 2001.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ é facilmente obtido a partir da eluição de geradores comerciais molibdênio-tecnécio ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$; **Fig. 6**). Esses sistemas geradores foram primeiramente desenvolvidos por Walter Tucker e Margaret Greene, no final da década de 1950, durante estudos para aperfeiçoar geradores $^{132}\text{Te}/^{132}\text{I}$. São compostos por uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio (Al_2O_3), onde é depositado o molibdato () que, via decaimento β^- , forma o $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Estas duas espécies apresentam diferentes afinidades pelo Al_2O_3 (**Fig. 6**), possibilitando que o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ seja coletado, na

forma de ânion tetraoxitecnetato hidratado (pertechnetato; TcO_4^-), por eluição seletiva com solução salina isotônica (0,9% NaCl) estéril (Zolle I, 2007).

Figura 6. Obtenção de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a partir de geradores $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. (A) Esquema de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. ^{99}Mo é adsorvido, na forma de MoO_4^{2-} , em coluna de alumina (Al_2O_3). A coleta de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é realizada em frasco a vácuo, após eluição do gerador. Sistema blindado com chumbo, para efeitos de proteção radiológica. Adaptado de Saha GB, 2010. (B) Ordem de afinidade de ligação de ânions por Al_2O_3 . Ânion pertechnetato pode ser substituído da coluna de alumina por ânion nitrato ou cloreto. Solução 0,9% NaCl é utilizada para eluição seletiva de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Zolle I, 2007).

Fig. 7 apresenta uma típica curva da atividade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ após eluição do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, em relação ao decaimento de ^{99}Mo . É possível observar que a atividade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aumenta até alcançar um estado de equilíbrio transiente com ^{99}Mo , a partir do

qual ambos os radionuclídeos decaem com uma única meia-vida aparente. Ou seja, quando em equilíbrio, a razão entre a atividade de ^{99}Mo e a de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ permanece constante ao longo do tempo. Além disso, nota-se também que a radioatividade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ alcança o valor máximo em aproximadamente quatro meia-vidas (~ 23 h) após a última eluição, o que torna viável a eluição diária do gerador (Zolle I, 2007).

Figura 7. Curva atividade-tempo para gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Aproximadamente metade do rendimento máximo do gerador estará disponível 6 h após a última eluição. Adaptado de Green CH, 2012.

Eluição completa e regular de geradores $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ é particularmente importante para se obter eluatos com alta atividade específica, ou seja, alta quantidade da espécie emissora de raios gama $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por unidade de massa do radionuclídeo ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ ^{99}Tc) (Liu S, 2008). Isso porque o átomo de longa meia-vida ^{99}Tc , caracterizado como impureza isotópica, acumula-se em função do tempo, como produto do decaimento de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, bem como do decaimento direto de ^{99}Mo (Fig. 3).

A fração molar (F) de ^{99m}Tc no eluato pode ser estimada através da equação

$$F = \frac{0,88\lambda_1(\exp(-\lambda_1 t) - \exp(-\lambda_2 t))}{(\lambda_2 - \lambda_1)(1 - \exp(-\lambda_1 t))}$$

(Equação 1; Saha GB, 2010)

onde t é o tempo (em horas) pós-eluição anterior do gerador, λ_1 e λ_2 são as constantes de decaimento de ^{99}Mo e ^{99m}Tc , respectivamente, e o fator 0,88 indica que 88% de ^{99}Mo decai para ^{99m}Tc . Equação plotada em gráfico apresentado na **Fig. 8**. Considerando $\lambda_1 = 0,0105 \text{ h}^{-1}$ e $\lambda_2 = 0,1155 \text{ h}^{-1}$ (Saha GB, 2010), obtemos que, em 24 h pós-eluição, apenas 27,9% dos átomos de Tc são ^{99m}Tc , permanecendo o remanescente (72,1%) na forma ^{99}Tc . Em 48 h, o percentual ocupado pela espécie não emissora de radiação gama é ainda maior, resultado do fator tempo pós-eluição anterior do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (intervalo entre eluições) na atividade específica de tecnécio (Marques et al., 2001; Green CH, 2012).

Figura 8. Fração do eluato de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ocupada por ^{99m}Tc em função do tempo. Curva construída a partir da **Equação 1**, considerando $\lambda_1 = 0,0105 \text{ h}^{-1}$ e $\lambda_2 = 0,1155 \text{ h}^{-1}$ (Saha GB, 2010). O decaimento exponencial de ^{99m}Tc no eluato em função do tempo sinaliza a importância de realizar eluições periódicas do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.

1.9. Radiomarcacão de anticorpos monoclonais

Anticorpos podem ser marcados com ^{99m}Tc tanto de forma direta, através de sua coordenaçao com grupos sulfidril (SH) formados pela reduçao de pontes dissulfeto, bem como por método indireto, pelo uso de agentes quelantes bifuncionais. Estratégias de radiomarcacão indireta é comumente a opção de escolha, devido à maior estabilidade e alta radioatividade específica, sem perda considerável de reatividade (Meares CF et al., 1984; Hnatowich DJ et al., 1993).

Agentes quelantes bifuncionais são compostos formados por um grupo quelante de metal e por um segundo grupo funcional, quimicamente reativo, capaz de formar ligações covalentes com outras moléculas (Meares CF et al., 1984). Uma grande variedade de quelantes bifuncionais pode ser utilizada para radiomarcar anticorpos, o que inclui o grupamento hidrazinonicotinamida (HYNIC), um análogo do ácido nicotínico capaz de se ligar a grupos amina da cadeia lateral de aminoácidos (Abrams MJ et al., 1990).

HYNIC é caracterizado pela sua alta eficiência de marcação (Rennen HJ et al., 2000; Liu S, 2008), bem como sua característica monodentada que favorece a utilização de vários coligantes (Storch D et al., 2005). Outro aspecto favorável a sua utilização é a frequente alta estabilidade de proteínas HYNIC-modificadas, podendo ser armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por ao menos um ano, bem como mantidas liofilizadas, sem perda dos resíduos de hidrazino (Schwartz DA et al., 1991).

Marcação de anticorpos tem sido acompanhada por diversos radionuclídeos, dentre os quais destaca-se ^{111}In , ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{125}I , comumente usados em medicina nuclear. Destes, alguns já tem sido utilizados para propósitos de imagem na clínica, ou ao menos fornecido comercialmente. ^{111}In -capromabe pendetide, ^{111}In -satumomabe

pendetide, ^{111}In -Imciromabe pentetate, e ^{111}In -ibritumomabe tiuxetan. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -arcitumomabe, em conjunto com tomografia computadorizada, é indicado para detectar, localizar e determinar a extensão de recorrência de carcinoma colorretal metastático (Khalil MM et al., 2013).

^{111}In -capromab pendetide (ProstaScint®, EUA) é um anticorpo monoclonal (IgG1) murino ^{111}In -marcado com alvo no antígeno de membrana específico de próstata (PSA), aprovado pelo FDA em 1996 como agente de imagem capaz de detectar focos metastáticos bem como predizer recidiva da doença pós-prostatectomia radical. É indicado para localizar focos metastáticos em pacientes portadores de câncer de próstata de alto risco com altos níveis séricos de PSA, uma vez que CT e MRI tem baixa sensibilidade nessa determinação (Sodee DB et al., 1998; Kimura M et al., 2009).

1.10. Anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7

No presente trabalho, propomos a aplicação de um anticorpo monoclonal como ferramenta para reconhecer FGF2 e interferir na sinalização induzida por esse fator de crescimento (**Fig. 9**).

O anticorpo monoclonal anti-FGF2 aqui utilizado, de isotipo IgG1, é produto de células de hibridoma murino 3F12E7. Essas células foram obtidas a partir da imunização gênica de camundongos BALB/c com vetor uP-hFGF2 (Parise CB et al, 2008; **Fig. 10**), utilizando-se da técnica de produção de hibridomas descrita por Köhler e Milstein (Köhler G et al., 1975). O vetor uP-hFGF2 foi desenhado a partir da inserção de sequência de cDNA de FGF2 humano (hFGF2; Oliveira MLS et al., 2001) entre os sítios EcoRI e EcoRV de vetor de expressão uP, uma variante do vetor pVAX1

(Invitrogen, EUA) contendo o íntron 1 do citomegalovírus (CMV) entre o promotor CMV e o sítio de policlonagem (Sacramento CB et al., 2010). A sequência de aminoácidos codificada pelo cDNA hFGF2 possui 98% de homologia com FGF2 murino (**Fig. 10**), o que indica que o anticorpo monoclonal 3F12E7 reconhece não apenas a forma humana como também a murina desse fator de crescimento. Assim, abre-se espaço para o uso do anticorpo 3F12E7 em estratégias com vistas ao potencial terapêutico e ao seu uso como agente traçador diagnóstico em modelos experimentais em camundongos.

Figura 9. Modelo farmacodinâmico proposto para o anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7. Uso de mAb anti-FGF2 3F12E7 como estratégia para interferir na via de sinalização induzida por FGF2, com base em modelo proposto por Marathe e colaboradores (Marathe et al., 2008). 3F12E7 IgG potencialmente liga-se à FGF2 de modo a impedir a interação desse fator de crescimento com o seu respectivo receptor endógeno (FGFR) e, assim, antagonizar a ação de FGF2, o que inclui angiogênese. FGF2 é expresso não apenas por células neoplásicas, mas também por demais células do microambiente tumoral, tais como fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias.

Figura 10. Vetor de expressão uP-hFGF2 utilizado para imunização de camundongos para produção de células de hibridoma secretoras de anti-FGF2 3F12E7 IgG. (A) Representação esquemática do vetor uP-hFGF2. (B) Sequência do cDNA de hFGF2 utilizado na construção de uP-hFGF2, obtido por Oliveira MLS e colaboradores (Oliveira MLS et al., 2001) através de mutação sítio-dirigida do cDNA de FGF2 bovino, com o propósito de produzir FGF2 humano. FGF2 recombinante codificado pelo cDNA hFGF2 (C; SDS-PAGE corado com Coomassie blue mostra proteína purificada) é reconhecido especificamente por anticorpos policlonais anti-FGF2 (D) (Oliveira MSL et al., 2001). (E) A sequência de aminoácidos codificada pelo cDNA hFGF2 possui alto grau de homologia (98% de identidade) com equivalente FGF2 murino (Genebank no. AAK52310.1), conforme determinado por alinhamento BLAST (Altschul SF et al., 1997; NCBI BLAST *web-site*) com o proteoma murino. Legenda: pUC ori, origem de replicação; P_{cmv}, promotor de citomegalovírus humano; BGHpA, sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino; canamicina, gene de resistência à canamicina; hFGF2, fator 2 de crescimento de fibroblasto humano; mFGF2, fator 2 de crescimento de fibroblasto murino; BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*.

Página intencionalmente em branco.

2. OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo averiguar a aplicação diagnóstica e terapêutica do anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7 em melanoma experimental B16-F10.

Objetivos específicos

- Avaliar o potencial terapêutico do anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7 em melanoma murino B16-F10, com base nos parâmetros: (1) cinética de crescimento de tumores subcutâneos, (2) contagem do número de focos metastáticos pulmonares em modelo de metástase experimental e (3) densidade microvascular;
- Marcar o anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7 com tecnécio-99m e avaliar, por métodos de medicina nuclear, sua captação em modelo experimental de melanoma B16-F10.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em sua maior parte no Laboratório de Radiofarmácia do Centro de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo e nos laboratórios do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Os ensaios envolvendo animais de experimentação foram realizados em concordância com o guia da *National Research Council* sobre cuidados de animais de laboratório (National Research Council, 2011), após aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (protocolo número 0942/09; carta de aprovação em **ANEXO I**).

3.1. Cultura celular

Neste trabalho utilizamos células de hibridoma 3F12E7, secretoras de anti-FGF2 IgG1, e 1F5H2, secretoras de anticorpo ligante do antígeno carcinoembrionário (CEA) humano (Moraes JZ et al., 1994), IgG1, usado como controle de isotipo nos ensaios com 3F12E7. Essas células foram cultivadas *in vitro* em meio de cultura RPMI-1640 (Vitrocell Comércio de produtos para laboratórios Ltda., Brasil), pH 7,2, suplementado com 21 mM de N-2-hidroxietilpiperazina-N'2-ácido etano-sulfônico (HEPES; Sigma-

Aldrich, EUA), 24 mM de NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, EUA), 50 μM de 2-mercaptoetanol (LGC Biotecnologia, Brasil), 2 mM de L-Glutamina (Gibco®, Life Technologies, EUA) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco®, Life Technologies, EUA), em atmosfera úmida a 37 °C com 5% (v/v) CO_2 . Os hibridomas foram cultivados sobre camada de sustentação composta por macrófagos peritoneais de camundongo.

Para estudos experimentais *in vivo*, foram utilizadas células de melanoma murino B16-F10 (ATCC®, EUA), singenêicas a camundongos C57Bl/6 (Fidler II, 1975). Tais células foram mantidas com as mesmas condições e meio de cultura supracitados, exceto pela ausência de 2-mercaptoetanol e de camada de sustentação com macrófagos.

Ao atingirem 90% de confluência, as células foram lavadas com solução salina fosfato-tamponada [PBS; 137 mM NaCl (LGC Biotecnologia, Brasil), 2,7 mM KCl (Merck, Alemanha), 10 mM Na_2HPO_4 (Merck, Alemanha), 1,5 mM KH_2PO_4 (Mallinckrodt®, EUA), pH 7,2] acrescida de 5 mM de EDTA (USB Corporation, EUA), destacadas dos frascos com solução 0,25% tripsina-EDTA (Gibco®, Life Technologies, EUA) e centrifugadas a 300 xg por 2 minutos, a 25 °C. O sedimento foi ressuspensionado em meio de cultura e as células transferidas para novos frascos na proporção de 1:5 ou conforme conveniência.

Alíquotas dessas células foram congeladas em SFB contendo 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO; Hybri-Max®, Sigma-Aldrich, Inglaterra) e estocadas em nitrogênio líquido. Testes periódicos foram realizados para se certificar da ausência de contaminação por micoplasma.

3.2. Purificação de anticorpos monoclonais secretados por células de hibridoma

Para obtenção de anti-FGF2 IgG1 e ligante de CEA IgG1 purificados, células de hibridoma 3F12E7 e 1F5H2 foram injetadas intraperitonealmente (ip) em animais BALB/c pré-tratados com 500 μ L (ip) de pristane (2,6,10,14-tetrametil-pentadecano; Sigma-Aldrich, EUA). Dez dias após injeção das células, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o fluido ascítico coletado por punção abdominal (Yokoyama WM et al., 2001; Leenaars M et al., 2005). Esses procedimentos foram realizados em concordância com recomendações do *National Research Council* para produção de anticorpos (National Research Council, 1999).

Os anticorpos foram purificados a partir da ascite através de cromatografia de afinidade em coluna de proteína G-Sepharose (Sigma-Aldrich, EUA) equilibrada com tampão de ligação Na₂HPO₄ 0,02 M pH 7,0, conforme proposto por Cooper e colaboradores (Cooper HM et al., 2001). A eluição dos anticorpos foi realizada com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7.

Os anticorpos foram eluídos da coluna com tampão 0,1 M glicina-HCl, pH 2,7 e coletados em frações de 1,0 mL, no interior de tubos de microcentrifugação de 1,5 mL (Sarstedt, EUA). Essas frações de anticorpos foram neutralizadas com tampão Tris-HCl 1 M, pH 9,0 e tiveram seu conteúdo proteico monitorado por absorbância em 280 nm (Nanodrop®; Thermo Scientific, EUA).

Na sequência, a solução contendo anticorpo foi dessalinizada em coluna Sephadex® G-25 (PD-10; GE Healthcare, EUA), utilizando PBS pH 7,4 como fase móvel. O eluato resultante foi concentrado em unidades filtrantes de microcentrifugação Amicon Ultra 10K (Millipore, EUA), até alcançar a concentração de 10 mg/mL. A

concentração de anticorpo foi determinada por meio do método espectrofotométrico de Bradford (Bio-rad, EUA). O processo de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e os anticorpos foram testados quanto à sua atividade e especificidade por métodos de ELISA direto e de *western blot*.

O monitoramento eletroforético ocorreria em géis de poliacrilamida 12% (m/v), tanto em condições redutoras (presença de DTT no tampão de amostra), como não redutoras. Para isso, foram utilizados 5 µg do anticorpo purificado dispersos em tampão de amostra Laemmli 6x (v/v), de modo a ficar 1x (v/v) concentrado [1x: 62,5 mM Tris pH 6,8, 25% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS, 0,01% (m/v) azul de bromofenol]. Após corrida eletroforética a 100 V, o gel foi corado com Coomassie Blue [0,05% (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético] para visualização das bandas proteicas.

3.3. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 selvagens, machos, de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo/DTAEP da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os animais foram acondicionados em gaiolas ventiladas (Alesco, Campinas, Brasil) mantidas em sala de acesso restrito em biotério multidisciplinar da FMUSP, sob temperatura controlada entre 20-25 °C e ciclo claro/escuro de 12/12 h, com base nas normas para utilização de animais dessa instituição. Foram utilizadas água e rações

estéreis fornecidas *ad libitum*. Os camundongos foram identificados através de furos na orelha.

Ao término dos experimentos, os camundongos foram sacrificados por inalação de CO₂ (Câmara de sacrifício BIOCAM-002; Biotécnicas Comércio e Indústria Ltda., Brasil), de acordo com painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association, 2001).

3.4. Modelos experimentais de melanoma *in vivo*

(A) Tumor subcutâneo

500 mil células de melanoma murino B16-F10 suspensas em 100 µL de meio RPMI-1640 desprovido de SFB foram injetadas subcutaneamente (sc) no quadrante abdominal inferior esquerdo de camundongos C57Bl/6, em cabine de fluxo laminar horizontal. O crescimento tumoral foi acompanhado através de aferições diárias de seu volume com auxílio de paquímetro digital (LEE Tools, Brasil), adotando-se precisão de duas casas decimais. Considerando que o volume do tumor seja semelhante ao de um elipsóide, seu valor foi calculado por meio da equação abaixo (Otake AH et al., 2010):

(Equação 1)

No 11º dia pós-implante de B16-F10 (quando a média do diâmetro maior dos tumores do grupo controle excedeu 1 cm), os animais foram sacrificados. Os tumores foram removidos cirurgicamente e fixados em solução formaldeído 4% (m/v) (Merck, Alemanha) para posterior análise histológica.

Alternativamente, os tumores foram embebidos em meio de congelamento OCT (TissueTek®; Sakura Finetek, Japão) e congelados em nitrogênio líquido. Secções de 7 µm de espessura foram confeccionadas em criostato e direcionadas para reações de imunofluorescência.

(B) Metástase induzida

Um total de 500 mil células B16-F10 suspensas em 100 µL de meio RPMI-1640 desprovido de SFB foi injetado intravenosamente (i.v.) na veia da cauda de animais C57Bl/6, conforme descrito previamente (Otake AH et al., 2010). O dia de inóculo foi definido como dia 0. No dia 14, os animais foram sacrificados e os pulmões removidos para contagem do número de nódulos de B16-F10 superficiais, com auxílio de lente de aumento. Os pulmões foram fixados em solução formaldeído 4% (m/v) (Merck, Alemanha) e direcionados para processamento histopatológico para posterior análise do parênquima pulmonar.

3.5. Regimes de tratamento com anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7

(A) Células de hibridoma gama-irradiadas.

10 milhões de células de hibridomas 3F12E7 ou 1F5H2 (controle de isotipo) gama-irradiadas, suspensas em 100 µL de meio RPMI-1640 desprovido de SFB, foram inoculadas i.p. nos camundongos a cada dois dias, na região do quadrante abdominal inferior direito. O tratamento teve início no 4º dia pós-implante subcutâneo de B16-F10 ou a partir do 1º dia pós-inóculo intravenoso dessas células tumorais, no caso dos experimentos de indução de metástase.

Amostras de sangue foram coletadas periodicamente com o propósito de acompanhar a liberação de anti-FGF2 3F12E7 IgG (ou de anticorpo controle de isotipo ligante de CEA) pelas células de hibridoma na circulação sanguínea.

As irradiações foram realizadas em equipamento Gammacell® Elan 3000 (Nordion International, Canadá), fonte de ^{137}Cs (3,5 Gy/min). Para isso, minutos antes do inóculo nos animais, as células de hibridoma foram suspensas em meio RPMI desprovido de SFB e irradiadas, no interior de tubos cônicos de centrifugação, com os fótons gama procedentes dessa fonte radioativa, em dose de 6 Gy.

Em todos os experimentos, os animais foram divididos em três grupos ($n \geq 5$ /grupo): (a) inóculo de meio RPMI-1640 (controle de veículo); (b) inóculo de hibridoma gama-irradiado secretor de mAb anti-FGF2 3F12E7; e (c) inóculo de hibridoma gama-irradiado secretor de mAb ligante de CEA 1F5H2 (controle de isotipo).

(B) Anticorpo monoclonal purificado

Anticorpos anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2 (controle de isotipo), foram injetados intravenosamente, via veia caudal, a cada dois dias. Utilizou-se concentração de 2 mg/kg/animal, diluído em PBS.

O tratamento teve início no 4º dia pós-implante subcutâneo de B16-F10 ou a partir do 1º dia pós-inóculo intravenoso dessas células tumorais, no caso dos experimentos de metástase induzida.

Total de três grupos de tratamento (n=5/grupo): (a) salina/PBS (100 µL); (b) anticorpo controle de isotipo 1F5H2 (2 mg/kg; 100 µL); e (c) anti-FGF2 3F12E7 IgG (2 mg/kg; 100 µL).

3.6. Coleta de sangue e obtenção de soro

Amostras de sangue foram obtidas por punção do plexo venoso retro-orbital com tubo capilar (Micron Glass, Brasil), mediante prévia anestesia dos animais com 100 mg/kg de cloridrato de quetamina (Vetanarcol®; König, Argentina) e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan; Vetbrands, Brasil) (Damy SB et al., 2010).

Para separação do soro, essas amostras de sangue foram incubadas a 37 °C por 1 h (início da retração do coágulo), após o que foram centrifugadas a 10000 xg por 10 minutos. O soro foi isolado do *pellet* de hemácias e armazenado a -20 °C para subsequente detecção dos níveis circulantes de mAb anti-FGF2 ou ligante de CEA.

3.7. Detecção dos anticorpos monoclonais

Dosagem de mAbs anti-FGF2 e ligante de CEA em amostras de soro, de sobrenadante de cultura celular ou de material eluído de tumores foi obtida por ensaio imunoenzimático indireto (ELISA; do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) em placas de poliestireno de 96 poços (Falcon®, Becton Dickinson, EUA) de alta capacidade de ligação a proteínas.

Os poços foram recobertos com 0,5 µg/mL de FGF2 (Sigma-Aldrich, EUA) ou CEA (Sigma-Aldrich, EUA), diluído em PBS, por 1 h a 37 °C. O bloqueio dos sítios ativos remanescentes no plástico foi feito com PBS contendo 1% (m/v) de albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich, EUA) (PBS/BSA 1%) por 1 h em temperatura ambiente. Na sequência, as amostras de interesse foram adicionadas aos poços e incubadas por 2 h a 37 °C. No caso de amostras de soro, realizou-se diluição de 1:200 em PBS/BSA 0,1% (m/v). Foram adotados como controle positivo poços incubados com anticorpo anti-FGF2 3F12E7 purificado (1 µg/mL diluído em PBS/BSA 1%). O controle negativo da reação recebeu apenas PBS/BSA 1% (ausência de incubação com anticorpo).

Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS contendo 0,05% (v/v) Tween-20 (PlusOne, Amersham Biosciences, EUA) (PBS/Tween 0,05%) e incubados com anticorpo policlonal anti-IgG murino conjugado à peroxidase (ab6789; Abcam, EUA) diluído 1:2000 em PBS/BSA 0,1%, por 1 h a 37°C. Nova lavagem com PBS/Tween 0,05% foi realizada ao término desse processo.

Os ensaios foram revelados com 3 mg/mL de substrato enzimático orto-fenilenodiamina (OPD; Sigma-Aldrich, EUA) dissolvidos em tampão citrato-fosfato

0,05 M (51,4 mM Na_2HPO_4 , 24,3 mM ácido acético, pH 5,0) contendo 0,03% (v/v) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; Fluka Chemical, EUA). Essa reação ocorrera por cinco minutos ao abrigo da luz e foi parada com ácido sulfúrico 2 M (Merck, Alemanha).

Os resultados foram aferidos por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 490 nm (Bio-rad model 550; Bio-rad, EUA). Uma curva padrão foi gerada para correlacionar as concentrações de anticorpo com a correspondente densidade óptica.

3.8. Eluição ácida de anticorpos em tumores

Tumores subcutâneos B16-F10 foram dissecados e lavados por três vezes em PBS pH 7,4. O tumor foi macerado, com auxílio de êmbolo de seringa, e incubado sob agitação com tampão 0,1 M citrato pH 2,7, por 1 h a 4 °C. Utilizou-se 1 mL de tampão por grama de tecido. Após, esse material foi centrifugado a 10000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi neutralizado para pH 7,4 e, na sequência, dialisado por 24 h contra PBS pH 7,4. O eluato resultante foi concentrado 10x em unidades filtrantes de microcentrifugação Amicon Ultra 100K (Millipore, EUA), contendo poros com *cutoff* de 100 kDa de peso molecular. A presença de mAbs anti-FGF2 e ligante de CEA nessas amostras de eluição foi avaliada por ELISA, conforme metodologia descrita no item

3.7.

3.9. Processamento histológico

Ao término dos experimentos *in vivo*, os animais tiveram os tumores (ou pulmões com nódulos tumorais, no caso dos experimentos de metástase induzida) extraídos cirurgicamente e fixados com solução formaldeído (Merck, Alemanha) 4% (v/v) em PBS pH 7,4 por 24 h.

Após, os espécimes foram lavados em tampão fosfato (PBS) e desidratados em gradientes alcoólicos 70%, 80%, 90% e 100% (v/v). Seguiram-se dois banhos de xilol, xilol/parafina 1:1 (v/v) e dois banhos em parafina líquida, sendo as amostras posteriormente incluídas em blocos de parafina (Histosec®, Merck, Alemanha).

Foram confeccionadas secções de 5 µm de espessura, empregando-se micrótomo Leica RM2125RT (Leica, Alemanha). Os cortes foram recolhidos diretamente sobre lâminas de 75 x 25 mm positivadas (StarFrost®, Knittel Glass, Alemanha) e direcionados para coloração de hematoxilina e eosina (HE) e/ou reações imuno-histoquímicas.

Alternativamente, os tecidos extraídos cirurgicamente foram embebidos em meio de congelamento OCT (TissueTek®; Sakura Finetek, Japão) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Secções de 5 µm de espessura foram confeccionadas em criostato Hyrax C25 (Zeiss, Alemanha), recolhidas em lâminas 75 x 25 mm positivadas (StarFrost®, Knittel Glass, Alemanha) e direcionadas para reações de imunofluorescência ou autorradiografia.

3.10. Coloração de cortes parafinados com hematoxilina e eosina (HE)

As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, EUA) e eosina (Sigma-Aldrich, EUA) para análise morfológica dos tecidos. Para isso, lâminas contendo secções parafinadas de tecido foram desparafinizadas em três banhos de xilol, hidratadas em álcool etílico (Merck, Alemanha) nas concentrações decrescentes de 100%, 90% e 70% (v/v) e lavadas em água corrente.

Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto seguido por coloração com eosina por 5 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, realizou-se a desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100% (v/v), diafanização em dois banhos de xilol e montagem das lâminas em resina Erv-mount (EasyPath®, Brasil). O material foi avaliado em microscopia de luz convencional.

3.11. Imuno-histoquímica para detecção de CD34

Os cortes parafinados foram imunomarcados com anticorpo anti-CD34 utilizando-se de processamento imunohistoquímico convencional (Novak EM et al., 2003). Para isso, as secções foram desparafinizadas em três banhos de xilol, hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 90% e 70% (v/v) e lavadas em água corrente. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por H_2O_2 a 10 volumes durante 15 minutos, seguidos de duas lavagens em PBS (pH 7,4). A recuperação antigênica foi realizada em forno de microondas (900 W). Aplicaram-se três ciclos de cinco minutos com intervalos de um minuto entre eles, com as lâminas

imersas em tampão citrato de sódio 10 mM (pH 6,0). Após atingirem a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas em PBS/BSA 1% por 20 minutos em câmara úmida, temperatura ambiente, para o bloqueio de sítios inespecíficos.

Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti-CD34 (feito em rato; código ab8158, Abcam, EUA), diluído 1:50 em PBS/BSA 1%, por 16 h a 4 °C em câmara úmida. Na sequência, após três banhos de cinco minutos com PBS, procedeu-se à incubação das secções com anticorpo secundário policlonal anti-IgG de rato conjugado à peroxidase (1:50 em PBS, código ab6517, Abcam, EUA), por 30 minutos em câmara úmida a 37 °C.

Ao término, as lâminas foram novamente lavadas em PBS, com três trocas de cinco minutos cada. A reação foi revelada com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, EUA) diluído em PBS contendo H₂O₂ (substrato da peroxidase; Fluka Chemical, EUA). Essa reação ocorrera ao abrigo da luz por 5 minutos, a 37 °C. A oxidação de DAB resulta em produto de coloração acastanhada.

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada (5 minutos cada) e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, EUA) por 30 segundos. Em seguida, realizou-se desidratação com concentrações crescentes de álcool etílico, diafanização em dois banhos de xilol e montagem das lâminas em resina Erv-mount (EasyPath®, Brasil). As lâminas foram observadas ao microscópio de luz (Eclipse E600, Nikon, Holanda) para análise histológica. Controles negativos incluíram a reação completa, omitindo-se o anticorpo primário.

3.12. Imunofluorescência indireta para detecção de CD31

Criosecções de tumor B16-F10 foram descongeladas por 10 minutos em temperatura ambiente, fixadas em álcool etílico (Merck, Alemanha) 70% (v/v) e, em seguida, lavadas por 3 vezes de cinco minutos em PBS.

O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com PBS/BSA 1% por 30 min em temperatura ambiente, no interior de câmara úmida. As secções foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD31 (feito em rato; GeneTex, EUA), diluído 1:50 em PBS/BSA 1%, por 16 h a 4 °C em câmara úmida. Na sequência, após três banhos de cinco minutos com PBS, procedeu-se à incubação dos cortes com anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado a fluoróforo Alexa Fluor® 488 (1:200 em PBS/BSA 1%; Life Technologies, EUA), por 30 minutos em temperatura ambiente.

Ao término, as lâminas foram novamente lavadas em PBS, com três trocas de cinco minutos cada. Os núcleos foram contra-corados com 50 ng/mL de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich, EUA) diluído em PBS. DAPI forma um complexo estável com a dupla fita de DNA, emitindo fluorescência em azul quando exposto à radiação ultravioleta (Hamada S et al., 1983). As secções foram montadas sob lamínulas de vidro com solução PBS/glicerol 50% (v/v) e, na sequência, observadas em microscópio de fluorescência (Eclipse E600, Nikon, Holanda) equipado com câmera digital. As imagens foram adquiridas em aumento de 200x. Controles negativos incluíram a reação completa, omitindo-se o anticorpo primário.

3.13. Análise morfométrica de vasos sanguíneos

Com o propósito de estudar o potencial antiangiogênico do anticorpo anti-FGF2 3F12E7, a densidade microvascular em tumores extraídos de animais tratados com anti-FGF2 IgG (ou com anticorpo controle de isotipo) foi analisada semiquantitativamente em secções imunomarcadas para CD34.

Para essa análise morfométrica, foram coletados aleatoriamente, em cada uma das secções, 20 campos (fotomicrografias) em aumento de 200x, espalhados por todo o fragmento de tecido a ser analisado. As imagens foram adquiridas com câmera digital DXM 1200F (Nikon, Holanda) acoplada ao microscópio de luz (Eclipse E600, Nikon, Holanda). Foi feita a contagem manual dos pontos sobre vasos CD34 positivos em nódulos tumorais com o auxílio de um retículo de 120 pontos equidistantes, dispersos de modo a ocupar toda a área da fotomicrografia. Utilizou-se software ImageJ versão 1,41 (NIH, EUA). Os resultados foram expressos em número de vasos CD34 positivos por unidade de área tumoral.

3.14. Extração proteica de tumores subcutâneos B16-F10

Fragmentos de tumores subcutâneos B16-F10 (com aproximadamente 1 cm³ de volume tumoral) foram homogeneizados mecanicamente em tampão de lise proteica [1% (v/v) Triton® X-100, 1% (m/v) de deoxicolato de sódio, 150 mM de NaCl, 1% (m/v) de SDS, 10 mM de NaF e 50 mM de Tris-HCl] contendo 2 mg/mL de aprotinina, 1 mM de PMSF e 1 mM de ortovanadato de sódio. O homogenato resultante foi centrifugado a 12000 xg por 15 minutos a 4 °C. Na sequência, o sobrenadante foi separado e teve sua concentração de proteínas determinada por método colorimétrico do

ácido bicinconínico (BCA; Bio Agency Biotecnologia, Brasil; descrito por Smith PK et al., 1985). Os resultados foram aferidos por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 562 nm (Bio-rad model 550; Bio-rad, EUA).

3.15. Eletroforese em gel de Poliacrilamida e Western Blot

Proteínas totais de lisado proteico de tumores B16-F10 foram resolvidas em gel de poliacrilamina 15% (m/v) sob condições redutoras (presença de DTT no tampão de amostra). Para isso, foram utilizados 50 µg do lisado proteico dispersos em tampão de amostra Laemmli 6x (v/v), de modo que este fique 1x (v/v) concentrado [1x: 62,5 mM Tris pH 6,8, 25% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS, 0,01% (m/v) azul de bromofenol]. Após corrida eletroforética a 100 V, em tampão de corrida Laemmli (1x: 25 mM de Tris, 0,19 M de glicina, 0,1% (m/v) de SDS, pH 8,3), procedeu-se à transferência das proteínas para membranas de difluoreto de polivinilideno com poros de 0,45 mm (PVDF; Amersham HybondTM-P, GE Healthcare, Inglaterra), por 1 h a 100 V. A transferência foi realizada em sistema úmido, utilizando tampão apropriado (25 mM de Tris, 0,19 M de glicina, pH 8,3).

O bloqueio de sítios inespecíficos na membrana (blot) foi realizado com solução de 2% de albumina sérica bovina (BSA; m/v) em PBS/T 0,1% (pH 7,4) pelo período de 1 h, sob agitação constante e em temperatura ambiente.

Na sequência, após lavagem com solução PBS/T 0,1% (v/v) por três vezes de cinco minutos, sob agitação constante e em temperatura ambiente, os *blots* foram incubados por 16 h a 4 °C com: anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7 (20 µg/mL),

anticorpo monoclonal ligante de CEA 1F5H2 (20 µg/mL) e anticorpo policlonal contra FGF2 (diluição 1:500; código sc-7911, Santa Cruz biotechnology, EUA).

O complexo antígeno-anticorpo foi detectado com anticorpo secundário acoplado com peroxidase (diluição 1:3000; Sigma-Aldrich, EUA). Para isso, após nova lavagem com solução TBS-T 0,1% (v/v) por três vezes de cinco minutos, sob agitação constante e em temperatura ambiente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (para detecção dos anticorpos monoclonais; código A2554, Sigma-Aldrich, EUA) ou anti-IgG de coelho (para detecção do anticorpo policlonal; Sigma-Aldrich, EUA), pelo período de 1 h, em temperatura ambiente, sob agitação constante. O produto da reação foi visualizado por método quimioluminescente (ECL). Todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 0,05% Tween®-20 (v/v).

3.16. Conjugação de anticorpos anti-FGF2 e ligante de CEA com 6-hidrazinonicotinamida

Anticorpos monoclonais anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2 (controle de isotipo) foram conjugados com succinimidyl-6-hidrazinonicotinamida (Suc-HYNIC). Suc-HYNIC foi desenvolvido no grupo do Dr. Pablo Cabral (Centro de Investigaciones Nucleares, UdelaR, Uruguai) através da troca do grupo halogênio do ácido 6-cloropiridina-3-carboxílico por um hidrazino; conforme descrito por Camacho X et al., 2013.

A conjugação procedeu-se da seguinte forma: 33 µL de solução NaHCO₃ 1 M e 0,057 mg de suc-HYNIC (dissolvido em 7,1 µL de DMSO) foram incubados com 5 mg

do anticorpo em questão (10 mg/mL em PBS pH 7,4) durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Para remover o excesso de HYNIC não ligado, a mistura foi purificada em coluna cromatográfica de dessalinização PD-10 (GE Healthcare, EUA), utilizando acetato de sódio 0,15 M pH 6,4 como fase móvel. O eluato foi coletado em frações de 0,5 mL, no interior de tubos de microcentrifugação de 1,5 mL (Sarstedt, EUA), as quais tiveram seu conteúdo proteico monitorado por absorbância em 280 nm (Nanodrop®; Thermo Scientific, EUA). As frações desejadas foram misturadas e fracionadas em frascos de vidro neutro tipo 1 (Euroglass, Brasil) autoclavados.

O conteúdo desses frascos foi liofilizado (Liofilizador de alto vácuo L5KR, Boc-Edwards, EUA) por 24 h a -20 °C e pressão de vácuo 45 mtorr. Após, os frascos foram lacrados, de modo a manter o vácuo no ambiente interno, e subsequentemente armazenados a -20 °C para posterior marcação com tecnécio-99m. A eficiência de conjugação dos anticorpos foi avaliada por espectrometria de massa (item 3.17).

3.17. Espectrometria de massa

Anticorpos HYNIC-conjugados foram avaliados por espectrometria de massa MALDI TOF/TOF (do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-light/time-of-light*) quanto ao número de moléculas de HYNIC que se ligaram à imunoglobulina (de acordo com Lu SX et al., 2005). As análises foram realizadas em equipamento 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Abi Sciex, EUA) no Institut Pasteur de Montevideo (Uruguai), utilizando o modo de aquisição linear positivo em uma matriz de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-trans-cinâmico (ácido sinapínico).

3.18. Radiomarcção de anticorpos monoclonais com tecnécio-99m

Anticorpos monoclonais anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2 (controle de isotipo) HYNIC-conjugados foram marcados com tecnécio-99m, de acordo com Camacho X e colaboradores (Camacho X et al., 2013).

Tecnécio-99m (^{99m}Tc) foi obtido na forma de pertecnetato de sódio (Na^{99m}Tc) a partir de eluição de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (IPEN, Brasil) com 0,9% (m/v) NaCl. Com o propósito de se obter ^{99m}Tc com alta atividade específica, em todas as marcações foram utilizados eluatos de geradores eluídos 24 h antes (Marques et al., 2001).

Adotou-se tricina (N-[Tris(hidroximetil)-metil]glicina; Sigma-Aldrich, EUA) como coligante da reação. Para isso, foi utilizada uma solução tricina- SnCl_2 , obtida a partir da mistura de 8 mg de tricina (em água; 800 μL), 50 μL de HCl 2 M e 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (em HCl 2 M; 50 μL ; Mallinkrodt, EUA). A massa dos reagentes foi aferida em balança analítica Mettler, modelo AE200 (Mettler, Suíça). No momento da marcação, o volume final desta solução foi completado para 10 mL com 0,9% (m/v) NaCl de modo a se obter a seguinte concentração final dos reagentes: 10 mg/mL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,8 mg/mL de tricina. Essa solução foi preparada com água Milli-q nitrogenada por ao menos 15 minutos em nitrogênio gasoso (IBG Gases especiais, Brasil).

Na sequência, 1 mg de HYNIC-IgG liofilizado, mantido a vácuo no interior de frascos de vidro neutro tipo 1 (Euroglass, Brasil) lacrados, foi dissolvido em 25 μL da solução tricina- SnCl_2 e 500 μL de 10 mCi de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ em 500 μL de 0,9% (m/v) NaCl. A solução resultante foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Essa marcação ocorreu no interior de área protegida por castelos de chumbo. A eficiência de marcação de ^{99m}Tc -HYNIC-mAb foi aferida por cromatografia planar e por cromatografia líquida de alta eficiência.

3.19. Cromatografia planar

Ensaio de cromatografia planar foram realizados com papel filtro Whatman® (GE Healthcare, EUA) ou com iTLC-SG (Varian Inc., EUA), composto por fibra de vidro impregnada com sílica-gel, utilizando três sistemas com as seguintes fases estacionária e móvel, respectivamente: (I) iTLC-SG / 0,9% NaCl (m/v); (II) Whatman 1 MM (W1) / acetona; e (III) iTLC-SG impregnada com BSA / EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5). Esses sistemas cromatográficos, juntamente com seus fatores de retardamento (R_f), encontram-se sistematizados na **Tabela 5**.

Alíquota do anticorpo radiomarcado (~5 µL) foi aplicada diretamente sobre a fase estacionária (1 cm x 8 cm) a uma distância de 1 cm da margem inferior, por meio de seringa acoplada a agulha calibre 27G. A corrida cromatográfica foi realizada no interior de cubas contendo aproximadamente 1 mL de solução utilizada como fase móvel. Após a fase móvel percorrer uma distância de 6 cm a partir do ponto de aplicação da amostra, a fase estacionária foi retirada da cuba e secada com auxílio de soprador térmico (Dekel modelo TA-1050; Dekel, Brasil).

Tabela 5. Sistemas de cromatografia planar utilizados para aferir pureza radioquímica de anticorpos ^{99m}Tc -marcados.

Controle	Fase estacionária	Fase móvel	R_f^*	Molécula
1	iTLC-SG	NaCl 0,9% (m/v)	0,0 (~posição de início)	^{99m}Tc -HYNIC-MAb e $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
			1,0	^{99m}Tc -tricina, ^{99m}Tc
2	Whatman 1 MM	Acetona	0,0 (~posição de início)	^{99m}Tc -HYNIC-MAb, $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ e ^{99m}Tc -tricina
			1,0	^{99m}Tc
3	iTLC-SG pré-tratada com BSA	Solução EtOH:NH ₄ OH:H ₂ O (2:1:5)	0,0 (~posição de início)	$^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
			0,8-1,0	^{99m}Tc -HYNIC-MAb, ^{99m}Tc -tricina e ^{99m}Tc

Legenda: R_f , fator de retardamento; EtOH, etanol. Referência: Camacho X et al., 2013.

* R_f é definido pela migração relativa de um componente em relação à frente de corrida.

Ou seja, _____ . Os valores de R_f variam de 0,0 (componente retido no ponto de aplicação) a 1,0 (componente retido na frente de corrida). Os valores de R_f são utilizados para identificar cada um dos componentes.

As fitas de iTLC ou W1 foram cortadas em segmentos de 1 cm para contagem da radioatividade (CPM) em contador de radiação gama tipo poço Wallac 1480 Wizard 3” (PerkinElmer Inc., Finlândia) (ver **Fig. 11**). A atividade de fundo (*background*) foi

subtraída de cada uma das contagens e os valores de CPM corrigidos foram utilizados para cálculo da pureza radioquímica de ^{99m}Tc -IgG. Análises realizadas em duplicata.

Figura 11. Método de cromatografia planar ascendente utilizado para determinar a pureza radioquímica de ^{99m}Tc -IgG. (A) Alíquota de anticorpo radiomarcado é aplicada diretamente sobre a fase estacionária, a qual é posicionada em contato com a fase móvel (B). Ao término da corrida cromatográfica, a fase estacionária é cortada em segmentos para contagem da radioatividade em contador de radiação gama (C). Adaptado de Zolle I, 2007.

Em cada um desses sistemas, o percentual de $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, ^{99m}Tc e ^{99m}Tc -tricina foi calculado através da razão entre a radioatividade obtida no R_f da impureza e a radioatividade total da fase estacionária. Ou seja,

(Equação 2)

A partir desses valores, calculou-se a pureza radioquímica do anticorpo ^{99m}Tc -marcado por meio da equação de balanço de massas:

(Equação 3)

3.20. Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; do inglês *high performance liquid chromatography*) foram realizadas em sistema Shimadzu SCL-10AVP (Shimadzu, Japão) equipado com detector de radioatividade Radiomatic 610TR (PerkinElmer, EUA) e detector UV-VIS Shimadzu SPD-10AVP (Shimadzu, Japão) ajustado para o comprimento de onda de 280 nm.

A corrida cromatográfica foi realizada em modo isocrático, utilizando como fase móvel tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0, em coluna de gel filtração semi-preparativa Protein-Pak 300SW 7,5 mm x 300 mm, composta por partículas de 10 μm e poros de 300 Å (Waters, EUA). A taxa de fluxo foi de 1 mL/min. As análises foram realizadas em uma corrida de 20 minutos, em temperatura ambiente, a partir de 10 μL de anticorpo ^{99m}Tc -marcado contendo 10 μCi . Os radiocromatogramas foram analisados em software ProFSA (PerkinElmer, EUA). A proporção da radioatividade total associada ao pico do anticorpo foi calculada.

Previamente ao inóculo nos animais, os anticorpos ^{99m}Tc -marcados anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2 foram purificados por HPLC, através da coleta das frações correspondentes ao pico do anticorpo no radiocromatograma. Para isso, utilizou-se uma corrida de 20 minutos, em temperatura ambiente, a partir de 500 μL do anticorpo radiomarcado com 370 MBq (10 mCi). As frações purificadas tiveram sua radioatividade determinada em calibrador de dose (Victoreen modelo 34-056; Victoreen, EUA).

3.21. Estabilidade *in vitro* dos anticorpos ^{99m}Tc -marcados

A estabilidade radioquímica *in vitro* dos anticorpos ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (controle de isotipo) foi avaliada em solução salina (NaCl 0,9%) e em soro normal de camundongo.

A estabilidade em solução salina foi obtida através da incubação de 10 μL desses anticorpos (3,7 MBq; 100 μCi) com 90 μL de solução NaCl 0,9% em temperatura ambiente (25 °C) ou a 37 °C, por um período de até 24 h.

Os estudos de estabilidade em soro foram conduzidos através da incubação por 24 h, a 37 °C, de 10 μL dos anticorpos ^{99m}Tc -marcados (3,7 MBq; 100 μCi) com 90 μL de soro recém coletado de camundongo C57Bl/6 sadio. Amostras de soro foram obtidas a partir de coleta de sangue pelo plexo retro-orbital de camundongos sob anestesia, conforme previamente descrito (item 3.6).

Em diferentes intervalos de tempo (1, 4 e 24 h), alíquotas dessas soluções foram analisadas quanto à estabilidade do anticorpo radiomarcado, por métodos de cromatografia planar (item **3.19**).

3.22. Estabilidade *in vitro* dos anticorpos ^{99m}Tc -marcados frente a desafio com L-cisteína

10 μL dos anticorpos radiomarcados anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2 (controle isotipo) foram incubados com 90 μL de solução 1 mM de L-cisteína (Sigma-Aldrich, EUA), resultando em concentração final de 0,9 mM. A incubação ocorreria a 37 °C, pH 7,4, por 24 h.

De modo similar ao realizado nos estudos de estabilidade em solução fisiológica e soro, alíquotas foram coletadas nos tempos 1, 4 e 24 h e avaliadas, por métodos de cromatografia planar, quanto à estabilidade radioquímica do anticorpo, conforme descrito anteriormente (item **3.19**).

3.23. Determinação do valor da constante de associação do anti-FGF2 3F12E7 IgG

A constante de associação do anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7 ^{99m}Tc -marcado foi determinada por radioimunoensaio (RIA; do inglês *Radio-immuno Assay*) de ligação competitiva em placas de poliestireno de 96 poços (Falcon®, Becton Dickinson, EUA), com alta capacidade de ligação a proteínas, sensibilizadas com antígeno FGF2.

Para isso, os poços foram recobertos com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de FGF2 (Sigma-Aldrich, EUA), dissolvido em PBS pH 7,4, por 1 h a 37 °C. O bloqueio dos sítios ativos

remanescentes do plástico foi feito com PBS/BSA 1% por 1 h em temperatura ambiente.

^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 IgG em concentrações crescentes (de 0,1 a 3 nM) foi incubado nos poços na presença ou ausência de excesso do respectivo anticorpo não-marcado (100 vezes mais), para saturar os sítios de ligação específicos. A incubação foi realizada em PBS/BSA 1% por 2 h, em temperatura ambiente. Foram utilizados anticorpos com pureza radioquímica superior a 95%, após purificação por HPLC. A concentração aparente de ^{99m}Tc -IgG foi determinada levando-se em conta a pureza radioquímica do composto, de acordo com a equação abaixo:

—

(Equação 4)

onde PRq é a pureza radioquímica do anticorpo ^{99m}Tc -marcado, obtida por cromatografia planar, e — é a concentração de anticorpo em solução, determinada por método colorimétrico do ácido bicinonínico (BCA; Bio Agency Biotecnologia, Brasil; Smith PK et al., 1985).

Ao término da reação, os poços foram lavados por três vezes com PBS/Tween 0,05%. A radioatividade de cada um dos poços, bem como a associada aos lavados e à solução de incubação contendo ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 IgG não ligado ao poço, foram contabilizadas em contador automático de radiação gama tipo poço Wallac 1480

Wizard 3'' (PerkinElmer Inc., Finlândia). Foram realizados três ensaios independentes, em triplicata.

A curva de ligação específica foi construída pela diferença entre o percentual de atividade ligada ao poço e o obtido na vigência de incubação de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 IgG na presença de anticorpo não-marcado, de acordo com a equação abaixo:

(Equação 5)

O valor de K_d foi determinado por análise de regressão não-linear da isoterma de ligação, através de software GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad, EUA), conforme proposto no web-site <http://www.graphpad.com/faq/file/P4-Binding%20analysis.pdf>. Os dados foram linearizados em gráfico Scatchard construído a partir da equação:

(Equação 6)

onde B_{sp} = percentual de atividade ligada especificamente ao poço;
 B_{ns} = percentual de atividade não ligada ao poço; K_a = constante de afinidade ($= 1/(K_d)$); e B_{max} = número máximo de sítios de ligação.

3.24. Estudos *ex vivo* de distribuição biológica e depuração dos anticorpos radiomarcados

A distribuição tecidual *ex vivo* dos anticorpos radiomarcados foi realizada em camundongos C57Bl/6, portadores ou não de tumor. Cada animal foi injetado intravenosamente, via caudal, com 1,85 MBq (50 μ Ci; 100 μ L) de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou de ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG, como controle de isotipo. As doses foram preparadas diluindo o produto marcado em solução NaCl 0,9% (m/v).

Os estudos de biodistribuição ocorreram no 9º dia pós-implante subcutâneo das células B16-F10, quando o volume tumoral foi de aproximadamente 0,5 cm³. Foram utilizados anticorpos ^{99m}Tc -conjugados com pureza radioquímica superior a 95% em todos os ensaios de biodistribuição. A solução contendo anticorpo radiomarcado foi filtrada em membrana com poros de 0,22 μ m previamente à administração.

Quatro e vinte e quatro horas após o inóculo do anticorpo ^{99m}Tc -marcado, grupos de três animais foram rapidamente anestesiados com mistura gasosa isoflurano/oxigênio (5%/2,5%) e, na sequência, sacrificados por deslocamento cervical.

Foram coletados sangue, coração, pulmão, fígado, baço, estômago, intestino, osso, músculo esquelético (quadríceps femoral), tumor, rins, fezes, bexiga urinária e urina. Os órgãos dissecados e as excreções coletadas tiveram sua massa mensurada em balança analítica com precisão de duas casas decimais e, na sequência, foram aferidos quanto à radioatividade em contador automático de radiação gama tipo poço Wallac 1480 Wizard 3” (PerkinElmer Inc., Finlândia). Os valores de percentual de dose

injetada por grama de tecido (%ID/g) e de percentual de dose injetada (%ID) foram calculados.

Para avaliar a especificidade de ligação do anticorpo em estudo, camundongos receberam via veia caudal 500 µg de anti-FGF2 3F12E7 IgG (ou 1F5H2 IgG, como controle de isotipo) 1 h antes da administração de 1,8 MBq (50 µCi) de ^{99m}Tc-HYNIC-anti-FGF2 IgG. Nos tempos de quatro e vinte e quatro horas pós-inóculo, grupos de 3 animais foram sacrificados, seguindo o mesmo procedimento previamente descrito. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos sem inóculo prévio de anticorpo não-radiomarcado.

Durante esses ensaios de biodistribuição os animais permaneceram com água e ração durante todo o período experimental. Foram consideradas para análise estatística as razões tumor/sangue e tumor/músculo esquelético. Os experimentos foram repetidos por duas vezes, de modo independente.

3.25. Aquisição e análise de imagens SPECT/CT

Estudos cintilográficos foram realizados com o propósito de avaliar a distribuição corpórea e captação tumoral *in vivo* do anticorpo anti-FGF2 3F12E7. Para isso, grupos de animais C57Bl/6, portadores ou não de tumor, receberam intravenosamente, via caudal, 37 MBq (1 mCi; 100 µL) de ^{99m}Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG (10 mg/kg de IgG / animal) ou de ^{99m}Tc-HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG, como controle de isotipo.

Total de três grupos experimentais para cada anticorpo: (I) Animais desprovidos de tumor (controle de distribuição; n=3); (II) Animais portadores de melanoma subcutâneo B16-F10 (n=3); e (III) Animais portadores de nódulos metastáticos de B16-F10 no parênquima pulmonar (n=3).

No caso de animais portadores de tumor subcutâneo, as imagens foram adquiridas no 9º dia pós-implante das células B16-F10 (5×10^5 células/animal; 100 µL), quando o volume tumoral foi de aproximadamente 0,5 cm³. Já os camundongos portadores de nódulos metastáticos de B16-F10 no pulmão tiveram suas imagens SPECT/CT obtidas no 7º e 14º dia pós-inóculo endovenoso dessas células tumorais (5×10^5 células/animal; 100 µL).

Foram utilizados anticorpos ^{99m}Tc-conjugados com pureza radioquímica superior a 95% em todos os estudos de imagem. A solução contendo anticorpo radiomarcado foi filtrada em membrana com poros de 0,22 µm previamente à administração.

Quatro e vinte e quatro horas pós-inóculo de anticorpo radiomarcado, os animais foram anestesiados com mistura gasosa isoflurano/oxigênio (2%/2,5%) e posicionados em decúbito ventral sobre maca aquecida a 37 °C para obtenção de imagens SPECT/CT.

As aquisições foram realizadas em câmara multimodal SPECT/CT TriumphTM (Gamma Medica-Ideas, EUA) equipada com dois detectores de cintilação (opostos 180º) e uma fonte de raio-X de 80 kVp e corrente de 110 µA (**Fig. 12**). Animais foram monitorados quanto ao ritmo respiratório durante todo o estudo, o qual se manteve estável entre 60 e 80 ciclos/min.

Primeiramente, imagens CT foram obtidas através de 512 projeções em uma rotação de 360º, com foco de 50 µm. Tempo total de aquisição de 2,5 min. Essas

imagens foram reconstruídas aplicando-se algoritmo do tipo FBP (retroprojeção filtrada) em um volume de 512 x 512 x 512 voxels de 170 µm por meio do software Triumph X-O™ 4,2 (Gamma Medica-Ideas, EUA).

Na sequência, sem qualquer realocação ou reposicionamento do animal, imagens SPECT foram adquiridas utilizando colimador de alta resolução N5F75A10, com cinco pinholes de 1 mm de abertura e distância focal de 75 mm. Para cada animal, foi adquirido um total de 128 projeções distribuídas em 360° (64 projeções por detector). A câmera de captura foi ajustada para uma janela de 20% centralizada em um pico de energia de 140 keV. O tempo de aquisição foi de 25 s por projeção, para as imagens 4 h pós-inóculo do anticorpo radiomarcado, e 50 s, para imagens de 24 h.

As imagens SPECT foram reconstruídas pelo método iterativo OSEM (do inglês *ordered-subsets expectation maximization*) (Hudson HM et al., 1994; Bruyant, PP, 2002), com 5 iterações e 8 subconjuntos por iteração, em uma matriz de 60 x 60 x 60 voxels isotrópicos de 0,94 mm. Os dados reconstruídos foram processados através do software PMOD™, versão 3,503 (PMOD Technologies Ltd., Suíça), utilizando as imagens CT como referência anatômica. Imagens renderizadas do volume tridimensional SPECT/CT foram obtidas em software Amira® versão 5.5.0 (FEI Visualization Sciences Group, EUA).

Figura 12. Plataforma SPECT/CT Triumph™ (Gamma Medica-Ideas, EUA). (A) Visão frontal do equipamento. (B) Interior da câmara SPECT/CT, composta por dois detectores cintilográficos (seta), cada um equipado com colimador multipinhole. O camundongo é posicionado sobre maca aquecida a 37 °C (ponta de seta), acoplada com sistema de anestesia com mistura gasosa isoflurano/oxigênio, para obtenção das imagens.

Regiões de interesse bidimensionais (ROI; do inglês *region of interest*) foram delimitadas manualmente ao redor do tumor no plano coronal do SPECT e o seu valor médio de contagem por pixel () determinado. Uma ROI de mesma área foi desenhada contralateralmente, em região desprovida de tecido neoplásico, para a obtenção os valores médios de CPP de fundo (*background*).

Os valores da razão foram calculados para cada animal injetado com ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG e comparados com os obtidos para o grupo injetado com anticorpo controle de isotipo ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2.

3.26. Estudo auto-radiográfico e de biodistribuição *ex vivo* em camundongos portadores de nódulos pulmonares de B16-F10

Após aquisição das últimas imagens SPECT/CT, 14 dias pós-inóculo iv de células B16-F10, camundongos portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10 foram sacrificados por deslocamento cervical.

O pulmão e fragmento de músculo quadríceps femoral foram coletados, tiveram sua massa mensurada em balança analítica e, na sequência, sua radioatividade foi determinada em contador automático de radiação gama tipo poço Wallac 1480 Wizard 3'' (PerkinElmer Inc., Finlândia). Os valores da razão (%ID/g pulmão)/(%ID/g músculo esquelético) foram calculados a partir da equação abaixo:

(Equação 7)

onde CPM = contagens por minuto; m = massa do tecido.

Paralelamente, os pulmões coletados foram embebidos em meio de congelamento OCT (Tissue-tek®; Sakura Finetek, EUA) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Secções coronais de 10 µm de espessura foram expostas em placas de fósforo fotossensível (PSP; do inglês *Photosimulable Storage Phosphor*) por 24 h, no interior de cassetes. A leitura das placas foi realizada em equipamento Storm 840 Scanner (Molecular Dynamics, EUA), com resolução de 50 µm. As imagens foram analisadas em software ImageJ versão 1,41 (NIH, EUA).

Foram avaliados animais portadores de nódulos pulmonares de B16-F10 injetados com (I) ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou (II) com ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (anticorpo controle de isotipo) (n=3/grupo).

Secção sequencial do mesmo tecido foi corada com HE e fotografada em microscópio de luz convencional, com a finalidade de correlacionar os focos de maior radioatividade com áreas portadoras, ou não, de nódulos tumorais. Para isso, lâminas contendo as secções de interesse foram rapidamente fixadas em um banho de álcool etílico (Merck, Alemanha) 70% (v/v) e, na sequência, coradas com HE, conforme mencionado anteriormente (item 3.10).

3.27. Análise estatística

A significância estatística dos dados foi determinada por meio de análise de variância de uma via (do inglês *one-way ANOVA*) seguido por pós-teste de Bonferroni. Alternativamente, quando o desenho experimental envolveu a comparação entre dois grupos, utilizou-se teste t-Student não pareado. Em ambos os casos, utilizou-se o software GraphPad Prism 5,0 (GraphPad Software, EUA), adotando-se como nível de significância $p \leq 0,05$.

Os dados de biodistribuição *ex vivo* foram reportados como média $\pm$ desvio padrão (SD), com base nos resultados obtidos com três animais para cada grupo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL

Exploramos neste trabalho o potencial diagnóstico e terapêutico de um anticorpo monoclonal murino anti-FGF2 em melanoma experimental B16-F10. O anticorpo utilizado, de isotipo IgG1, é secretado por células de hibridoma 3F12E7, produto da fusão de células mieloides SP2 com células B isoladas de camundongos imunizados com vetor contendo cDNA para hFGF2 (**INTRODUÇÃO**, item 1.10).

Para efeitos de controle dos resultados alcançados através das abordagens anti-FGF2, todos os estudos com mAb 3F12E7 foram conduzidos em paralelo com outro anticorpo, de mesmo isotipo, específico para epítipo irrelevante no modelo de estudo. Optamos por empregar um anticorpo ligante de CEA secretado por células de hibridoma 1F5H2. Estas células foram produzidas pelo método de Köhler e Milstein (Köhler G et al., 1975), através da imunização de camundongos BALB/c com anticorpo monoclonal anti-idiotípico que mimetiza um epítipo antigênico de CEA (Moraes JZ et al., 1994).

Apesar de já identificado famílias de moléculas relacionadas ao CEA expressas em tecido murino, até o momento não foi observado qualquer homologia destas com a molécula de CEA humano, para a qual o anticorpo 1F5H2 foi desenhado (Hance KW et al., 2005; Moraes JZ et al., 1994).

MAbs anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2 foram purificados, a partir de fluído ascítico, através de cromatografia de afinidade em coluna de proteína G-Sepharose equilibrada com tampão fosfato pH 7,0, conforme descrito em **MATERIAIS E MÉTODOS** (item 3.2). Proteína G é amplamente utilizada para fins de purificação de anticorpos monoclonais, com os quais interage reversivelmente tanto com a porção Fab

quanto Fc (Derrick JP et al., 1992). A produção de anticorpos por fluído ascítico é comercialmente custo-efetiva, comparado com métodos de cultivo *in vitro* de células de hibridoma, os quais são caros, tempo-consumíveis e frequentemente falham em produzir a quantidade de anticorpo requerida para os ensaios *in vivo* (Sineh Sepehr K et al., 2013).

Após purificação, os anticorpos foram monitorados quanto a sua identidade, grau de pureza e integridade estrutural e biológica através de ensaios *in vitro*. A pureza e a identidade dos anticorpos purificados foram determinadas por eletroforese em gel SDS-PAGE, a qual mostrou um produto final puro. O perfil eletroforético revela para ambos os anticorpos, em condições não redutoras, o aparecimento de uma banda de aproximadamente 150 kDa, correspondente à molécula de anticorpo íntegra. Em condições redutoras, notam-se primariamente duas bandas, correspondentes às cadeias leve (~22 kDa) e pesada (~50 kDa) de IgG (**Fig. 13A**). Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC em coluna de exclusão por tamanho apontam para um pico principal de absorbância em 280 nm ($t_r = 8$ min; **Fig. 13B**) para as moléculas de anti-FGF2 3F12E7 IgG e ligante de CEA 1F5H2 IgG íntegras.

A imunorreatividade dos anticorpos foi avaliada por *western blotting*. MAb anti-FGF2 3F12E7 reconhece banda de ~17 kDa, também detectada por anticorpo policlonal específico para FGF2, em lisado proteico de tumores subcutâneos B16-F10, o que indica a reatividade do anticorpo monoclonal 3F12E7 com a forma murina desse fator de crescimento (**Fig. 13C**).

Curiosamente, *western blotting* com mAb ligante de CEA 1F5H2 aponta para duas bandas, de aproximadamente 25 e 50 kDa, também identificadas por anti-FGF2 3F12E7 IgG. Por apresentarem um padrão de peso molecular característico de

fragmentos correspondentes às cadeias leve e pesada de imunoglobulinas, é bastante provável que elas sejam o resultado da interação do anticorpo secundário HRPO-anti-IgG de camundongo, utilizado como parte da revelação do ensaio de *western blotting*, com imunoglobulinas endógenas presente na massa tumoral (Mancardi DA et al., 2013; Wang J et al., 2013), conforme observa-se na **Fig. 13C**. Esses fragmentos são o possível resultado da redução das moléculas de anticorpo endógeno presente no lisado proteico tumoral com o agente DTT presente no tampão de amostra para SDS-PAGE.

O não reconhecimento de bandas proteicas específicas pelo anticorpo ligante de CEA 1F5H2 permite classificá-lo como um controle de isotipo válido para os ensaios com mAb anti-FGF2. É importante observar também que a expressão de FGF2 em tumores B16-F10, detectada por ensaios de *western blotting* (**Fig. 13C**), viabiliza o uso desse modelo experimental em estudos da resposta antitumoral frente à terapia anti-FGF2.

Os resultados alcançados com a aplicação *in vivo* do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 são reportados a seguir em duas partes. Na **PARTE I** (pág. 71-84) exploramos a eficácia desta molécula em interferir no crescimento de tumores sólidos subcutâneos e de nódulos pulmonares de melanoma experimental B16-F10. Avaliamos também se a resposta obtida está associada ou não a eventos de angiogênese.

A **PARTE II** (pág. 85-144) é dedicada a estudos farmacocinéticos e de imagem SPECT/CT conduzidos com anticorpo anti-FGF2 marcado com o radionuclídeo ^{99m}Tc . Nesta unidade, apresentamos a eficácia do anticorpo anti-FGF2 em alcançar o tecido tumoral, chamando atenção para sua potencial aplicação como traçador de tumores FGF2-positivos.

Uma discussão geral é apresentada no item **5 - DISCUSSÃO GERAL**.

Figura 13. Imunorreatividade e pureza dos anticorpos monoclonais 3F12E7 e 1F5H2. (A) SDS-PAGE de anticorpos purificados anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2. Gel corado com Coomassie Blue. (B) Cromatograma UV (absorbância em 280 nm) representativo de anti-FGF2 3F12E7 IgG e ligante de CEA 1F5H2 IgG em coluna de exclusão de tamanho. (C) Extratos proteicos de tumores B16-F10 analisados por *western blotting* utilizando anticorpo anti-FGF2 monoclonal 3F12E7 e policlonal, bem como mAb 1F5H2. MAb 3F12E7 reconhece banda proteica de ~17 kDa (ponta de seta) também detectada em incubação com pAb anti-FGF2. Resultados representativos de três experimentos independentes. Legenda: mAb, anticorpo monoclonal; pAb, anticorpo policlonal; R, condição redutora; NR, condição não redutora; MW, peso molecular.

PARTE I – APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-FGF2 EM MELANOMA EXPERIMENTAL

A aplicabilidade terapêutica do anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7 foi avaliada em tumores subcutâneos e em focos metastáticos de melanoma experimental B16-F10 induzido em camundongos C57Bl/6, de acordo com o exposto em **MATERIAIS E MÉTODOS** (item 3.4). Os resultados são apresentados a seguir, nos itens **4.I.1** e **4.I.2**

4.I.1. Anti-FGF2 3F12E7 IgG reduz a taxa de crescimento de tumor subcutâneo B16-F10

Estudos com melanoma murino B16-F10 subcutâneo em camundongos C57Bl/6 apontam um efeito antitumoral do nosso mAb anti-FGF2, quando administrado na forma de células 3F12E7 γ -irradiadas.

Dados prévios – apresentados em **ANEXO II** – mostram que, quando implantadas em modelo animal, células de hibridoma γ -irradiadas conseguem, de modo satisfatório, secretar anticorpo em níveis detectáveis na corrente sanguínea, configurando-se como um sistema experimental alternativo à infusão exógena de solução contendo imunoglobulina purificada.

Dentro dessa abordagem, para mantermos níveis séricos sustentados de mAb anti-FGF2, implantamos essas células intraperitonealmente a cada dois dias. O tratamento teve início no 5º dia pós-implante das células B16-F10, quando os tumores apresentavam-se palpáveis, porém não mensuráveis.

As curvas de crescimento tumoral de cada um dos camundongos dos três grupos experimentais são apresentadas na **Fig. 14**. Esses resultados mostram que, quando implantadas, células de hibridoma anti-FGF2 3F12E7 γ -irradiadas conseguem, de modo satisfatório, apresentar uma ação terapêutica antitumoral. Há uma menor taxa de crescimento de tumores do grupo 3F12E7 (anti-FGF2 IgG), comparado com o obtido nos grupos controle de isotipo 1F5H2 e controle de veículo (RPMI-1640 sem soro fetal bovino, utilizado na administração das células). Ensaio imunoenzimático com amostras de soro dos dias 7, 9 e 11 pós-implante de células B16-F10 confirmam a secreção satisfatória *in vivo* de anticorpos anti-FGF2 por células de hibridoma 3F12E7 γ -irradiadas (**Fig. 15**).

Além disso, ensaios imunoenzimáticos com o produto de eluição com pH baixo de tumores B16-F10 provenientes de camundongos tratados com células 3F12E7 γ -irradiadas mostrou imunoreatividade positiva contra o antígeno FGF2, conforme se observa na **Fig. 16**. Isso sugere que complexos antígeno-anticorpo formados *in vivo* no microambiente tumoral foram dissociados durante o procedimento de eluição e anticorpos ativos foram recuperados. Foram utilizados fragmentos de tumores extraídos de animais no 7º dia pós-início de tratamento com células de hibridoma que secretam anti-FGF2 (ou mAb ligante de CEA, utilizado como controle de isotipo).

A.

B.

Figura 14. Tratamento com mAb 3F12E7 interfere no crescimento de tumor subcutâneo B16-F10. (A) Delineamento experimental. Células de melanoma B16-F10 (5×10^5) foram injetadas subcutaneamente em camundongos C57Bl/6 e os tumores foram mensurados diariamente. Camundongos tratados intraperitonealmente, a cada dois dias, com células de hibridoma irradiadas. A figura (B) mostra a curva de crescimento tumoral para cada animal do experimento. Três grupos experimentais: controle de veículo, $n=5$; controle de isotipo 1F5H2, $n=8$; 3F12E7, $n=9$. Apesar da existência de dois animais não responsivos ao tratamento, esses dados sugerem que o mAb anti-FGF2 3F12E7 reduz a taxa de crescimento de tumor subcutâneo B16-F10.

Figura 15. Secreção *in vivo* eficiente de anticorpos monoclonais por células de hibridoma irradiadas. (A) Detecção de anticorpo anti-FGF2 por ELISA em amostras de soro extraídas de camundongos C57Bl/6, em tratamento com células gama-irradiadas 3F12E7 ou 1F5H2 como controle, nos dias 7, 9 e 11 pós-implante de células B16-F10. Medidas realizadas em triplicatas (n=6 por grupo). (B) ELISA para detecção de anticorpo ligante de CEA 1F5H2 em amostras do dia 11 para se certificar de que este anticorpo estava presente na corrente sanguínea dos animais do grupo controle de isotipo. OD_{490nm} corresponde à densidade óptica obtida por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 492 nm. Análises estatísticas realizadas utilizando teste t-student e diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. (*, $p < 0,05$ comparando o grupo tratado com 3F12E7 com o respectivo grupo controle 1F5H2; #, $p < 0,05$ comparado com o grupo 3F12E7).

De modo geral, essa informação permite correlacionar o efeito terapêutico de mAb 3F12E7 com a presença de IgG anti-FGF2 no microambiente tumoral. Estudos posteriores, através de abordagens de medicina nuclear, foram conduzidos com o propósito de explorar mais essa captação de anticorpos por tumores, conforme será abordado em **RESULTADOS- PARTE II**.

Figura 16. Eluição ácida de imunoglobulina de tumores. Detecção de anticorpos anti-FGF2 por ELISA em produto de eluição ácida de tumores B16-F10 provenientes de animais tratados ou não com mAb 3F12E7 (ensaio em triplicatas, n=5 por grupo). Análise estatística realizada por análise de variância de uma via (ANOVA). * $p < 0,05$ comparado com os grupos PBS e 1F5H2 IgG. OD_{490nm} corresponde à densidade óptica obtida por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 490 nm.

A eficácia terapêutica de mAb anti-FGF2 3F12E7 confirmou-se também através da administração via veia caudal dessa IgG, em sua forma purificada. O plano experimental e a curva de crescimento médio dos tumores (n=5/grupo) são apresentados na **Fig. 17**. De modo semelhante ao observado na **Fig. 14**, nota-se que esse tratamento anti-FGF2 compromete mas não interrompe o crescimento de tumores B16-F10 subcutâneos, localizados no quadrante abdominal inferior esquerdo dos animais.

Estudos de imunomarcção com anticorpo anti-CD31 sugerem que a redução na densidade microvascular seja um dos mecanismos de ação por trás da resposta terapêutica de anti-FGF2 3F12E7 IgG. Fotomicrografias representativas em **Fig. 17C** apontam para redução no número de vasos CD31-positivos em secções de tumor do grupo tratado com mAb anti-FGF2 3F12E7. CD31 (ou PECAM-1; molécula de adesão celular endotelial plaquetária do tipo 1) é um marcador expresso em células endoteliais corriqueiramente utilizado em estudos para determinar a densidade microvascular de tumores (Uzzan B et al., 2004).

Figura 17. Tratamento com mAb anti-FGF2 3F12E7 purificado interfere na taxa de crescimento de tumor subcutâneo B16-F10 e reduz número de vasos CD31⁺. (A) Plano experimental. Células de melanoma B16-F10 (5×10^5) foram injetadas subcutaneamente em camundongos C57Bl/6 e os tumores foram mensurados diariamente. Os camundongos receberam via veia caudal 2 mg/kg (4 mL/kg) de IgG (ou PBS, como controle de veículo). Três grupos experimentais: controle PBS, n=5; mAb controle de isotipo 1F5H2, n=5; mAb anti-FGF2 3F12E7, n=5. Figura (B) mostra a curva média de crescimento tumoral obtida. (C) Fotomicrografias representativas da densidade vascular em seções de tumor B16-F10, determinados por imunomarcagem com anticorpo anti-CD31, apontam para redução no número de vasos CD31-positivos em seções de tumor do grupo tratado com mAb anti-FGF2 3F12E7. Barra (C) = 50 µm. *p<0,05 comparado com os correspondentes grupos PBS e 1F5H2 IgG (análise de variância de uma via).

4.1.2. MAb anti-FGF2 compromete a formação de nódulos metastáticos pulmonares de B16-F10

Interferir em nódulos metastáticos de melanoma é particularmente interessante, haja vista que há poucos tratamentos efetivos para essa modalidade além de intervenção cirúrgica (Nguyen DX et al., 2009). FGF2 é um fator crítico para angiogênese tumoral e metástase em melanomas. Sua expressão está associada a transdução de vias de sinalização que incluem ERK, um importante regulador de crescimento celular e invasão durante a progressão de melanomas ao fenótipo maligno (Reiland J et al., 2006).

Para avaliar o potencial terapêutico do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 em modelo experimental de metástase pulmonar, camundongos C57Bl/6 receberam via veia caudal células B16-F10. O tratamento teve início 1 dia após o implante das células B16-F10. Quatorze dias após o desafio, camundongos foram sacrificados, os pulmões removidos para avaliação do número de focos tumorais. O plano experimental é apresentado na **Fig. 18A**.

O inóculo via veia caudal de células B16 é uma estratégia amplamente utilizada para o estabelecimento de focos tumorais de melanoma no parênquima pulmonar, tecido onde a maioria dos nódulos se desenvolvem (Overwijk WW et al., 2001). Juntamente com fígado, cérebro e osso, o tecido pulmonar está entre os sítios de metástase comumente observados em pacientes portadores de melanoma maligno (Nguyen DX et al., 2009).

Foram utilizados grupos de sete animais tratados sistemicamente com (a) células de hibridoma 3F12E7 γ -irradiadas, secretoras de mAb anti-FGF2; (b) células de

hibridoma 1F5H2 γ -irradiadas, secretoras de mAb utilizado como controle de isotipo; e (c) RPMI-1640, utilizado como veículo para a administração intraperitoneal das células.

A diferença do número de nódulos tumorais entre o grupo tratado com mAb anti-FGF2 3F12E7 e os grupos controle é visualmente perceptível (**Fig. 18B**). Análise quantitativa revela um menor número tanto de nódulos grandes quanto de nódulos pequenos nos pulmões de animais tratados com anticorpo anti-FGF2 3F12E7, comparado com o observado nos grupos controle. Mais do que isso, os animais que receberam mAb anti-FGF2 3F12E7 não apresentaram qualquer nódulo tumoral grande na superfície pulmonar (**Fig. 18B e F**). Secções de pulmão coradas com HE (**Fig. 18C**) reiteram esse papel antitumoral do anticorpo aqui estudado, apontando para o menor número de focos no parênquima pulmonar nos animais inseridos no grupo de tratamento anti-FGF2.

Ensaio imunoenzimático com amostras de soro do dia 14 pós-implante de células B16-F10 confirmam para a presença de anticorpos anti-FGF2 e ligante de CEA na corrente sanguínea de animais que receberam células de hibridoma γ -irradiadas 3F12E7 e 1F5H2, respectivamente (**Fig. 18D e E**).

Se considerarmos que o anticorpo 3F12E7 inibe a disponibilidade de FGF2, esses dados apontam que o crescimento de focos metastáticos de melanoma B16-F10 no parênquima pulmonar é dependente da atividade desse fator de crescimento. Além disso, é bastante provável que o menor número de nódulos pulmonares de B16-F10 na vigência de tratamento com mAb 3F12E7 deva-se, ao menos em parte, ao potencial antiangiogênico desse anticorpo.

Figura 18. Anticorpo anti-FGF2 secretado por células de hibridoma 3F12E7 gama-irradiadas interfere no crescimento de nódulos pulmonares de melanoma. (Ver próxima página)

Figura 18. Anticorpo anti-FGF2 secretado por células de hibridoma 3F12E7 gama-irradiadas interfere no crescimento de nódulos pulmonares de melanoma. (A) Delineamento experimental. (B) Imagem macroscópica de pulmão de camundongo C57Bl/6 tratado com anti-FGF2 IgG ou com anticorpo irrelevante/salina, como controle. Pontos escuros indicam os nódulos tumorais. (C) Fotomicrografias representativas de secções de pulmão coradas com hematoxilina e eosina (HE). Tumores (indicados por setas) são facilmente identificados como um denso *cluster* de células no parênquima pulmonar. Aumento de 400 x. ELISA direto realizado em amostras do dia 14 confirmam a secreção de (D) anti-FGF2 IgG e de (E) anticorpo ligante de CEA *in vivo* pelas células de hibridoma irradiadas 3F12E7 e 1F5H2, respectivamente. OD_{490nm} corresponde à densidade óptica obtida por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 492 nm. Gráfico (F) mostra o número de nódulos tumorais no pulmão. Análise estatística realizada usando análise de variância (ANOVA) e diferenças consideradas significantes quando $p < 0,05$. Grupos: controle PBS, n=7; controle de isotipo 1F5H2, n=6; 3F12E7, n=7; * $p < 0,05$ comparado com os correspondentes grupos controle. A grosso modo, tumores pequenos foram definidos como < 1 mm de diâmetro maior, e tumores grandes como sendo aqueles com > 1 mm. Dados representativos de três experimentos independentes.

Análises de imuno-histoquímica revelam um menor número de vasos tumorais CD34⁺ nas secções de pulmão provenientes de animais do grupo tratado com mAb anti-FGF2 3F12E7 ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA), comparado com o observado nos grupos controle (salina e mAb 1F5H2) (**Fig. 19**). CD34, glicoproteína expressa na superfície de células endoteliais, é um marcador correntemente utilizado para aferir densidade microvascular em tumores, da mesma forma que CD31 (Uzzan B et al., 2004; Vieira SC et al., 2005). Os vasos capilares apresentaram-se irregularmente distribuídos, com paredes finas e ramificações, alguns com a luz mais dilatada, característico da vasculatura encontrada em tumores.

A diminuição da disponibilidade de FGF2, conhecido fator pró-angiogênico, no microambiente tumoral resulta em não ativação de vias *downstream* à sua estimulação associadas formação de novos vasos a partir dos pré-existentes. O possível menor aporte sanguíneo comprometeria o crescimento dos focos metastáticos, o que pode justificar a ausência de nódulos tumorais grandes nos animais do grupo tratado com mAb anti-FGF2.

De modo geral, esses resultados sugerem que abordagens com alvo em FGF2, um conhecido fator angiogênico, podem ser uma estratégia interessante a ser considerada para intervenção no crescimento não só de tumores primários como também de focos metastáticos de melanoma. Além disso, a resposta antitumoral obtida com mAb 3F12E7 aponta para o papel antiangiogênico desse anticorpo.

Figura 19. Anti-FGF2 3F12E7 IgG reduz a densidade microvascular em nódulos metastáticos B16-F10 no pulmão. (Legenda na próxima página)

Figura 19. Anticorpo anti-FGF2 3F12E7 reduz a densidade microvascular em nódulos metastáticos B16-F10 no pulmão. (Figura na página anterior)

Fotomicrografias representativas da densidade vascular, determinada por imunomarcacão com anticorpo anti-CD34, em nódulos de melanoma B16-F10 no parênquima pulmonar das secções do (A) grupo controle salina, (B) tratado com anticorpo controle de isotipo 1F5H2 e (C) tratado com anti-FGF2 3F12E7 IgG. Barra (A, B, C) = 30 μ m. (D) O número de vasos sanguíneos por secção foi contado. Gráfico mostra a distribuição da densidade microvascular CD34⁺ entre os grupos. * $p < 0,05$ comparado com os grupos controle; análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA).

PARTE II – RADIOMARCAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-FGF2 3F12E7 COM TECNÉCIO-99m PARA IMAGEM SPECT DE MELANOMA EXPERIMENTAL

Nos últimos anos, estratégias de imagem molecular não invasivas têm despertado interesse para diagnóstico de tumores sólidos (Leyton JV et al., 2009; Iyer AK et al., 2011; Kaur S et al., 2012). Em decorrência de sua alta especificidade e afinidade para antígenos cognatos, anticorpos são agentes a serem considerados para a localização e a caracterização do perfil molecular de tumores *in vivo* (Kaur S et al., 2012).

Neste trabalho, paralelamente aos estudos de potencial terapêutico (**RESULTADOS - PARTE I**), averiguamos a distribuição sistêmica e retenção do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 em tumores B16-F10, que apresentam expressão de FGF2 em seu microambiente (**Fig. 12C e 13**). Para isso, foram realizados estudos farmacocinéticos e de imagem SPECT/CT, com a molécula de anticorpo marcada com o emissor de fótons ^{99m}Tc . A estabilidade do produto e suas propriedades de ligação foram determinadas. Os resultados são apresentados a seguir em duas etapas:

A Parte II-A é dedicada à radiomarcação dos anticorpos monoclonais anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2 com ^{99m}Tc , via agente quelante bifuncional HYNIC, e posterior avaliação do rendimento da marcação, da pureza radioquímica e da estabilidade do produto radiomarcado.

Apresentamos também a constante de afinidade aparente do mAb 3F12E7 para o antígeno FGF2.

Na Parte II-B apresentamos a distribuição sistêmica do anticorpo ^{99m}Tc -marcado em animais portadores de tumor subcutâneo ou de nódulos metastático no parênquima pulmonar, através de imagens SPECT/CT *in vivo* e estudos de biodistribuição *ex vivo*.

PARTE II – A**RADIOMARCAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-FGF2 3F12E7 COM ^{99m}Tc , VIA AGENTE QUELANTE BIFUNCIONAL HYNIC**

As atividades desenvolvidas para alcançar um anticorpo monoclonal radiomarcado com o emissor de fótons gama ^{99m}Tc estão sistematizadas na **Fig. 20**. Os resultados, apresentados a seguir (itens **4.IIA.1 a 4.IIA.4**).

Figura 20. Roteiro de atividades para estudos *in vitro* de ^{99m}Tc -IgG. Anticorpos monoclonais anti-FGF2 3F12E7 e controle de isotipo ligante de CEA 1F5H2 foram marcados com ^{99m}Tc , via agente quelante bifuncional HYNIC. O produto radiomarcado foi avaliado por métodos cromatográficos quanto ao rendimento e à pureza radioquímica (pós-purificação por SEC-HPLC) previamente a estudos *in vitro* para aferição de estabilidade e K_d aparente do anticorpo marcado.

4.IIA.1. Conjugação de anticorpos com HYNIC

Uma das estratégias frequentemente empregadas no acoplamento de pequenas moléculas, como biotina, fluoróforos e agentes quelantes bifuncionais, a proteínas é o uso de ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), altamente reativos a aminas alifáticas (Mädler S et al., 2010).

Neste trabalho, empregamos como agente quelantes bifuncional succinimidil-6-hidrazinopiridina-3-carboxílico hidrocloreto (Suc-HYNIC), um éster de N-hidroxisuccinimida portador de grupo hidrazino (Camacho X et al., 2013). Abrams e colaboradores foram os primeiros a sintetizar e reportar o uso de Suc-HYNIC para radiomarcção de anticorpos com ^{99m}Tc (Abrams MJ et al., 1990). Desde então, esse quelante tem sido amplamente utilizado na bioconjugação de anticorpos, peptídeos, análogos de somatostatina, lipossomos e oligonucleotídeos antisense (Liu S, 2008).

Suc-HYNIC (**Fig. 21**) se liga a proteínas através de ataque nucleofílico de sua porção succinimidil a grupos amina da cadeia lateral de aminoácidos, resultando na formação de uma amida. Apesar dessa reação de acilação ocorrer particularmente em aminoácido lisina, também é observada em grupos hidroxila da cadeia lateral de resíduos de serina, treonina e tirosina (Mädler S et al., 2010; Kalkhof S et al., 2008).

Por reagir virtualmente com qualquer grupo amina em solução, a reação de conjugação de Suc-HYNIC aos anticorpos ocorreu na ausência de aminas primárias como Tris e glicina. Para isso, anti-FGF2 3F12E7 IgG e ligante de CEA 1F5H2 IgG foram dessalinizados em coluna de Sephadex[®] G-25 (PD-10; GE Healthcare, EUA), utilizando PBS pH 7,4 como fase móvel, previamente à conjugação.

Em decorrência da instabilidade de ésteres de NHS (estável por apenas 10 min em pH 8,6; Cuatrecasas P, et al., 1972; Kalkhof S et al., 2008), Suc-HYNIC foi ressuspendido imediatamente antes do início da reação. A complexação Suc-HYNIC-IgG foi conduzida em pH 9,0, dentro da faixa de pH ótimo (entre 8,0 e 9,5) para reações de acilação de aminas primárias, quando a maioria delas estão desprotonadas e livres para ataque nucleofílico (Zhang Q et al., 2007).

Reações de proteínas com agentes quelante bifuncionais seguem uma cinética de segunda ordem, motivo pelo qual é usualmente desejável que sejam utilizados reagentes o mais concentrado possível (Meares CF et al., 1984). Schwartz e colaboradores demonstraram, através de estudo com diferentes concentrações de anticorpos (variando de 4,6 a 37 mg/mL), que o aumento da concentração de IgG resulta em maior eficiência de conjugação com HYNIC (Schwartz DA et al., 1991). Buscando-se alcançar reações com alto nível de marcação, foram utilizados no presente estudo anticorpos anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5 na concentração de 10 mg/mL, concentrados conforme descrito no item 3.2 de **MATERIAIS E MÉTODOS**.

Figura 21. Diagrama esquemático da ligação de HYNIC a proteínas. HYNIC coordena-se ao elemento radiometálico $^{99m}\text{Tc(V)}$ através do átomo de nitrogênio de seu grupo hidrazino (Abrams MJ et al., 1990). Moléculas de tricina (ácido 3-hidroximetilaminoacético; indicadas por caixas em azul) são utilizadas como coligantes para completar a esfera de coordenação do radionuclídeo. Legenda: B, proteína. Adaptado de Liu S, 2008.

A conjugação Suc-HYNIC-IgG e, na sequência, a purificação do produto por cromatografia em coluna de Sephadex[®] G-25 resultaram na recuperação de aproximadamente 90% da massa inicial de anticorpo, conforme revelado por leitura espectrofotométrica de absorbância em 280 nm.

Espectrometria de massa MALDI TOF/TOF foi realizada com o propósito de monitorar a efetividade da conjugação de moléculas de HYNIC a moléculas do anticorpo, conforme descrito por Lu SX et al., 2005. Os valores das razões massa/carga (m/z) foram determinados utilizando como parâmetro o tempo que os íons levam para alcançar o detector do equipamento (Cotter RJ, 1992).

A relação m/z obtida para o anticorpo “frio” (não acoplado ao quelante) foi de 147117,8 ($M+H$)⁺, enquanto que para o anticorpo conjugado foi de 147657,7 ($M+H$)⁺, resultando em um número médio de 4 moléculas de HYNIC (MW=134 Da) por molécula de anticorpo (**Fig. 22**). Resultados similares foram obtidos para anticorpo utilizado como controle de isotipo (ligante de CEA 1F5H2 IgG): anticorpo “frio”, 149013,0 m/z ($M+H$)⁺; anticorpo conjugado, 149580,5 ($M+H$)⁺. Espectros foram coletados na faixa de 19980 a 181169 m/z .

Imunoglobulinas possuem tipicamente 90 resíduos de lisina, dos quais aproximadamente 30 são acessíveis a ataque nucleofílico (Smith GP, 2006) e, consequentemente, são possíveis sítios de ligação a HYNIC. Assumindo que a reação de conjugação ocorre randomicamente e que todas as aminas reagem independentemente, esperamos obter uma mistura heterogênea de moléculas HYNIC-IgG, com várias espécies moleculares contendo quantidades distintas do agente quelante.

Figura 22. Anticorpo anti-FGF2 3F12E7 é efetivamente conjugado com HYNIC. Espectro de massa MALDI-TOF/TOF representativo de anticorpo anti-FGF2 3F12E7 purificado (A) e HYNIC-conjugado (B). O pico observado para a razão massa:carga de 147417,76 corresponde ao íon monoprotonado $(M+H)^+$ do anticorpo 3F12E7 não conjugado. Em comparação, o pico $(M+H)^+$ para HYNIC-3F12E7 IgG foi de 148151,7 m/z. Esse dado sugere que a reação HYNIC-IgG resultou em um número médio de 5,5 moléculas de HYNIC por molécula de anticorpo, considerando o valor de $(M+H)^+$ e o peso molecular de HYNIC como sendo igual a 134 Da (ver **Fig. 21**).

Através da função de distribuição de Poisson $P(x)$:

—

(Equação 8; Meares CF et al, 1984)

onde μ = número médio de moléculas de HYNIC por molécula de anticorpo, determinado por MALDI-TOF/TOF, temos que a probabilidade de nenhuma molécula de anti-FGF2 3F12E7 IgG ter se conjugado é de 0,018.

A probabilidade das moléculas desse anticorpo possuírem três ou quatro moléculas de HYNIC é 0,40. Esse valor está dentro do reportado previamente (Abrams MJ et al., 1990; Schwartz DA et al., 1991), que aponta para uma média de três grupos HYNIC por molécula de IgG. Resultados similares foram observados por Camacho X e colaboradores: média de 4 moléculas de HYNIC por molécula de bevacizumabe (Camacho X et al., 2013).

Vale observar que intensidade de emissão radioativa, após marcação de HYNIC-IgG com radioisótopo, dependerá do número x de moléculas de HYNIC por anticorpo. Ou seja, moléculas de anticorpo ligadas a duas moléculas desse agente quelante podem emitir o dobro do sinal radioativo que as ligadas a apenas uma única molécula de HYNIC, considerando que o radionuclídeo ^{99m}Tc se coordene igualmente com todos os grupos hidrazino de HYNIC. A partir da equação:

— —

(Equação 9; Meares CF et al, 1984)

temos que 46% da intensidade de emissão radioativa é proveniente de anti-FGF2 3F12E7 IgG conjugado a quatro ou cinco moléculas de HYNIC. 18% é proveniente de moléculas de IgG com um único grupo HYNIC, enquanto os 45% restantes são provenientes de moléculas marcadas com quatro ou mais grupos quelantes. Resultados similares foram obtidos para o anticorpo ligante de CEA 1F5H2: 47% da emissão radioativa é proveniente de anticorpo marcado com três ou quatro moléculas de HYNIC.

4.IIA.2. Radiomarcagem de mAbs anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2

Os anticorpos (500 µg) foram marcados com 370 MBq (10 mCi) de ^{99m}Tc recém-eluído de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (IPEN, Brasil). Com o propósito de se obter alto rendimento e pureza radioquímica, em todas as marcações foram utilizados ^{99m}Tc com alta atividade específica, alcançada através do uso de eluatos de geradores eluídos 24 horas antes. Essa estratégia busca reduzir a coordenação do anticorpo com o isômero em detrimento da espécie . Alta quantidade de pode comprometer a eficiência de marcação, particularmente em formulações com pequena quantidade de cloreto estano, como a utilizada.

Entretanto, apesar desse cuidado, vale observar que ^{99m}Tc no eluato do gerador nunca é 100% puro, uma vez que 12% do ^{99}Mo decai diretamente para o isótopo de longa $T_{1/2}$ ^{99}Tc (Liu S, 2008) (**Fig. 5**).

A interação tecnécio-anticorpo ocorre através da coordenação desse elemento radiometálico com o grupo hidrazino de HYNIC, conforme proposto por Abrams e colaboradores (Abrams MJ et al., 1990; Schwartz DA et al., 1991; **Fig. 21**). Solução de cloreto estanoso foi utilizada para reduzir o estado de oxidação dos átomos de ^{99m}Tc . Essa estratégia torna-se necessária uma vez que grande parte do tecnécio eluído do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ apresenta-se no estado de oxidação +7 ($^{99m}\text{Tc}^{+7}$) (Zolle I, 2007), estável em solução aquosa (Eckelman WC, 2009), para o qual não dispomos de reações químicas efetivas para coordená-lo a moléculas (Liu S, 2008). SnCl_2 é o agente redutor mais comumente utilizado devido a sua rápida cinética de redução e baixa toxicidade (Alvarez J, 1975).

As reações foram conduzidas na presença de tricina como ligante intermediário, com o propósito de estabilizar ^{99m}Tc em baixo estado de oxidação [Tc(V)] e, assim, prevenir a hidrólise desse radionuclídeo em solução aquosa e a consequente formação de ^{99m}Tc coloidal (Liu S, 2008). Além disso, tricina atua também como coligante, para completar a esfera de coordenação de ^{99m}Tc e estabilizar o núcleo ^{99m}Tc -HYNIC. Isso porque o grupo HYNIC não pode, sozinho, satisfazer todos os sítios de ligação desse radionuclídeo (Edwards DS et al., 1999; Rennet HJ et al., 2000) (**Fig. 21**).

Após a radiomarcagem de anti-FGF2 3F12E7 IgG e ligante de CEA 1F5H2 IgG, é imperativo determinar a pureza radioquímica (%PRq) do produto, definida pelo percentual de atividade do radionuclídeo incorporado à molécula de anticorpo.

Impurezas radioquímicas são decorrentes tanto do processo de radiomarcagem, como também da decomposição de ^{99m}Tc -IgG em solução, devido a alterações de temperatura, pH ou na vigência de agentes oxidantes ou redutores. Ainda, a radiação proveniente de ^{99m}Tc pode provocar radiólise de moléculas de água, resultando na

produção de átomos de hidrogênio e de radicais hidroxila reativos que podem interferir na coordenação do átomo de ^{99m}Tc ao agente quelante HYNIC (Zolle I, 2007).

Alto índice de impurezas radioquímicas está associado a imagens de baixa qualidade, com alto ruído de fundo, bem como acarreta em aumento desnecessário da dose de radiação a ser administrada ao paciente ou, no caso de estudo experimental, ao camundongo (Zolle I, 2007; Liu S, 2008), motivo pelo qual devem ser evitadas.

Neste trabalho, a eficiência de marcação e a pureza radioquímica foram determinadas por cromatografia planar ascendente em fase sólida. As impurezas ocasionalmente detectadas nas preparações dos anticorpos são ^{99m}Tc -livre, ^{99m}Tc -tricina e as formas hidrolisadas, reduzidas, de ^{99m}Tc (^{99m}Tc coloidal). Essas espécies radioativas foram detectadas por três sistemas cromatográficos, apresentados na **Tabela 5 (MATERIAIS E MÉTODOS, item 3.19)**.

Em sistema composto por iTLC-SG pré-tratada com BSA e fase móvel de EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), há um arraste de ^{99m}Tc -HYNIC-IgG ao longo do suporte, resultando em R_f entre 0,8-1,0. Nos demais sistemas, a molécula de anticorpo radiomarcada permanece no ponto de aplicação da amostra ($R_f = 0,0$). ^{99m}Tc coloidal não migra em nenhum dos sistemas de cromatografia planar utilizados, permanecendo no início do suporte ($R_f = 0,0$). O oposto é observado para ^{99m}Tc -livre, que migra em direção à frente de corrida nesses sistemas cromatográficos.

O perfil representativo de separação cromatográfica de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG e de ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG nos três sistemas utilizados é apresentado nas **Fig. 23 e 24**, respectivamente. Esses gráficos foram construídos a partir da contagem da radioatividade nos suportes cromatográficos através de contador

de radiação gama tipo poço, conforme descrito em **MATERIAIS E MÉTODOS**, item **3.19**. A atividade de fundo foi subtraída de cada uma das contagens e os valores de CPM corrigidos plotados. Nota-se baixo percentual de impurezas nos produtos, com um rendimento da marcação dos anticorpos anti-FGF2 3F12E7 e ligante de CEA 1F5H2 de $93 \pm 2,9\%$ e $91 \pm 0,6\%$, respectivamente ($n=5$) (**Tabela 6**).

Tabela 6. Caracterização de ^{99m}Tc -HYNIC-IgG

Anticorpo	Rendimento de marcação (%)	Pureza radioquímica	K_d (nM)
^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG	$93 \pm 2,9$	$\geq 95\%$	$0,86 \pm 0,19$
^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG	$91 \pm 0,6$	$\geq 95\%$	N/A

Legenda: K_D , constante de equilíbrio de dissociação. Para valores liberados na forma de média $\pm$ desvio padrão, utilizou-se $n=5$. Legenda: N/A, não se aplica (parâmetro não calculado).

Comparado a outras técnicas, métodos de cromatografia planar preenchem a necessidade de análises rápidas, de fácil execução e de baixo custo. Esse método mostra-se adequado para avaliar a pureza radioquímica, uma vez que 100% da amostra aplicada permanecem na fase sólida, não havendo, assim, perda de radioatividade durante a análise.

O mesmo não ocorre em outros métodos, como HPLC. Em técnicas de cromatografia em coluna, os componentes são detectados indiretamente, após sua separação cromatográfica, o que permite uma eventual recuperação incompleta da

amostra. Uma vez que a determinação da pureza radioquímica depende da detecção de todos os constituintes do produto marcado com ^{99m}Tc , cálculos baseados apenas na área do pico eluído por HPLC podem superestimar o valor da pureza radioquímica.

Produto da hidrólise de reduzido, partículas de $^{99m}\text{Tc-Sn}$ coloidal apresentam tamanho na faixa de 10 nm a 1 μm (Saha GB, 2010). Janković e colaboradores demonstraram, por métodos de espectroscopia de correlação de fótons, que mais que 80% dessas partículas radioativas apresentam diâmetro de aproximadamente 910 nm (Janković D et al., 2008). Por ultrapassar o tamanho dos poros ($\sim 300 \text{ \AA}$) da coluna cromatográfica utilizada nas análises SEC-HPLC (Protein-Pak 300SW; Waters, EUA), é provável que essas estruturas coloidais permaneçam retidas na coluna e, assim, não seja possível detectá-las.

De fato, o cromatograma de $^{99m}\text{Tc-Sn}$ coloidal indica ausência de pico de eluição em coluna de exclusão por tamanho Protein-Pak 300SW em corrida cromatográfica de 30 min em tampão fosfato 0,1 M e taxa de fluxo de 1 mL/min, conforme observa-se na **Fig. 25**.

FIGURA 23. Perfil cromatográfico de ^{99m}Tc-HYNIC-3F12E7 IgG em sistemas de cromatografia planar. Três sistemas cromatográficos com as seguintes fases estacionária e móvel, respectivamente: (A) iTLC-SG / 0,9% (m/v) NaCl; (B) W1 / acetona; e (C) iTLC-SG pré-tratada em BSA / EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5). (D) Representação esquemática do suporte cromatográfico, indicando o sentido da corrida, da posição 1 (ponto de aplicação da amostra; R_f = 0) à 6 (R_f = 1). Legenda: CPM, contagens por minuto.

FIGURA 24. Perfil cromatográfico de ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 IgG em sistemas de cromatografia planar. Três sistemas cromatográficos com as seguintes fases estacionária e móvel, respectivamente: (A) iTLC-SG / 0,9% (m/v) NaCl; (B) W1 / acetona; e (C) iTLC-SG pré-tratada em BSA / EtOH: NH_4OH : H_2O (2:1:5). (D) Representação esquemática do suporte cromatográfico, indicando o sentido da corrida, da posição 1 (ponto de aplicação da amostra; $R_f = 0$) à 6 ($R_f = 1$). Legenda: CPM, contagens por minuto.

Figura 25. Perfil radiocromatográfico de $^{99m}\text{Tc-Sn}$ coloidal em SEC-HPLC. Solução de ^{99m}Tc coloidal foi resolvida por HPLC em uma coluna de gel filtração (Protein-Pak 300SW 7,5 mm x 30 mm, Waters) eluída com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0). Taxa de fluxo de 1 mL/min. Legenda: CPM, contagens por minuto. Solução de $^{99m}\text{Tc-Sn}$ coloidal foi preparada de forma semelhante à exposta no item **3.18** de **MATERIAIS E MÉTODOS**, com exceção do uso de anticorpo monoclonal e tricina (Zolle I, 2007).

Apesar disso, em decorrência de seu alto poder de resolução e da possibilidade de recuperação da amostra, métodos de HPLC são adequados para purificar $^{99m}\text{Tc-IgG}$ do produto marcado, bem como caracterizar o perfil de eluição dessa molécula proteica.

$^{99m}\text{Tc-HYNIC-anti-FGF2}$ 3F12E7 IgG e $^{99m}\text{Tc-HYNIC-ligante}$ de CEA 1F5H2 IgG tiveram seu perfil cromatográfico avaliado por SEC-HPLC. Resultados representativos são apresentados na **Fig. 26**. As análises foram conduzidas em modo isocrático, utilizando como fase móvel tampão fosfato 0,05 M pH 7,0, em taxa de fluxo de 1 mL/min. Utilizou-se coluna de gel-filtração Protein-Pak 300SW, composta por partículas de 10 μm e poros de 300 Å. A forma monomérica de anticorpos apresenta um diâmetro hidrodinâmico de ~11 nm (Paul M et al., 2013; Nobbmann U et al., 2007; Dolman C et al., 2002), o que torna essa coluna adequada para análise cromatográfica dos mAbs em estudo.

FIGURA 26. Perfil cromatográfico de ^{99m}Tc -HYNIC-IgG em SEC-HPLC. Amostras foram resolvidas por HPLC em uma coluna de gel filtração (Protein-Pak 300sw 7,5 mm x 30 mm, Waters) eluída com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) com taxa de fluxo de 1 mL/min. (A) Radiocromatograma representativo de ^{99m}Tc -tricina (contendo porção de ^{99m}Tc livre), ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (anticorpo irrelevante) no sistema utilizado. (B) Cromatograma UV em 280 nm de anticorpo radiomarcado com ^{99m}Tc . Legenda: CPM, contagens por minuto.

Em paralelo, foram aplicadas alíquotas (100 μCi) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina e de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anticorpo, para a determinação de seus respectivos tempos de retenção. Solução de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina foi preparada a partir da redução de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ com cloreto estanoso na presença de tricina, em solução pH neutro (Larsen SK et al., 1995). Tricina coordena-se a tecnécio reduzido.

Nota-se uma boa resolução do pico correspondente ao anticorpo radiomarcado ($t_r=8$ min) do obtido para as impurezas radioquímicas $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina ($t_r=11,8$ min) e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anticorpo ($t_r=12,8$ min). Não há sobreposição e eles são suficientemente distantes entre si para viabilizar o uso dessa técnica para purificar anticorpos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -marcados.

Uma análise cuidadosa sobre o perfil de eluição do anticorpo permite observar um pico de eluição característico de espécies de alto peso molecular ($t_r=6,8$ min; **Fig. 26**), o que sugere a presença de dímeros ou agregados de anticorpos no produto marcado.

Apesar de serem termodinamicamente estáveis, comparado a outras proteínas, os anticorpos monoclonais podem sofrer alterações estruturais quando expostos a uma variedade de condições de estresse físico ou químico (Zhang A et al., 2012). Relatos apontam para alterações tanto covalentes, como oxidação, deaminação, isomerização e hidrólise, como também não covalentes, tais como adsorção e agregação (Brych SR et al., 2010).

A formação de agregados, ou seja, densos agrupamentos de moléculas desnaturadas, solúveis ou não, é frequentemente associada à baixa reatividade de anticorpos, o que compromete a eficácia terapêutica e diagnóstica dessa molécula.

Tão importante quanto, os agregados de anticorpos apresentam potencial risco imunogênico, em termos de geração de resposta imune adaptativa ao produto terapêutico (Rosenberg AS, 2006). A formação de anticorpos que reconhecem esses agregados, mesmo sem neutralizar sua atividade através do reconhecimento do determinante linear crítico na interação ligante-receptor, afeta potencialmente a farmacocinética do produto, bem como pode mediar uma resposta anafilática (Telikepalli SN et al., 2014).

Esses agregados podem resultar de diversos tipos de estresse, como: (a) exposição a baixo pH, comum durante processos de purificação; (b) alterações de temperatura; (c) ciclos de congelamento e descongelamento; e (d) estresse mecânico (Brych SR et al., 2010). De fato, Zhang e colaboradores mostraram agregação de bevacizumabe depois de repetidos ciclos congelamento-descongelamento, cuja extensão foi influenciada pelo número de ciclos (Zhang A et al., 2012).

Estresse provocado por agitação também resulta na formação de agregados proteicos. Resultados de Brych SR e colaboradores sugerem que o aumento da interação de moléculas de anticorpo com a interface ar-líquido durante a agitação é determinante na formação de agregados (Brych SR et al., 2010). Agitação é frequente durante reações de conjugação de anticorpos a fluoróforos ou agentes quelantes, bem como durante transporte e centrifugação da amostra.

Dentro desse cenário, é importante monitorar o aspecto estrutural do anticorpo previamente à sua aplicação em abordagens diagnósticas ou terapêuticas. Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de exclusão de tamanho (SEC-HPLC) é uma metodologia frequentemente utilizada para determinar espécies heterogêneas em

tamanho na amostra, o que inclui a presença de agregados de anticorpos radiomarcados (Dolman C et al., 2002).

A análise dos cromatogramas SEC-HPLC dos anticorpos, através da integral da área sob cada um dos picos, revela uma média de $85,6 \pm 5,1\%$ ($n=3$) do anticorpo na forma monomérica, e os outros $14,4 \pm 5,1\%$ ($n=3$) na forma de espécies de maior peso molecular (> 150 kDa). Dímeros/agregados eluíram em 6,8 min e a forma monomérica do anticorpo em 8 min (**Fig. 26**).

A fração correspondente ao pico em 8 min foi coletada e utilizada para estudos de imagem e biodistribuição *in vivo*, bem como para a determinação da constante de afinidade de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG pelo seu alvo FGF2. Não foram observados no cromatograma UV componentes de tamanho inferior ao da molécula íntegra, indicando ausência de fragmentação do anticorpo após radiomarcagem, tanto para 1F5H2 IgG como 3F12E7 IgG (**Fig. 26**).

De modo geral, a radiomarcagem de anti-FGF2 3F12E7 IgG e de ligante de CEA 1F5H2 IgG com ^{99m}Tc resultou em rendimento superior a 90%. Após purificação por HPLC, obteve-se pureza radioquímica $\geq 95\%$ (avaliado por cromatografia planar; gráficos não apresentados). Para ambos os anticorpos, obteve-se atividade específica superior a 100 MBq/nmol (114,7 MBq/nmol para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG e 112,23 MBq/nmol para ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG) em todas as marcações.

Esses dados estão de acordo com o recomendado pela farmacopeia americana (FA), pela farmacopeia europeia (FE), segundo as quais a pureza radioquímica específica para cada radiofármaco deve ser superior a 90% (Braddock M., 2012). FA e

FE são compêndios de referência que apresentam as especificações de fármacos, assim como técnicas analíticas que devem ser utilizadas no controle de qualidade.

4.IIA.3. Constante de dissociação aparente do anticorpo ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7

Além da especificidade do anticorpo, a determinação da afinidade de interação antígeno-anticorpo é um parâmetro chave para prever a ligação dessa molécula em tecidos que expressam a proteína alvo. A mensuração da força de interação anticorpo-antígeno é particularmente importante em moléculas de anticorpo marcadas. Estudos mostram que modificações químicas de anticorpos por fluoróforos ou radioisótopos, tais como ^{125}I (Debbia M et al., 2004), FITC e RD1, podem resultar em constante de ligação na ordem de 10 a 100 vezes inferior à observada para o mesmo anticorpo em estado nativo, desprovido de conjugação (Siiman O et al., 2000). Essa redução na afinidade intrínseca do anticorpo, se extensa, pode comprometer sua aplicabilidade terapêutica, particularmente quando o propósito é detectar proteínas pouco expressas no tecido alvo.

A eficácia diagnóstica de anticorpos radiomarcados parece ser dependente da densidade do antígeno no tecido alvo e de seu valor de K_d . Enquanto em tecidos com alta densidade antigênica tanto anticorpos com alta afinidade, na faixa de nanomolar, quanto os de baixa afinidade, na faixa de micromolar, ligam-se efetivamente, em tecidos com baixa expressão do antígeno alvo, apenas anticorpos de alta afinidade apresentam uma força de interação entre o sítio de ligação Fab e o antígeno suficiente para reter a molécula no tecido (Zuckier LS et al., 2000).

A importância da afinidade dos anticorpos na obtenção de imagens *in vivo* vai além do reportado por Zuckier LS e colaboradores. Através de estudos biodistribucionais *ex vivo* de variantes de ^{125}I -scFv com diferentes constantes de dissociação para o mesmo epítipo (variando de 10^{-7} a 10^{-11}), Adams e colaboradores mostraram que afinidades superiores que 10^{-8} M são requeridas para se obter considerável retenção tumoral 24 h pós-inóculo (Adams GP et al., 1998; Adams GP et al., 2001), comparado com obtido para scFv irrelevante. A quantidade de ^{125}I -scFv retida no tumor foi proporcional ao aumento da afinidade até a faixa de 10^{-9} M, quando são alcançados os valores máximos de %ID/g de tumor. Moléculas com $K_d < 10^{-9}$ M não apresentam incremento significativo de retenção (Adams GP et al., 2001). Esse dado reitera à necessidade de se considerar a afinidade da interação antígeno-anticorpo previamente a estudos pré-clínicos ou clínicos.

No presente estudo, a afinidade aparente de ligação de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG à proteína alvo FGF2 foi determinada através de radioimunoensaio de ligação competitiva. Foram utilizados $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-IgG, purificados por HPLC (fração em $t_r = 8$ min), com pureza radioquímica superior a 95%. O valor de peso molecular dos anticorpos 3F12E7 utilizado para a conversão de μg para nmol/L foi obtido previamente por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (**Fig. 22**).

Conforme se observa na **Fig. 27**, a ligação específica de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-3F12E7 IgG a FGF2 é dose-dependente e saturável. A constante de dissociação (K_d) aparente no equilíbrio foi determinada por regressão não linear [$Y = B_{\text{max}} \times X / (K_d + X)$], em software GraphPad Prism.

O valor médio aparente de K_d foi de $8,6 \pm 1,9 \times 10^{-10}$ M ($n=3$) a 25 °C, em condições *in vitro*. Esse dado é consistente com o reportado na literatura para anticorpos

monoclonais de alta afinidade – valor de K_d geralmente na faixa de nanomolar e ocasionalmente de sub-nanomolar (Rathanaswami P et al., 2005). A curva de saturação foi gerada em software GraphPad Prism, versão 5,0 (GraphPad Prism, EUA), conforme o proposto no *web-site* <http://www.graphpad.com/faq/file/P4-Binding%20analysis.pdf>. Vale observar que, uma vez que as moléculas de anticorpo não são uniformemente radiomarcadas, o K_d aparente calculado é representativo da média de afinidade das moléculas ^{99m}Tc -HYNIC-3F12E7 IgG.

Figura 27. Curva de ligação específica de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em função do aumento da concentração desse anticorpo radiomarcado. Gráfico representativo de três experimentos independentes. O valor médio aparente do K_d de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG foi determinado como sendo $0,84 \pm 0,19$ nM.

4.IIA.4. Estabilidade *in vitro* de mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2

Previamente a estudos farmacocinéticos em modelos animais, é crucial determinar a estabilidade de complexos de ^{99m}Tc *in vitro* em condições que simulam o ambiente biológico (Hnatowich DJ et al., 1994). Neste trabalho, avaliamos a estabilidade dos anticorpos ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 (utilizado como controle de isotipo) em solução NaCl 0,9%, utilizada como veículo para a administração via veia caudal dos mAbs, bem como em solução contendo soro normal de camundongo.

Paralelamente, foram conduzidos ensaios de desafio à cisteína, um tiol endógeno presente em altas concentrações *in vivo* (Hnatowich DJ et al., 1993; Hnatowich DJ et al., 1994). Acredita-se que a transquelação de ^{99m}Tc para cisteína, esteja entre as principais formas de instabilidade *in vivo* de anticorpos ^{99m}Tc -marcados (Hnatowich DJ et al., 1994). Hnatowich DJ e colaboradores mostraram, por métodos radiocromatográficos, que ^{99m}Tc -cisteína é a espécie radiomarcada mais frequentemente encontrada na urina de animais que receberam anticorpos radiomarcados tanto por via direta, como indireta através do uso de agentes quelantes bifuncionais (Hnatowich DJ et al., 1993).

As análises foram realizadas por cromatografia planar ascendente, conforme descrito em **MATERIAIS E MÉTODOS** (item 3.19). De forma análoga à ^{99m}Tc -tricina, todas as formas conhecidas de ^{99m}Tc -cisteína permanecem próximas ao ponto de origem no sistema Whatman 1 MM (W1) / acetona ($R_f=0,0$) e migram com a frente de corrida ($R_f \sim 1,0$) nos sistemas iTLC-SG / 0,9% NaCl (m/v) e iTLC-SG impregnada com

BSA / EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5) (Hnatowich DJ et al., 1994). Os resultados são apresentados graficamente na **Fig. 28**.

Figura 28. Estabilidade radioquímica de mAb ^{99m}Tc-marcados. Estabilidade de (A) ^{99m}Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG1 e de (B) ^{99m}Tc-HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG1 em solução 0,9% NaCl a 25 °C e 37 °C bem como a 37 °C na presença de soro normal de camundongo e de 1 mM L-Cys.

Anticorpos ^{99m}Tc-marcados mostraram-se estáveis com soro normal de camundongo a 37 °C. Quando incubados em salina a temperatura ambiente, os níveis médios de pureza radioquímica obtidos ao final de 24 h foram ~75% para ^{99m}Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG1 (**Fig. 28A**) e 70% para ^{99m}Tc-HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG1 (**Fig. 28B**), o que está dentro do apresentado pela literatura (Malviya G et al., 2009; Camacho X et al., 2013). Entretanto, cerca de 35% dos complexos ^{99m}Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG1 (**Fig. 28A**) e ^{99m}Tc-HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG1 (**Fig. 28B**) mostraram-se instáveis em 24 h de desafio a L-Cys, utilizando-se proporção L-Cys:^{99m}Tc-IgG de 150:1.

PARTE II – B**IMAGEM SPECT/CT DE MELANOMA EXPERIMENTAL B16-F10 COM ANTICORPO ANTI-FGF2 ^{99m}Tc -MARCADO**

As atividades desenvolvidas para avaliarmos a distribuição corpórea do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 (e de seu controle de isotipo 1F5H2) ^{99m}Tc -marcados, com ênfase em sua captação por tumores B16-F10 estão sistematizadas na **Fig. 29**. Os resultados, apresentados a seguir (itens **4.II.1** a **4.II.3**).

Figura 29. Roteiro de atividades para estudo da distribuição corpórea de ^{99m}Tc -IgG. Anticorpos monoclonais anti-FGF2 3F12E7 e controle de isotipo ligante de CEA 1F5H2 radiomarcados com ^{99m}Tc foram administrados em camundongos C57Bl/6, via veia caudal, para aquisição de imagens SPECT/CT e estudos de biodistribuição *ex vivo*. Estudos realizados com anticorpos ^{99m}Tc -marcados com pureza radioquímica (%PRq) superior ou igual a 90%.

4.IIB.1. Estudo de biodistribuição de mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 em camundongos portadores de melanoma subcutâneo B16-F10

O conhecimento da taxa de retenção de anticorpos em tecido tumoral, alcançado através de estudos farmacocinéticos *ex vivo*, é crucial para predizer seu possível efeito terapêutico bem como sua aplicabilidade diagnóstica. Os resultados de biodistribuição *ex vivo*, em animais C57Bl/6 portadores ou não de tumor subcutâneo B16-F10, são sumarizados nas **Tabelas 7 e 8**.

Camundongos C57Bl/6, portadores ou não de tumor subcutâneo, receberam via veia caudal uma única dose em *bolus* de 1,85 MBq de anticorpo radiomarcado, diluído em 100 μL de solução NaCl 0,9% estéril. Foram utilizados anticorpos radiomarcado com pureza radioquímica superior a 90%, como mencionado anteriormente (**RESULTADOS – PARTE II-A**). Esse cuidado é importante uma vez que impurezas radioquímicas como $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ^{99m}Tc coloidal podem comprometer a qualidade dos resultados obtidos (Zolle I., 2007).

Apesar de sua rápida depuração plasmática (50-60% eliminado nos primeiros 15 minutos), pertecnetato apresenta meia-vida biológica de aproximadamente 53 h. Sua eliminação sistêmica ocorre predominantemente por via urinária, nas primeiras 24 h, seguido por considerada excreção fecal 48 a 72 h pós-administração. Interessante, cerca de 40% de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ injetado permanece retido no organismo, principalmente no trato digestório (Zolle I., 2007).

Produto da hidrólise de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ reduzido, ^{99m}Tc coloidal distribui-se pelo organismo de acordo com a função fagocítica do sistema retículo-endotelial. Cerca de 80-90% concentra-se no fígado, permanecendo o restante principalmente no baço e na medula óssea. Possui uma meia-vida efetiva de 85 dias no fígado (Zolle I., 2007; Atkins HL et al., 1968).

Os valores médios de atividade específica dos anticorpos utilizados foram: 114,7 MBq/nmol para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG e 112,23 MBq/nmol para ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (**RESULTADOS – PARTE IIA**).

IgGs classicamente exibem longa meia-vida plasmática (~3 semanas para a maioria das subclasses de anticorpos humanos; Levêque D et al., 2005), o que é atribuído, ao menos em parte, a interações pH-dependentes com receptores Fc neonatos (FcRn; Roopenian DC et al., 2007; Levêque D et al., 2005). De fato, como reflexo de sua baixa depuração sanguínea, observa-se que os valores de %ID/g no sangue para mAb anti-FGF2 3F12E7 e para o correspondente controle de isotipo 1F5H2 radiomarcados foram, respectivamente: $30,55 \pm 1,50$ vs $28,91 \pm 0,59$, no tempo de 4 h; e $20,00 \pm 0,39$ vs $22,04 \pm 2,90$, no tempo de 24 h (dados obtidos em animais portadores de tumor; **Tabelas 7 e 8**).

Ao final do período de 24 h, pouco menos de 10% do total de radiação administrado foi eliminado por via urinária – valores de %ID/g para anti-FGF2 3F12E7 e controle de isotipo 1F2H2 ^{99m}Tc -marcados foram respectivamente $7,12 \pm 0,78$ e $9,76 \pm 1,39$, em animais portadores de tumor subcutâneo B16-F10 (**Tabela 8**).

A excreção renal de anticorpos é pouco documentada. Sugere-se que a expressão de FcRn em células epiteliais do túbulo renal proximal estejam envolvidas na

transferência de IgG para a urina por transcitose, com demonstrações *in vitro* do transporte bidirecional de anticorpos em células renais humanas (Kobayashi N et al., 2002). Produtos da degradação de IgG também podem ser depurados por essa via.

Além disso, radioisótopo ^{99m}Tc não conjugado ao anticorpo, reflexo de sua transquelação com outras moléculas plasmáticas ou simplesmente decorrente da instabilidade de sua coordenação com o agente quelante HYNIC, pode contribuir com os níveis de radioatividade detectados na urina (Hnatowich DJ et al., 1994; Levêque D et al., 2005). Apesar dos estudos *in vitro* mostrarem boa estabilidade radioquímica de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (controle de isotipo) em contato com soro normal de camundongo a 37 °C, quando submetidos a desafio à cisteína o percentual de moléculas ^{99m}Tc -IgG ficou restrito a cerca de 70%, conforme relatado anteriormente (**RESULTADOS – PARTE IIA**). Essa baixa estabilidade frente à incubação com cisteína não reflete os resultados de eliminação de atividade por via urinária obtidos *in vivo*.

Essa eliminação urinária está associada à significativa redução nos níveis de radioatividade detectados nos rins – valores de %ID/g nos tempos 4 h e 24 h, em animais portadores de tumor, foram respectivamente $13,42 \pm 0,57$ vs $8,75 \pm 0,26$ ($P < 0,05$), para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG; $11,94 \pm 0,88$ vs $7,62 \pm 0,11$ ($P < 0,05$), para ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (controle de isotipo). Redução similar foi obtida em animais desprovidos de tumor (**Tabelas 7 e 8**).

Por outro lado, o aumento de radioatividade detectada no intestino entre 4 h e 24 h pós-inóculo do anticorpo radiomarcado sugere que parte desse produto é depurada por via hepatobiliar. Os valores de %ID/g no intestino (incluindo fezes) nos tempos 4 h e 24 h foram, respectivamente: $4,44 \pm 0,26$ vs $6,24 \pm 0,83$ ($p < 0,05$) para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-

FGF2 3F12E7 IgG; $5,24 \pm 0,32$ vs $8,93 \pm 0,32$ ($p < 0,05$) para ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (controle de isotipo) (**Tabelas 7 e 8**).

Fígado atua como um grande sítio catabólico de imunoglobulinas, onde são expressos diversos receptores que participam do processo de depuração (Wright A et al., 2000). Ainda, esse tecido possui importante concentração de células que expressam receptores Fc, o que contribui para a retenção de anticorpos íntegros (Wright A et al., 2000). De fato, os elevados valores de radioatividade por grama detectados no fígado reforçam a provável participação desse órgão na depuração de IgGs – $17,67 \pm 1,14$ %ID/g, em 4 h vs $16,75 \pm 0,53$ %ID/g, em 24 h, para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG; $15,00 \pm 0,97$ %ID/g, em 4 h vs $14,65 \pm 0,26$ %ID/g, em 24 h, para ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (dados obtidos em animais portadores de tumor) (**Tabelas 7 e 8**).

Além do fígado, a análise dos dados de biodistribuição revela importante retenção de anticorpo radiomarcado no baço – os valores de %ID/g para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG foram de $14,74 \pm 0,61$, no tempo de 4h; $17,58 \pm 0,79$, no tempo de 24 h. Para o anticorpo controle de isotipo ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2, obteve-se: $10,74 \pm 0,35$ %ID/g, no tempo de 4h; $14,87 \pm 2,82$ %ID/g, no tempo de 24 h (dados obtidos em animais portadores de tumor) (**Tabelas 7 e 8**). Esse resultado é o provável reflexo do elevado número de células portadoras de receptores Fc presente nesse tecido, bem como de macrófagos que expressam receptores de manose, os quais participam do processo catalítico de imunoglobulinas (Wright A et al., 2000).

É interessante observar que os valores de %ID/g nos rins de animais, portadores ou não de tumor, que receberam ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG é superior aos encontrados em animais injetados com anticorpo controle de isotipo ^{99m}Tc -HYNIC-

1F5H2 (**Tabelas 7 e 8**). Essa maior retenção é o provável reflexo da presença de FGF2 nesse tecido, tomando como base trabalho anterior que demonstrou a expressão desse fator de crescimento em rins normais e patológicos (Strutz F et al., 2000). Assim, é provável que o percentual de radioatividade observado nos rins de animais que receberam mAb anti-FGF2 3F12E7 radiomarcado deve-se não apenas à depuração de $^{99m}\text{Tc-IgG}$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$, mas também ao reconhecimento de FGF2 expresso por esse tecido.

Resultado semelhante é observado no baço, no coração e nos pulmões (**Tabelas 7 e 8**) – os valores de %ID/g revelam-se, tanto no tempo 4 h quanto 24 h, superiores para os animais que receberam $^{99m}\text{Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG}$, comparado com o obtido em animais injetados com $^{99m}\text{Tc-HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG}$ (controle de isotipo).

Os altos níveis de radioatividade detectados no pulmão são em parte decorrentes da elevada radioatividade presente no sangue, uma vez que esse órgão é altamente vascularizado (Kumar SR et al., 2007). A dificuldade em coletar o tecido pulmonar sem a completa remoção de sangue também contribui para os valores de %ID/g alcançados.

Oteve-se importante captação tumoral do anticorpo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7}$: $10,85 \pm 0,18$ %ID/g em 4 h e $18,01 \pm 1,32$ %ID/g em 24 h pós-inóculo dessa molécula radiomarcada. Entretanto, esse dado é acompanhado por captação inespecífica do anticorpo utilizado como controle de isotipo ($^{99m}\text{Tc-HYNIC-ligante de CEA 1F5H2}$): $8,30 \pm 4,77$ %ID/g em 4 h e $7,20 \pm 2,31$ %ID/g em 24 h pós-inóculo. Vale lembrar aqui que o anticorpo 1F5H2 não reconhece bandas específicas em lisados de proteínas totais de tumor B16-F10 em ensaio de *western blotting* (**Fig. 12C**).

Isso sugere que ao menos uma parcela da captação tumoral observada para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG não é decorrente de ligação mediada pela interação FGF2-anticorpo, mas sim decorrente da ligação das moléculas de anticorpo a receptores Fc (Fcγ R) ou até mesmo da retenção inespecífica dessa molécula de alto peso molecular no interstício tumoral (Maeda H et al., 2000).

Macromoléculas circulantes na corrente sanguínea, como albumina, transferrina e imunoglobulinas, acumulam-se progressivamente em tumores sólidos através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*; EPR; Maeda et al., 2000), primeiramente demonstrado na década de 1980 por Matsumura Y e Maeda H (Matsumura Y et al., 1986).

Em estudo de biodistribuição com potenciais agentes antineoplásicos, Matsumura Y e Maeda H observaram considerável retenção tumoral de macromoléculas. A retenção tumoral de ^{51}Cr -neocarzinostatina, uma proteína de 12 kDa, no tempo de 24 h pós inóculo endovenoso foi de 0,82 %ID/g enquanto que o percentual obtido para ^{51}Cr -IgG inespecífica de camundongo foi de 7,98, também em 24 h. Os valores de %ID/g no tumor para ^{51}Cr -IgG permaneceram altos por ao menos 72 h: 5,65%, no tempo 48 h; 6,56%, 72 h. Dados semelhantes foram observados para albumina sérica bovina, proteína de ~67 kDa: 6,85% em 24 h, 6,95% em 48 h, 7,22% em 72 h (Matsumura Y et al., 1986). Esses valores apresentados para ^{51}Cr -IgG inespecífica são semelhantes aos que nós obtivemos com o anticorpo utilizado como controle de isotipo ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 (**Tabela 8**) no tempo 24 h pós-inóculo.

Trabalho recente de Suemizu H e colaboradores também aponta a existência desse fenômeno. Através da conjugação de anticorpos com fluoróforo emissor em comprimento de onda próximo ao infravermelho (do inglês *near-infrared*; NIR), eles

mostraram em estudos *in vivo* notável retenção de anticorpo inespecífico no tumor, em nível semelhante ao obtido para anticorpo direcionado a antígeno expresso nesse tecido. Esse achado manteve-se restrito a macromoléculas, não havendo retenção tumoral de NIR-glicina e de fluoróforo NIR não-conjugado (Suemizu H et al., 2013).

O efeito EPR é um fenômeno decorrente da arquitetura vascular irregular encontrada em tumores. A ausência de cobertura pericítica, bem como a presença de fenestrações e aberturas entre as células endoteliais favorecem a entrada de macromoléculas (>40 kDa; Maeda H et al., 2009) ao interstício. Essa elevada permeabilidade vascular, associada à escassa drenagem linfática e baixo retorno venoso resulta na retenção tumoral dessas moléculas (Matsumura Y et al., 1986; Maeda H et al., 2009). O fraco desenvolvimento de vasos linfáticos no tecido tumoral já havia sido previamente demonstrado por meio do uso do agente linfográfico lipiodol, recuperado via sistema linfático em decorrência de sua natureza lipofílica (Iwai K et al., 1984).

Assim, esses resultados diferem do comumente observado em processos inflamatórios de tecidos não neoplásicos, providos de vasculatura normal (Maeda H et al., 2009). Macromoléculas presentes no espaço intersticial de lesões em tecidos normais, providos de sistema linfático funcional, são removidas mais rapidamente que em tumores, onde a escassa drenagem linfática e ao baixo retorno venoso contribuem para a retenção de macromoléculas no espaço intersticial (Maeda H et al., 2000).

De fato, estudos SPECT/CT em modelo de cicatrização tecidual mostram, já no tempo 4 h pós-inóculo, retenção de anticorpo inespecífico 1F5H2 ^{99m}Tc-marcado significativamente inferior à alcançada com ^{99m}Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG (ver **ANEXO III**).

O efeito EPR tem sido observado em vários tumores experimentais e humanos, o que inclui melanoma B16 (Noguchi Y et al., 1998; Maeda H et al., 2009). Coletivamente, essas informações suportam a ideia de que o efeito EPR, causado pela vasculatura anormal e baixa drenagem linfática em tumores, é o mecanismo por trás da captação inespecífica observada para o anticorpo irrelevante 1F5H2 (Suemizu H et al., 2013), juntamente com a interação dessas moléculas com receptores Fc.

Retornando aos dados de biodistribuição, observa-se, como esperado, que a atividade detectada no músculo é significativamente inferior à encontrada no tumor (**Tabelas 7 e 8**). Valores médios de razão (%ID/g tumor)/(%ID/g músculo esquelético) nos tempos 4 e 24 h, respectivamente, foram: 17,34% vs 16,69% para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7; 12,39% vs 4,65% para ^{99m}Tc -HYNIC-controle de isotipo 1F5H2 (**Fig. 30**).

No grupo de bloqueio com anticorpo não radioarmado em animais portadores de tumor, a captação do anticorpo ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 distribuiu-se mais no estômago e menos no baço, rins, osso e tumor, no tempo 4 h pós-inóculo, comparado com o obtido em animais que não receberam previamente anticorpo anti-FGF2 3F12E7 não radiomarcado. No tempo 24 h, detectou-se maiores valores de %ID/g no estômago e nos rins e menores no osso e tumor (**Tabelas 7 e 8**).

Tabela 7. Estudo farmacocinético de ^{99m}Tc -HYNIC- IgG em camundongos C57Bl/6 portadores ou não de tumor subcutâneo B16-F10 4 h pós-inóculo. N=3/grupo.

Tecido	animais sem tumor		animais com tumor sc B16-F10		
	^{99m}Tc -anti-FGF2 IgG	^{99m}Tc -IgG (ctrl isotipo)	^{99m}Tc -anti-FGF2 IgG	^{99m}Tc -anti-FGF2 IgG + bloq	^{99m}Tc -IgG (ctrl isotipo)
%ID/g					
sangue	29,16 ± 1,07	29,90 ± 6,61	30,55 ± 1,50	33,57 ± 0,15	28,91 ± 0,59
coração	10,31 ± 0,97	6,12 ± 0,28	12,28 ± 2,54	12,79 ± 0,54	11,42 ± 3,99
pulmão	12,68 ± 0,50	11,25 ± 0,73	14,32 ± 1,74	15,81 ± 0,56	13,77 ± 2,08
rins	13,42 ± 0,45	11,45 ± 1,09	13,42 ± 0,57	12,05 ± 0,11	11,94 ± 0,88
estômago	3,46 ± 0,23	5,67 ± 0,30	3,59 ± 0,18	5,42 ± 0,51	9,41 ± 0,45
baço	9,52 ± 0,57	7,22 ± 0,70	14,74 ± 0,61	10,48 ± 0,45	10,74 ± 0,35
fígado	20,24 ± 0,65	23,65 ± 1,30	17,67 ± 1,14	17,21 ± 0,64	15,00 ± 0,97
intestino com fezes	4,14 ± 0,33	4,05 ± 0,07	4,44 ± 0,26	4,89 ± 0,55	5,24 ± 0,32
osso	4,51 ± 0,45	3,93 ± 0,38	6,03 ± 0,59	4,61 ± 0,28	4,29 ± 0,14
músculo	0,73 ± 0,10	0,46 ± 0,00	0,65 ± 0,01	0,65 ± 0,10	0,67 ± 0,09
tumor	N/A	N/A	10,85 ± 0,18	7,79 ± 0,02	8,30 ± 4,77
%ID					
bexiga + urina	5,64 ± 0,59	3,82 ± 0,31	3,70 ± 0,25	3,03 ± 0,22	3,65 ± 1,74

Dados apresentados na forma de %ID/g (ou %ID) ± desvio padrão (DP). Legenda: bloq, bloqueio com administração de anti-FGF2 3F12E7 IgG 1 h antes do inóculo do equivalente anticorpo radiomarcado; sc, subcutâneo; N/A, não se aplica; ctrl, controle.

Tabela 8. Estudo farmacocinético de ^{99m}Tc -HYNIC-IgG em camundongos C57Bl/6 portadores ou não de tumor subcutâneo B16-F10 24 h pós-inóculo. N=3/grupo.

Tecido	animais sem tumor		animais com tumor sc B16-F10		
	^{99m}Tc -anti-FGF2 IgG	^{99m}Tc -IgG (ctrl isotipo)	^{99m}Tc -anti-FGF2 IgG	^{99m}Tc -anti-FGF2 IgG + bloq	^{99m}Tc -IgG (ctrl isotipo)
%ID/g					
sangue	22,33 ± 3,17	20,94 ± 2,70	20,00 ± 0,39	21,33 ± 0,46	22,04 ± 2,90
coração	8,93 ± 1,74	5,19 ± 1,21	7,78 ± 0,14	8,78 ± 0,7	6,61 ± 0,94
pulmão	16,40 ± 1,45	2,82 ± 0,67	11,57 ± 0,60	12,49 ± 1,37	16,47 ± 1,97
rins	11,01 ± 2,12	8,97 ± 1,21	8,75 ± 0,26	9,78 ± 0,69	7,62 ± 0,11
estômago	4,11 ± 0,82	3,03 ± 1,01	4,67 ± 0,05	6,28 ± 0,34	9,34 ± 1,77
baço	13,17 ± 2,33	9,98 ± 1,78	17,58 ± 0,79	17,51 ± 0,50	14,87 ± 2,82
fígado	24,07 ± 5,01	14,05 ± 0,12	16,75 ± 0,53	18,83 ± 0,02	14,65 ± 0,26
intestino com fezes	5,17 ± 0,83	4,98 ± 2,05	6,24 ± 0,83	7,79 ± 0,37	8,93 ± 0,35
osso	5,36 ± 0,39	4,31 ± 0,29	7,21 ± 0,21	6,30 ± 0,23	5,11 ± 0,78
músculo	1,85 ± 0,80	0,99 ± 0,04	1,35 ± 0,07	1,32 ± 0,16	1,55 ± 0,12
tumor	N/A	N/A	18,01 ± 1,32	11,02 ± 6,89	7,20 ± 2,31
%ID					
bexiga + urina	7,42 ± 3,2	12,93 ± 1,53	7,12 ± 0,78	7,56 ± 1,1	9,76 ± 1,39

Dados apresentados na forma de %ID/g (ou %ID) ± desvio padrão (DP). Legenda: bloq, bloqueio com administração de anti-FGF2 3F12E7 IgG 1 h antes do inóculo do equivalente anticorpo radiomarcado; sc, subcutâneo; N/A, não se aplica; ctrl, controle.

Figura 30. Captação de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em tumor B16-F10 de camundongos C57Bl/6 avaliada em ensaios de biodistribuição *ex vivo*. Gráfico apresenta as razões (%ID/g tumor)/(%ID/g músculo esquelético) obtidas por biodistribuição *ex vivo* em animais sacrificados nos tempos 4 h e 24 h pós-inóculo. Os animais receberam via veia caudal 37 MBq (50 μg) de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou ^{99m}Tc -HYNIC-ligante CEA IgG (controle de isotipo). N=3/grupo. Barra de erros representa desvio padrão. * $p<0,05$, comparado com grupo ^{99m}Tc -1F5H2 IgG.

4.IIB.2. Imagem SPECT/CT de mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 em camundongos portadores de melanoma subcutâneo B16-F10

Camundongos C57Bl/6, portadores ou não de tumor subcutâneo, receberam via veia caudal uma única dose em *bolus* de 37 MBq de anticorpo radiomarcado (50 µg em 100 µL de solução NaCl 0,9% estéril). De forma análoga aos estudos de biodistribuição, cujos resultados foram apresentados anteriormente (**item 4.IIB.2**), foi utilizada a fração correspondente ao pico em SEC-HPLC de $t_r=8$ min dos anticorpos radiomarcados com pureza radioquímica superior a 90%.

Dados SPECT foram adquiridos em plataforma TriumphTM (Gamma Medical Ideas, EUA), utilizando uma janela energética de 20% centralizada no pico de energia específico para o radionuclídeo ^{99m}Tc (140,5 keV). Todas as imagens SPECT foram ajustadas para o mesmo valor máximo de intensidade de captação, possibilitando a comparação das imagens obtidas entre animais injetados com ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG e com o correspondente anticorpo controle de isotipo 1F5H2 radiomarcado. Imagens SPECT e CT foram co-registradas em software PMODTM (PMOD Technologies Ltd., Suíça). O plano experimental encontra-se na **Fig. 31**.

As imagens renderizadas do volume tridimensional SPECT/CT (perspectiva coronal; de corpo inteiro) obtidas no ponto de tempo 4 h revelam, para ambos mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-controle de isotipo 1F5H2, notável radioatividade no fígado e em outras estruturas com alto conteúdo sanguíneo, como é o caso da artéria coronária comum e do coração (**Fig. 32**). Esses achados corroboram aqueles obtidos por biodistribuição – valores de %ID/g em 4 h para mAbs

radiomarcados 3F12E7 e 1F5H2, respectivamente: $30,5 \pm 1,5$ vs $28,9 \pm 0,6$ no sangue; $17,7 \pm 1,1$ vs $15,0 \pm 1,0$ no fígado; $12,3 \pm 2,5$ vs $11,42 \pm 4,0$ no coração (**Tabela 7**).

Apesar da baixa taxa de depuração sanguínea dos anticorpos, tumores subcutâneos B16-F10, localizados no quadrante abdominal inferior direito dos animais injetados com mAb anti-FGF2 3F12E7 ^{99m}Tc -marcado, demonstram claro acúmulo de radioatividade nos tempos 4 e 24 h pós-inóculo (**Fig. 32, 33 e 34**). Esse dado é acompanhado por captação inespecífica do anticorpo utilizado como controle de isotipo (^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2), também antecipado pelos estudos de biodistribuição *ex vivo* (**Tabelas 7 e 8**).

Análise das imagens SPECT no tumor revela um padrão de captação heterogêneo tanto para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG como também para o anticorpo controle de isotipo ^{99m}Tc -HYNIC- 1F5H2 (**Fig. 32, 33 e 34**). Esse sinal não uniforme é o provável resultado de múltiplos fatores, o que inclui suprimento sanguíneo anormal, diferenças de pressão entre os capilares que irrigam o tumor e o fluído intersticial (Wu J et al., 1998; Levêque D et al., 2005), bem como afinidade de ligação anticorpo-proteína alvo e ligação não específica (Eckelman WC et al., 2006).

A distribuição não uniforme de macromoléculas em tumores é consistente com o efeito EPR, conforme relatado previamente em estudo experimental. Wu J e colaboradores observaram que a captação tumoral do corante azul de Evans conjugado à albumina, quando injetado via veia caudal, segue um padrão irregular, restrito à periferia do tumor. Tumores sólidos (>10 mm de diâmetro) frequentemente apresentam região central necrótica e avascular, contribuindo para esse cenário (Wu J et al., 1998).

De forma análoga ao obtido por Suemizu H e colaboradores (Suemizu H et al., 2013), o sinal de radioatividade retido no tumor de animais injetados com ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG é muito próximo ao observado naqueles que receberam ^{99m}Tc -HYNIC-controle de isotipo 1F5H2. Entretanto, a determinação dos valores da razão $(\overline{\text{CPP}}_{\text{ROI tumor}})/(\overline{\text{CPP}}_{\text{ROI região contralateral}})$ em ROI desenhada sobre área tumoral permite observar nível de captação superior naqueles que receberam o agente anti-FGF2 (**Fig. 35**; $p < 0,05$ comparado com o grupo controle de isotipo). ROI foi desenhada sobre área tumoral no plano coronal de imagem SPECT, utilizando imagem CT como referência anatômica.

Do ponto de vista terapêutico, essa heterogeneidade na captação tumoral do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 chama atenção para o fato de algumas áreas do tecido tumoral não terem contato com esse agente antiangiogênico, o que resultaria em uma inibição deficitária do fator de crescimento em questão. Esse aspecto é particularmente crítico em tumores cuja expressão de FGF2 concentra-se em áreas de baixa perfusão e, conseqüentemente, de baixo acesso ao agente terapêutico, o que poderia resultar em eventual falha terapêutica.

Apesar de não termos informação a respeito de diferentes padrões de expressão de FGF2 em tumores B16-F10, essa distribuição desigual parece não ter comprometido, ao menos totalmente, o potencial terapêutico desse anticorpo, haja vista os resultados alcançados na vigência de tratamento de animais portadores de tumor subcutâneo ou nódulos metastáticos pulmonares com mAb anti-FGF2 3F12E7 (**RESULTADOS – PARTE I**)

Uma observação cuidadosa das imagens SPECT/CT adquiridas no tempo 4 h apontam para retenção óssea de radioatividade tanto nos animais injetados com mAb

anti-FGF2 3F12E7 ^{99m}Tc -marcado como naqueles que receberam anticorpo controle de isotipo 1F5H2 radiomarcado (**Fig. 33**). Isso reflete os valores de %ID/g obtidos em ensaios de biodistribuição: $6,03 \pm 0,59$, para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG; $4,29 \pm 0,14$, para ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 IgG.

Figura 31. Plano experimental para aquisição de imagens SPECT/CT *in vivo* e estudos farmacocinéticos *ex vivo* de camundongos portadores de tumor subcutâneo. Estudos SPECT/CT e de biodistribuição foram realizados nove dias pós-implante de células B16-F10 no quadrante abdominal inferior direito dos animais. Tempo de 4 h e 24 h pós-inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou de ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 IgG (anticorpo controle de isotipo) (37 MBq; 50 μg). Legenda: céls., células; sc, inóculo subcutâneo; iv, inóculo endovenoso.

Figura 32. Renderização de volume tridimensional de imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 pós-inóculo de anticorpo radiomarcado. (Legenda na próxima página)

Figura 32. Renderização de volume tridimensional de imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 pós-inóculo de anticorpo radiomarcado. (Figura na página anterior) Imagens tridimensionais representativas (perspectiva coronal) de animais (A) 4 h e (B) 24 h pós-inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 IgG (anticorpo controle de isotipo) (37 MBq; 50 μg). Seta aponta região ocupada pela massa tumoral. Escala (em Fig. A) = porcentagem do limiar de intensidade máximo (max; 1480 contagens) e mínimo (min; 240 contagens). Escala (em Fig. B) = porcentagem do limiar de intensidade máximo (max; 370 contagens) e mínimo (min; 75 contagens). Legenda: AC, artéria carótida comum; C, coração; F, fígado; B, bexiga urinária; I, intestino com fezes; U, urina eliminada durante o exame.

Figura 33. Imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 portadores de tumor subcutâneo B16-F10 4 h pós-inóculo de anticorpo radiomarcado. (Legenda na próxima página)

Figura 33. Imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 portadores de tumor subcutâneo B16-F10 4 h pós-inóculo de anticorpo radiomarcado. (Figura na página anterior) Imagens representativas (planos coronal, sagital e transversal) de animais injetados com (A) ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou (B) ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 IgG (anticorpo controle de isotipo) (37 MBq; 50 μg). Em tracejado, a região ocupada pela massa tumoral, no quadrante abdominal inferior direito. Linhas azuis apontam para posição dos planos coronal, sagital e transversal em cada uma das imagens. Escala = porcentagem do limiar de intensidade máximo (max; 60%) e mínimo (min; 0%). Legenda: R, balão pneumático utilizado para detecção do ritmo respiratório dos animais; M, maca onde camundongo foi posicionado para a aquisição das imagens; PT, plano transversal; PS, plano sagital; PC, plano coronal.

Figura 34. Imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 portadores de tumor subcutâneo B16-F10 24 h pós-inóculo de anticorpo radiomarcado. (Legenda na próxima página)

Figura 34. Imagens SPECT/CT de camundongos C57Bl/6 portadores de tumor subcutâneo B16-F10 24 h pós-inóculo de anticorpo radiomarcado. (Figura na página anterior) Imagens representativas (planos coronal, sagital e transversal) de animais injetados com (A) ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou (B) ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 IgG (anticorpo controle de isotipo) (37 MBq; 50 μg). Em tracejado, a região ocupada pela massa tumoral, no quadrante abdominal inferior direito. Linhas azuis apontam para posição dos planos coronal, sagital e transversal em cada uma das imagens. Escala = porcentagem do limiar de intensidade máximo (max; 50%) e mínimo (min; 0%). Legenda: R, balão pneumático utilizado para detecção do ritmo respiratório dos animais; M, maca onde camundongo foi posicionado para a aquisição das imagens; PT, plano transversal; PS, plano sagital; PC, plano coronal.

Figura 35. Captação de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em tumores B16-F10 em camundongos C57Bl/6. Gráfico apresenta valores da razão $(\overline{\text{CPP}}_{\text{ROI tumor}})/(\overline{\text{CPP}}_{\text{ROI região contralateral}})$ obtidos a partir de análise das imagens SPECT nos tempos de 4 e 24 h pós-inóculo. Os animais receberam 37 MBq (50 μg) de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou de ^{99m}Tc -ligante CEA 1F5H2 IgG (controle de isotipo). N=3/grupo. ROI foi desenhado sobre área tumoral no plano coronal de imagem SPECT. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle de isotipo; teste t-Student.

4.IIB.3. Imagem SPECT/CT de mAbs ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 e ^{99m}Tc -HYNIC-controle de isotipo 1F5H2 em camundongos portadores de nódulo pulmonar de B16-F10

Estudos cintilográficos tomográficos com mAb 3F12E7 ^{99m}Tc -marcado também permitem observar captação desse anticorpo anti-FGF2 em nódulos tumorais no parênquima pulmonar de animais C57Bl/6 previamente desafiados, via veia caudal, com células B16-F10. O plano experimental encontra-se na **Fig. 36**.

Planos transversal, coronal e sagital de imagens torácicas CT e SPECT/CT de animais portadores de nódulos pulmonares são apresentados em **Fig. 37 e 38**. Estruturas hiperatenuantes nas imagens CT (janela mediastinal) que aumentam de tamanho entre os dias 8 e 15 pós-inóculo das células de melanoma e que não são detectadas em imagens de animais não desafiados (**Fig. 39**) foram identificadas como nódulos tumorais.

As imagens foram adquiridas 24 h pós-inóculo do anticorpo radiomarcado (37 MBq; 50 μg /animal), quando os níveis sanguíneos de radioatividade esperados para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG encontram-se na média de $20,0 \pm 0,4$ %ID/g, conforme previamente observado em estudos de biodistribuição *ex vivo*. Ainda, no ponto de tempo 24 h, os valores de %ID/g no pulmão para ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG foi de $11,6 \pm 0,6$ %, em animais portadores de tumor subcutâneo.

Apesar da qualidade das imagens SPECT torácicas ser prejudicada pela alta perfusão no tecido pulmonar bem como pela baixa depuração sanguínea dos anticorpos, nossos dados apontam para uma maior captação de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7

IgG em estrutura hiperatenuante, compatível com nódulo tumoral, presente no terço inferior do hemitórax direito, comparado com o obtido com anticorpo controle de isotipo ^{99m}Tc -marcado, nas imagens adquiridas no 15º dia pós-inóculo de células B16-F10 (**Fig. 37 e 38**). Os dados SPECT foram processados em software PMODTM, versão 3,503 (PMOD Technologies Ltd., Suíça) e normalizados em mesma escala colorida de intensidade de voxels para ambos os anticorpos. A escala foi ajustada para um limiar superior de 30% e inferior de 10%, com o propósito de reduzir sinal radioativo proveniente da captação basal do tecido pulmonar (**Tabela 8**). Imagens CT foram utilizadas como referência anatômica.

As imagens cintilográficas obtidas *in vivo* (**Fig. 37 e 38**) são consistentes com o observado em estudos de autorradiografia *ex vivo* (**Fig. 40 e 41**), realizados após a última aquisição SPECT/CT nos animais.

O perfil de distribuição do anticorpo ^{99m}Tc -marcado em secção de 10 µm de espessura do tecido pulmonar aponta para uma maior concentração de radioatividade em área composta por nódulos tumorais, conforme evidenciado pela análise pareada das imagens autorradiográficas com a correspondente secção sequencial corada com hematoxilina e eosina. Ainda, nota-se que a intensidade de sinal radioativo em área de nódulo tumoral em secções provenientes de animais injetados com ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG é superior à observada para aquelas de animais injetados com anticorpo controle de isotipo 1F5H2 ^{99m}Tc -marcado.

Esses estudos de autorradiografia foram realizados em seções de pulmão expostas à uma placa de fósforo, a qual armazena a energia dos raios gama, produto do decaimento de ^{99m}Tc , criando uma imagem latente formada por elétrons armadilhados dentro da estrutura dos cristais da placa (Takahashi K et al., 1984). A leitura dessa

informação é realizada com um feixe de laser de comprimento de onda próximo ao vermelho, que excita as moléculas dos cristais, resultando na emissão de radiação eletromagnética (Sonoda M et al., 1993). As imagens autorradiográficas foram normalizadas em mesma escala colorida de intensidade de pixels para ambos os anticorpos. Esses dados autorradiográficos validam a detecção de foco de B16-F10 em parênquima pulmonar obtida através de imagens SPECT com anticorpo específico para FGF2 3F12E7.

O sucesso na identificação de nódulos tumorais com notável retenção de anticorpo anti-FGF2 3F12E7 radiomarcado, comparado com o obtido com anticorpo controle de isotipo 1F5H2, manteve-se restrito às aquisições cintilográficas do 15º dia pós-inóculo via veia caudal de células B16-F10. Imagens SPECT/CT adquiridas uma semana antes não revelaram diferenças de captação tumoral entre os anticorpos 3F12E7 e o controle de isotipo 1F5H2.

Um fator determinante para essa não detecção de sinal SPECT proveniente de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em nódulos pulmonares no 8º dia pós-inóculo de B16-F10 é a considerável perfusão nos pulmões (**Tabela 8**). A acentuada vascularização desse tecido compromete a sensibilidade para distinguir o sinal SPECT proveniente de pequenas estruturas neoplásicas, conforme evidenciado pelas imagens CT, do sinal inespecífico presente no parênquima pulmonar, levando-se em conta o limite de resolução das imagens SPECT (voxels de 0,92 mm; ver **MATERIAIS E MÉTODOS**, item **3.25**). Ainda, uma eventual menor expressão de FGF2 nesses focos tumorais também pode contribuir para esse resultado negativo.

Vale considerar que uma possível não detecção de lesões metastáticas nas imagens SPECT não necessariamente condiz com a ausência de nódulos tumorais. Em

modelos experimentais de metástase, é frequente o encontro de pequenas colônias de células tumorais, visíveis apenas a partir de análise histológica. De fato, as imagens HE apresentadas em **Fig. 18C** apontam para nódulos com diâmetro inferior ao limite de resolução das imagens SPECT. Assim, apesar das imagens SPECT serem válidas para acompanhar a captação do anticorpo em estruturas neoplásicas, ela não substitui a análise histológica para detecção da extensão de nódulos tumorais no pulmão.

De modo geral, esses dados cintilográficos sugerem uma retenção específica de anticorpo anti-FGF2 3F12E7 em focos pulmonares de B16-F10, o que contribui positivamente para nossa hipótese de que a redução do número de nódulos tumorais observada na vigência de tratamento com esse anticorpo monoclonal (**Fig. 18**) é decorrente do reconhecimento e neutralização de FGF2, fator angiogênico presente no microambiente desses tumores.

Figura 36. Plano experimental para aquisição de imagens SPECT/CT *in vivo* em camundongos portadores de nódulo pulmonar de B16-F10. Estudos realizados nos dias 8 e 15 pós-inóculo via veia caudal de células B16-F10 em camundongos C57Bl/6. Aquisições de imagem no tempo de 24 h pós-inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ou de ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 IgG (anticorpo controle de isotipo) (37 MBq; 50 μg). Legenda: céls., células; iv, inóculo via veia caudal.

Figura 37. Imagens CT e SPECT/CT do tórax de camundongo C57Bl/6, portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10, após inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG. (Ver próxima página)

Figura 37. Imagens CT e SPECT/CT do tórax de camundongo C57Bl/6, portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10, após inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG. (Figura na página anterior) Imagens representativas (planos transversal, sagital e coronal) obtidas 24 h após administração de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG (37 MBq; 50 μg) em camundongos nos dias 7 (A) e 14 (B) pós-inóculo iv de 5×10^5 células B16-F10. Escala = porcentagem do limiar de intensidade máximo (max; 30%) e mínimo (min; 10%). Linhas azuis apontam para posição dos planos coronal, sagital e transversal em cada uma das imagens. Legenda: C, coração; P, parênquima pulmonar; F, fígado; PT, plano transversal; PS, plano sagital; PC, plano coronal.

Figura 38. Imagens CT e SPECT/CT do tórax de camundongo C57Bl/6, portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10, após inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-controle de isotipo 1F5H2 IgG. (Ver próxima página)

Figura 38. Imagens CT e SPECT/CT do tórax de camundongo C57Bl/6, portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10, após inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-controle de isotipo 1F5H2 IgG. (Figura na página anterior). Imagens representativas (planos transversal, sagital e coronal) obtidas 24 h após administração de ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (37 MBq; 50 μg) em camundongos nos dias 7 (A) e 14 (B) pós-inóculo iv de 5×10^5 células B16-F10. Não é possível identificar sinal radioativo em estrutura com densidade de partes moles, compatível com nódulo tumoral (indicada por círculo), localizada na região póstero-lateral da base do hemitórax direito. Escala = porcentagem do limiar de intensidade (CPM) máximo (max; 30%) e mínimo (min; 10%). Linhas azuis apontam para posição dos planos coronal, sagital e transversal em cada uma das imagens. Legenda: C, coração; P, parênquima pulmonar; F, fígado; PT, plano transversal; PS, plano sagital; PC, plano coronal.

Figura 39. Imagens CT e SPECT/CT do tórax de camundongos C57Bl/6, desprovidos de nódulos tumorais, pós-inóculo de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG. Imagens representativas (planos transversal, sagital e coronal) obtidas 24 h após administração de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG (37 MBq; 50 μg). Escala = porcentagem do limiar de intensidade máximo (max; 30%) e mínimo (min; 10%). Linhas azuis apontam para posição dos planos coronal, sagital e transversal em cada uma das imagens. Legenda: C, coração; P, parênquima pulmonar; F, fígado; PT, plano transversal; PS, plano sagital; PC, plano coronal.

Figura 40. Análise auto-radiográfica *ex vivo* correlaciona radioatividade de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 IgG em secção pulmonar com regiões de nódulos tumorais. Após aquisição de imagens SPECT/CT, camundongos portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10 foram sacrificados. Os pulmões foram coletados, congelados em meio OCT e secções de 10 μm de espessura foram confeccionadas. (I) Secção coronal de pulmão corada com hematoxilina e eosina. Pontilhado preto delimita massa tumoral, caracterizada por denso arranjo de células. Aumento de 400x. (II) Correspondente auto-radiografia aponta para intensa captação de radioatividade em região composta por tecido neoplásico.

Figura 41. Análise auto-radiográfica *ex vivo* de secção de pulmões contendo nódulos tumorais, obtidos de animais injetados com ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA IgG. Após aquisição de imagens SPECT/CT, camundongos portadores de nódulos pulmonares de melanoma B16-F10 foram sacrificados. Os pulmões foram coletados, congelados em meio OCT e secções de 10 μm de espessura foram confeccionadas. (I) Secção de pulmão corada com hematoxilina e eosina. Pontilhado aponta para massa tumoral, caracterizada por denso arranjo de células. Aumento de 400x. (II) Correspondente auto-radiografia para essa secção.

5. DISCUSSÃO GERAL

Apresentamos nesse trabalho um novo anticorpo que se liga em FGF2 com uma constante de dissociação aparente na faixa de nanomolar (quando radiomarcado com ^{99m}Tc). FGF2 é um dos reguladores cruciais na cascata de metástase e angiogênese em melanomas (Wang Y et al., 1997), o que o torna um alvo interessante para abordagens antitumorais direcionadas a essa neoplasia.

Coletivamente, os resultados apresentados apontam para a utilidade terapêutica do mAb anti-FGF2 3F12E7. O tratamento de camundongos com esse anticorpo está associado à significativa redução no número de focos metastáticos de células B16-F10 nos pulmões, em abordagem de metástase experimental, bem como à menor taxa de crescimento de melanoma subcutâneo B16-F10, quando comparado com o obtido em animais tratados com salina ou anticorpo controle de isotipo. Esses resultados são acompanhados por uma redução na densidade microvascular da massa tumoral, conforme determinado por imunomarcção para CD34 ou CD31 ($p < 0,05$ comparado aos grupos controle; análise de variância de uma via/pós-teste Bonferroni).

Em paralelo aos estudos exploratórios da potencial aplicação terapêutica do anticorpo anti-FGF2 aqui estudado, ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG foi avaliado como um agente de imagem SPECT. A radiomarcção de 3F12E7 IgG e de 1F5H2 IgG (anticorpo controle de isotipo), via agente quelante bifuncional HYNIC, mostrou-se simples e efetiva, com rendimento superior a 90% e pureza radioquímica pós-purificação por HPLC superior a 95%.

A alta afinidade de ligação de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG ao fator de crescimento FGF2 ($0,84 \pm 0,19$ nM) foi demonstrada em ensaios de ligação competitiva

in vitro e a captação tumoral específica avaliada em ensaios de distribuição *ex vivo* e em imagens SPECT/CT *in vivo* em um tumor FGF2-positivo. Os resultados obtidos caracterizam o anticorpo terapêutico anti-FGF2 3F12E7, quando radiomarcado com radionuclídeo emissor de raios gama, como um potencial traçador para imagem SPECT de tumores FGF2-positivos.

Uma possível aplicação a ser explorada é o uso dessa molécula radiomarcada para a detecção de tumores FGF2-positivos, de modo não invasivo, ao longo da progressão da doença, o que poderia predizer se o paciente será responsivo ou não à terapia anti-FGF2, bem como apontar se a expressão desse fator angiogênico se altera na vigência de tratamento quimioterápico.

A informação do perfil molecular de tumores é de grande importância clínica, capaz de influenciar a conduta médica para a seleção do medicamento mais indicado para o paciente, em dosagem adequada para se alcançar os efeitos desejados, no momento adequado. É o direcionamento para uma medicina individualizada, ao invés da adoção de protocolos padronizados gerais, em geral pouco eficazes.

De acordo com relatórios recentes da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO, EUA), drogas alvo específicas exibem, de modo geral, uma taxa de resposta de apenas 4-5%, apesar da alta expectativa e do alto custo de produção (Elvin JG et al., 2013). Parte desse cenário deve-se ao fato de que nem todos os pacientes são portadores de tumores que expressam a proteína para a qual o anticorpo é direcionado.

Tomemos como exemplo o trastuzumabe (Herceptin®), um anticorpo monoclonal específico para uma glicoproteína de 185 kDa (p185^{HER2}) codificada pelo gene para o fator 2 de crescimento epidermal humano (HER2). Esse medicamento é indicado pelo FDA para casos de tumores de mama HER2 positivos, o que corresponde a uma parcela de apenas 20-30% do total de portadores de câncer de mama (Maeda H et

al., 2009). Atualmente, a estratificação dos pacientes que receberão ou não essa terapia parte da análise da expressão de HER2 em amostras de tumor obtidas por biópsia no momento do diagnóstico. Entretanto, esse método, além de invasivo, não leva em consideração alterações na expressão da proteína alvo do anticorpo ao longo do tratamento quimioterápico. O resultado disso é uma baixa responsividade terapêutica (<30%) mesmo em tumores HER2-positivos (Vogel CL et al., 2002), o que resulta em uma taxa de resposta global, entre todos os pacientes portadores de tumor de mama, inferior a 6%, considerando benefício clínico a resposta parcial ou completa ou doença estável por mais de 6 meses.

A adoção de estratégias de imagem SPECT ou PET que possibilitem o acompanhamento não invasivo da expressão tumoral dessa proteína previamente à administração do anticorpo monoclonal fornecerá informações valiosas para a identificação com sucesso dos pacientes que realmente responderão ao tratamento, bem como evitará a exposição desnecessária aos efeitos adversos por aqueles que não apresentariam qualquer benefício clínico.

Além disso, com o uso mais seletivo de medicamentos alvo dirigidos, reduz-se o gasto desnecessário com esses agentes de alto custo, uma questão a ser considerada especialmente quando os recursos são limitados.

Um dos desafios atuais da prática oncológica é conciliar os notáveis benefícios terapêuticos dos novos agentes quimioterápicos alvo específicos com seus custos exponenciais. Mais de 90% dos agentes anti-neoplásicos aprovados pelo FDA nos últimos anos apresentam um custo anual por paciente superior a US\$ 20 mil. Nos Estados Unidos, o tratamento de pacientes portadores de NSCLC (câncer de pulmão de células não pequenas) por 18 semanas com cetuximabe, um anticorpo monoclonal que reconhece o domínio extracelular de EGFR, tem um custo médio de US\$ 80 mil, o que

traduz em um gasto de US\$ 800 mil para prolongar a vida de um único paciente em 1 ano (**Tabela 9**). Apesar de extensivamente custoso, parcela considerável dos pacientes tratados com esse regime terapêutico não apresentarão benefícios clínicos (Fojo T et al., 2009).

Esses valores são o resultado das etapas altamente custosas de produção de anticorpos monoclonais (Olivier S et al., 2009), bem como das altas doses necessárias para se alcançar um resultado clínico satisfatório.

Cetuximabe não é o único tratamento a base de anticorpos de alto custo. Terapia com bevacizumabe, anticorpo humanizado com alvo no fator angiogênico VEGF, acarreta em um gasto médio de cerca de US\$ 90 mil por paciente, para um aumento de sobrevida geral de apenas 1,5 meses (Fojo T et al., 2009), o que torna o uso desse anticorpo pouco custo-efetivo.

Em tumores de mama, apesar da combinação de bevacizumabe à paclitaxel (terapia comumente utilizada para tratamento de tumores de mama) resultar em extensão estatisticamente significativa da sobrevida livre de progressão (PFS; do inglês *progression-free survival*) comparada à obtida em pacientes tratados apenas com paclitaxel (PFS médio = 11,8 vs 5,9 meses), esse benefício não está associado a ganhos de sobrevida global (Miller K et al., 2007). Nesse caso, devido a baixa responsividade associada a frequentes efeitos adversos, deixou de ser recomendado pela FDA (FDA, 2010).

Até mesmo em casos consideravelmente responsivos à bevacizumabe, como tumores colorretal metastático, a adoção de tais estratégias parece não ser custo-efetiva, quando comparado com os gastos obtidos com tratamento quimioterápico convencional sem bevacizumabe, de acordo com estudos prospectivos randomizados realizados para estimar o impacto econômico desse medicamento (Lange A et al., 2014; Carter HE et

al., 2014). Não podemos nos esquecer, também, de que o uso de bevacizumabe está associado a sérios eventos adversos, tais como perfuração intestinal, hemorragia e atraso na cicatrização tecidual, cujo manejo clínico contribui ainda mais para essa trajetória de custo elevado.

Os altos gastos com anticorpos apresentam um empecilho para sua aplicação no sistema de saúde nacional, particularmente quando a taxa de resposta terapêutica alcançada é baixa. Esse aspecto econômico tem como reflexo direto a crescente restrição ao acesso dessas novas e caras drogas oncológicas em diferentes realidades de cuidado em saúde (Rawlins M et al., 2008). Um exemplo é a recomendação do Reino Unido para não reembolso de gastos com bevacizumabe pelo seguro nacional (Jack A et al., 2008).

Por trás dessa baixa custo-efetividade está a responsividade de pequena parcela dos pacientes a esses agentes de alto custo. Nesse cenário, a adoção de estratégias de imagem molecular *in vivo* entra como uma etapa de crucial importância para rastrear a assinatura patológica de tumores, possibilitando a discriminação do *status* de expressão da proteína para a qual o anticorpo é direcionado (no nossos caso, FGF2) nos tumores, de modo não invasivo e alternativo à biopsia, bem como avaliar a retenção do anticorpo terapêutico nesse tecido. Essas informações possibilitarão o uso de anticorpos monoclonais de modo racional e com custo-efetividade agregada.

Abordagens como essa buscam aprimorar o tratamento e desenvolvimento dessas drogas de alto custo, abrindo caminhos para justificar o preço com informações clínicas que estendam o uso do medicamento para um número maior de pacientes, em um processo para tornar o uso da droga custo-efetivo (Jack A et al., 2008).

Tabela 9. Custo estimado por medicamentos alvo específicos

Nome	Regime de tratamento	Dose†	Quantidade necessária ^{†,‡}	Custo por mg ou por comprimido (US\$)	Custo total (US\$) [‡]	↑OS [‡]
Cetuximabe	I: 400 mg/m ² ; M: 250 mg/m ² /semana	I: 600 mg; M: 375 mg	6 975 mg	11,52/mg	80 352.00	1,2 meses
Bevacizumabe	10 mg/kg a cada 14 dias	600 mg a cada 14 dias	13 200 mg	6,88/mg	90 816.00	1,5 meses [§]
Erlotinibe	150 mg diariamente	150 mg/d; 1 comp/dia	112 comp	140,64/comp	15 752.00	10 dias
Sorafenibe	400 mg duas vezes ao dia	800 mg/d; 4 comp/dia	692 comp	49,67/comp	34 373.00	2,7 meses

†, calculado para paciente de 60 kg/1,5 m²; ‡, para o regime de tratamento citado, até alcançar o tempo médio de progressão da doença; §, não estatisticamente significativo. Referência: Fojo T et al., 2009.

Legenda: comp, comprimido/capsula; I, início do tratamento; M, manutenção do tratamento; ↑OS, aumento de sobrevida global.

Apesar de necessários maiores estudos para verificar a sensibilidade e especificidade dos atuais métodos de medicina nuclear não invasivos, comparado com estratégias convencionais como imuno-histoquímica, a adoção de imagens cintilográficas para discriminar o status de FGF2 de tumores, por exemplo, surge como uma alternativa a métodos invasivos e mais tempo-consumíveis que requerem o sacrifício do animal ou a excisão cirúrgica de fragmento do tecido para posterior análise *ex vivo*.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que, de modo geral, a aplicação diagnóstica de anticorpos intactos possui uma limitação prática: sua reduzida depuração sanguínea resulta em significativa exposição de órgãos normais, o que, aliado à relativa baixa taxa de difusão ao tecido tumoral, pode resultar em baixos valores da razão tumor/tecido inespecífico. Essa limitação representa um notável empecilho para se alcançar imagens SPECT de alta sensibilidade em órgãos altamente perfundidos, como fígado, coração e pulmão, o que compromete a detecção de lesões pequenas nesses órgãos.

Vale lembrar aqui que as imagens SPECT revelaram uma distribuição intratumoral do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 limitada, possivelmente restrito à periferia dos vasos sanguíneos funcionais que irrigam o tumor em decorrência da alta pressão intersticial e alterações na arquitetura vascular comumente encontradas em tumores. Essa falha em alcançar uma distribuição uniforme em tumores sólidos impossibilitaria o uso dessa ferramenta para rastrear a expressão de fatores expressos em áreas de baixa perfusão.

A aplicação de moléculas menores em tamanho, alcançadas com o advento da tecnologia de engenharia genética de anticorpos, é a sequência natural dos estudos para alcançar um produto anti-FGF2 de utilidade diagnóstica. Um exemplo são os fragmentos variáveis de cadeia única (scFv; do inglês *single chain variable fragment*) de IgG, compostos pela região variável da cadeia leve e pesada do anticorpo original, construídos de modo a manter a afinidade de ligação ao antígeno. Outra possibilidade a ser empregada em estudos de imagem PET ou SPECT é o uso de fragmentos de anticorpos, que, por serem menores em tamanho, apresentam rápida depuração sanguínea, o que contribui para aumentar a razão tumor/não tumor em imagens cintilográficas.

Um grande acervo de radionuclídeos está disponível para a complexação a moléculas de potencial diagnóstico, o que inclui tanto emissores de fótons gama (para SPECT), quanto emissores de pósitrons (para PET) (Hamoudeh M et al., 2008). Neste trabalho, demos preferência ao uso de tecnécio-99m, dada sua fácil obtenção por meio de geradores, além do considerável número de métodos para sua marcação a proteínas, tanto via direta quanto indireta. Apesar dessas vantagens, a baixa meia vida (6 h) desse elemento radiometálico representa um empecilho para sua aplicação com anticorpos. Essa limitação ficou evidente nos ensaios SPECT com imagens tomadas 4h pós-inóculo, as quais mostraram dificuldades para detectar captação específica do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 radiomarcado, quando comparados ao alcançado pelo controle negativo.

Uma alternativa a ser considerada para a obtenção de imagens cintilográficas com maior contraste tumor:não tumor está nas aquisições em pontos de tempo tardios (> 24 h) através do uso de radionuclídeos para SPECT com meia-vida superior a do ^{99m}Tc , como é o caso de ^{111}In ($T_{1/2}=2,8$ dias; Hamoudeh M et al., 2008), ou através da aplicação de isótopos emissores de pósitrons, para imagens PET, como ^{124}I ($T_{1/2}=4,2$ dias; Leyton JV et al., 2009) e ^{89}Zr ($T_{1/2}=4,2$ dias; Wei L et al., 2014).

No corrente trabalho, a exposição dos tecidos normais à molécula de anticorpo, observada pelos valores de %ID/g em tecido muscular esquelético, não parece estar correlacionada, nos estudos terapêuticos, a reações citotóxicas adversas que pudessem refletir no fenótipo do animal, tomando como base a massa corpórea ao longo do tratamento e eventuais alterações comportamentais. Estudos hematológicos serão realizados com o propósito de se certificar ausência de comprometimento nos níveis séricos de células sanguíneas. De qualquer forma, anticorpos monoclonais são correntemente aceitos como moléculas pouco tóxicas e seguras para seu uso endovenoso em altas concentrações por períodos prolongados.

De modo geral, o corrente desafio não reside apenas em achar novos agentes mais eficazes para o tratamento de melanoma, mas também em desenvolver estratégias que possibilitem monitorar a resposta terapêutica bem como identificar a parcela de pacientes que de fato poderá se beneficiar significativamente das terapias existentes. O anticorpo anti-FGF2 aqui estudado mostrou-se uma ferramenta de potencial teranóstico, com notável valor terapêutico, bem como com potencial para ser explorado para fins diagnósticos, com o propósito de rastrear tumores FGF2-positivos, bem como mapear o estímulo angiogênico de FGF2 no microambiente tumoral.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, verificamos que o anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7:

- (1) Reconhece a forma murina de FGF2, expresso em tumores B16-F10;
- (2) Interfere na taxa de crescimento de tumores subcutâneos B16-F10 quando administrado via veia caudal ou intraperitonealmente na forma de células de hibridoma gama-irradiadas;
- (3) Quando administrado sistemicamente em camundongos C57Bl/6 portadores de melanoma subcutâneo B16-F10, reduz significativamente o número de vasos sanguíneos CD31-positivos na massa tumoral;
- (4) Compromete o crescimento de focos metastáticos de melanoma B16-F10 no parênquima pulmonar, o que está associado a sua potencial atividade antiangiogênica;
- (5) Pode ser eficientemente radiomarcado com emissor de fótons gama ^{99m}Tc para estudos de sua distribuição sistêmica, bem como de sua aplicação como traçador SPECT de tecidos que expressam FGF2;
- (6) Possui constante de dissociação aparente na faixa de nanomolar, quando radiomarcado com ^{99m}Tc ;
- (7) É captado por tumores subcutâneos e por focos metastáticos pulmonares de B16F10 em camundongos C57Bl/6, conforme evidenciado por métodos de medicina nuclear.

Esses achados apontam para o potencial teranóstico do anticorpo monoclonal 3F12E7, o qual revela benefícios terapêuticos em estudo experimental com melanoma B16-F10, bem como sua possível aplicabilidade como ferramenta a ser explorada para o rastreamento de tumores que expressam o fator 2 para crescimento de fibroblasto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, et al. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*. 1986 Aug 1;233(4763):545-8.

Abrams MJ, Juweid M, tenKate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, et al. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med*. 1990 Dec;31(12):2022-8.

Adams GP, Schier R, Marshall K, Wolf EJ, McCall AM, Marks JD, et al. Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. *Cancer Res*. 1998 Feb 1;58(3):485-90.

Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, et al. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4750-5.

al-Alousi S, Barnhill R, Blessing K, Barksdale S. The prognostic significance of basic fibroblast growth factor in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol*. 1996b Dec;23(6):506-10.

¹ Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

al-Alousi S, Carlson JA, Blessing K, Cook M, Karaoli T, Barnhill RL. Expression of basic fibroblast growth factor in desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol*. 1996 Apr;23(2):118-25.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

Alvarez J. Radiopharmaceuticals prepared with stannous chloride. *J Radioanal Chem*. 1975;27(2):475-482.

Armstrong BK and Kricker A (1994) Cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 19: 219–240.

Atkins HL, Richards P. Demonstration of bone infarct by scintillation scanning with 99mTc colloid: a case report. *J Nucl Med*. 1968 Apr;9(4):163-4.

AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc*. 2001 Mar 1;218(5):669-96.

Azuma M, Yuki T, Motegi K, Sato M. Enhancement of bFGF export associated with malignant progression of human salivary gland cell clones. *Int J Cancer*. 1997 May 29;71(5):891-6.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3622-34.

Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg*. 1995 Sep;181(3):193-201.

Beddingfield FC 3rd. The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist*. 2003;8(5):459-65.

Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):592-603.

Bockisch A, Freudenberg LS, Schmidt D, Kuwert T. Hybrid imaging by SPECT/CT and PET/CT: proven outcomes in cancer imaging. *Semin Nucl Med*. 2009 Jul;39(4):276-89.

Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2003;5(3):140-6.

Braddock M. *Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents*. Cambridge : Royal Society of Chemistry; 2012.

Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5640-9.

Bruyant PP. Analytic and iterative reconstruction algorithms in SPECT. *J Nucl Med*. 2002 Oct;43(10):1343-58.

Brych SR, Gokarn YR, Hultgen H, Stevenson RJ, Rajan R, Matsumura M. Characterization of antibody aggregation: role of buried, unpaired cysteines in particle formation. *J Pharm Sci*. 2010 Feb;99(2):764-81.

Buss NA, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, de Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol*. 2012 Oct;12(5):615-22.

Camacho X, Garcia MF, Calzada V, Fernández M, Alonso O, Gambini JP et al. ^{99m}Tc-Labeled Bevacizumab via HYNIC for Imaging of Melanoma. *Journal of Analytical Oncology* 02/2014; 3(1):53-64.

Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Porcal W, Alonso O, et al. Synthesis and evaluation of (^{99m}Tc) chelate-conjugated bevacizumab. *Curr Radiopharm*. 2013 Mar;6(1):12-9.

Cancer Facts and Figures 2013. American Cancer Society Web site. Disponível em <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/2013-cancer-facts-and-figures.pdf>. Acessado em 15.02.2014.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.

Carter HE, Zannino D, John Simes R, Schofield DJ, Howard K, Zalcberg JR, et al. The cost effectiveness of bevacizumab when added to capecitabine, with or without mitomycin-C, in first line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the Australasian phase III MAX study. *Eur J Cancer*. 2014 Feb;50(3):535-43.

Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1(2):118–29.

Cassard L, Cohen-Solal J, Camilleri-Broët S, Fournier E, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Fc gamma receptors and cancer. *Springer Semin Immunopathol*. 2006 Dec;28(4):321-328.

Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2745-51.

Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jul;10(7):505-14.

Clinical Trials.gov web-site (<http://www.clinicaltrials.gov>). Acessado em 10.02.2014.

Cooper HM, Paterson Y. Purification of immunoglobulin G fraction from antiserum, ascites fluid, or hybridoma supernatant. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001 May;Chapter 11:Unit11.14.

Coppola G, Atlas-White M, Katsahambas S, Bertolini J, Hearn MT, Underwood JR. Effect of intraperitoneally, intravenously and intralesionally administered monoclonal anti-beta-FGF antibodies on rat chondrosarcoma tumor vascularization and growth. *Anticancer Res*. 1997 May-Jun;17(3C):2033-9.

Cotter RJ. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal Chem*. 1992 Nov 1;64(21):1027A-1039A.

Cuatrecasas P, Parikh I. Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. *Biochemistry*. 1972 Jun 6;11(12):2291-9.

Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LF. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras*. 2010 Jan-Feb;56(1):103-11.

de Moraes JZ, Gesztes J, Westermann P, Le Doussal JM, Lopes JD, Mach JP. Anti-idiotypic monoclonal antibody AB3, reacting with the primary antigen (CEA), can localize in human colon-carcinoma xenografts as efficiently as AB1. *Int J Cancer*. 1994 May 15;57(4):586-91.

Debbia M, Lambin P. Measurement of anti-D intrinsic affinity with unlabeled antibodies. *Transfusion*. 2004 Mar;44(3):399-406.

Derrick JP, Wigley DB. Crystal structure of a streptococcal protein G domain bound to an Fab fragment. *Nature*. 1992 Oct 22;359(6397):752-4.

Dolman C., Thorpe R., Analysis and purification of IgG using size-exclusion high performance liquid chromatography, in: Walker, J.M. (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Tatowa, NJ, 2002, pp. 995-997.

Eckelman WC, Kilbourn MR, Mathis CA. Discussion of targeting proteins in vivo: in vitro guidelines. *Nucl Med Biol*. 2006 May;33(4):449-51.

Eckelman WC. Unparalleled contribution of technetium-99m to medicine over 5 decades. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009 Mar;2(3):364-8.

Edwards DS, Liu S, Ziegler MC, Harris AR, Crocker AC, Heminway SJ, et al. RP463: a stabilized technetium-99m complex of a hydrazino nicotinamide derivatized chemotactic peptide for infection imaging. *Bioconjug Chem*. 1999 Sep-Oct;10(5):884-91.

- Ehrlich P. Collected Studies on Immunity. New York:John Wiley and Sons, 1906.
- Elvin JG, Couston RG, van der Walle CF. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm*. 2013 Jan 2;440(1):83-98.
- Fekete S, Dong MW, Zhang T, Guillarme D. High resolution reversed phase analysis of recombinant monoclonal antibodies by ultra-high pressure liquid chromatography column coupling. *J Pharm Biomed Anal*. 2013 Sep;83:273-8.
- Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res*. 1975 Jan;35(1):218-24.
- Flaherty KT. New molecular targets in melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2004 Mar;16(2):150-4.
- Fojo T, Grady C. How much is life worth: cetuximab, non-small cell lung cancer, and the \$440 billion question. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Aug 5;101(15):1044-8.
- Food and Drug Administration Briefing Document Oncology Drug Advisory Committee Meeting. (July,2010). BLA STN 125085/191 and 192 Avastin® (bevacizumab). FDA, 2010.25-26p.
- Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*. 2005 Feb 1;65(3):671-80.
- Global Cancer Facts and Figures 2007. American Cancer Society Web site. Disponível em http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Facts_and_Figures_2007_rev2.pdf. Acessado em 15.02.2014.
- Green CH. Technetium-99m production issues in the United Kingdom. *J Med Phys*. 2012 Apr;37(2):66-71.
- Guerry D 5th, Schuchter LM. Disseminated melanoma--is there a new standard therapy? *N Engl J Med*. 1992 Aug 20;327(8):560-1.

Hamada S, Fujita S. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry*. 1983;79(2):219-26.

Hamoudeh M, Kamleh MA, Diab R, Fessi H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Sep;60(12):1329-46.

Hance KW, Zeytin HE, Greiner JW. Mouse models expressing human carcinoembryonic antigen (CEA) as a transgene: evaluation of CEA-based cancer vaccines. *Mutat Res*. 2005 Aug 25;576(1-2):132-54.

Hicklin DJ, Witte L, Zhu Z, Liao F, Wu Y, Li Y, et al. Monoclonal antibody strategies to block angiogenesis. *Drug Discov Today*. 2001 May 1;6(10):517-528.

Hnatowich DJ, Mardirossian G, Rusckowski M, Fogarasi M, Virzi F, Winnard P Jr. Directly and indirectly technetium-99m-labeled antibodies--a comparison of in vitro and animal in vivo properties. *J Nucl Med*. 1993 Jan;34(1):109-19.

Hnatowich DJ, Virzi F, Fogarasi M, Rusckowski M, Winnard P Jr. Can a cysteine challenge assay predict the in vivo behavior of 99mTc-labeled antibodies? *Nucl Med Biol*. 1994 Nov;21(8):1035-44.

Hudson HM, Larkin RS. Accelerated image reconstruction using ordered subsets of projection data. *IEEE Trans Med Imaging*. 1994;13(4):601-9.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.

Instituto Nacional do Câncer. Câncer no Brasil: Dados dos Registros de Base Populacional. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/Inca; 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acessado em 15.02.2014.

Iwai K, Maeda H, Konno T. Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumor: enhanced therapeutic effect and X-ray image. *Cancer Res*. 1984 May;44(5):2115-21.

Iyer AK, Lan X, Zhu X, Su Y, Feng J, Zhang X, et al. Novel human single chain antibody fragments that are rapidly internalizing effectively target epithelioid and sarcomatoid mesotheliomas. *Cancer Res.* 2011 Apr 1;71(7):2428-32.

Jack A, Simonian H. Roche to switch to primary care focus. *Financial Times* (European Ed.), July 2, 2008.

Janković D, Maksin T, Djokić D, Milonjić S, Nikolić N, Mirković M, et al. Particle size analysis: 90Y and 99mTc-labelled colloids. *J Microsc.* 2008 Dec;232(3):601-4.

Takeji Y, Teicher BA. Preclinical studies of the combination of angiogenic inhibitors with cytotoxic agents. *Invest New Drugs.* 1997;15(1):39-48.

Kalkhof S, Sinz A. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Sep;392(1-2):305-12.

Kaur S, Venktaraman G, Jain M, Senapati S, Garg PK, Batra SK. Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Lett.* 2012 Feb 28;315(2):97-111.

Khalil MM, Tremoleda JL, Bayomy TB, Gsell W. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int J Mol Imaging.* 2011;2011:796025. a m (zero): diagnosis and therapy. *ISRN Dermatol.* 2013 Apr 11;2013:616170.

Kibbey MC, Grant DS, Kleinman HK. Role of the SIKVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth: an in vivo Matrigel model. *J Natl Cancer Inst.* 1992 Nov 4;84(21):1633-8.

Kimura M, Tsivian M, Mouraviev V, Mayes JM, Price MM, Bannister MC, et al. Utilization of (111)In-Capromab pendetide SPECT-CT for detecting seminal vesicle invasion with recurrent prostate cancer after primary in situ therapy. *Int J Urol.* 2009 Dec;16(12):971-5.

Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. FeRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Feb;282(2):F358-65.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.

Kumar SR, Quinn TP, Deutscher SL: Evaluation of an ¹¹¹In-radiolabeled peptide as a targeting and imaging agent for Erb-2 receptor expressing breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6070–6079.

Lange A, Prenzler A, Frank M, Kirstein M, Vogel A, von der Schulenburg JM. A systematic review of cost-effectiveness of monoclonal antibodies for metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2014 Jan;50(1):40-9.

Larsen SK, Solomon HF, Caldwell G, Abrams MJ. [^{99m}Tc]tricine: a useful precursor complex for the radiolabeling of hydrazinonicotinate protein conjugates. *Bioconjug Chem*. 1995 Sep-Oct;6(5):635-8.

Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*. 2005;46(3):269-79.

Levêque D, Wisniewski S, Jehl F. Pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies used in oncology. *Anticancer Res*. 2005 May-Jun;25(3c):2327-43.

Lewis TB, Robison JE, Bastien R, Milash B, Boucher K, Samlowski WE, et al. Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer*. 2005 Oct 15;104(8):1678-86.

Leyton JV, Olafsen T, Sherman MA, Bauer KB, Aghajanian P, Reiter RE, et al. Engineered humanized diabodies for microPET imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors. *Protein Eng Des Sel*. 2009 Mar;22(3):209-16.

Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Sep;60(12):1347-70.

Lu SX, Takach EJ, Solomon M, Zhu Q, Law SJ, Hsieh FY. Mass spectral analyses of labile DOTA-NHS and heterogeneity determination of DOTA or DM1 conjugated anti-PSMA antibody for prostate cancer therapy. *J Pharm Sci*. 2005 Apr;94(4):788-97.

Mädler S, Seitz M, Robinson J, Zenobi R. Does chemical cross-linking with NHS esters reflect the chemical equilibrium of protein-protein noncovalent interactions in solution? *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010 Oct;21(10):1775-83.

Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009 Mar;71(3):409-19.

Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release.* 2000 Mar 1;65(1-2):271-84.

Malviya G, D'Alessandria C, Bonanno E, Vexler V, Massari R, Trotta C, et al. Radiolabeled humanized anti-CD3 monoclonal antibody visilizumab for imaging human T-lymphocytes. *J Nucl Med.* 2009 Oct;50(10):1683-91.

Mancardi DA, Albanesi M, Jönsson F, Iannascoli B, Van Rooijen N, Kang X, et al. The high-affinity human IgG receptor FcγRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood.* 2013 Feb 28;121(9):1563-73.

Marques FL, Okamoto MR, Buchpiguel CA. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. *Radiol Bras.* 2001;34:233-9.

Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986 Dec;46(12 Pt 1):6387-92.

Meares CF, Goodwin DA. Linking radiometals to proteins with bifunctional chelating agents. *J Protein Chem.* 1984 Apr;3(2): 215-228.

Meikle SR, Kench P, Kassiou M, Banati RB. Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. *Phys Med Biol.* 2005 Nov 21;50(22):R45-61.

Miller DM, Flaherty KT, Tsao H. Current status and future directions of molecularly targeted therapies and immunotherapies for melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 2014 Jun;33(2):60-7.

Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007 Dec 27;357(26):2666-76.

Miyake H, Hara I, Yoshimura K, Eto H, Arakawa S, Wada S, et al. Introduction of basic fibroblast growth factor gene into mouse renal cell carcinoma cell line enhances its metastatic potential. *Cancer Res*. 1996 May 15;56(10):2440-5.

Moscatelli D, Presta M, Rifkin DB. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:2091–2095.

National Research Council (US). Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. *Monoclonal Antibody Production*. Washington (DC): Nat Acad Press; 1999.

National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington (DC): Nat Acad Press. 2011.

NCBI BLAST *web-site*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acessado em 10.02.2014.

Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct;9(10):767-74.

Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):274-84.

Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86:356–361.

Nobbmann U, Connah M, Fish B, Varley P, Gee C, Mulot S, et al. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2007;24:117-28.

Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohalm J, Ulbrich K, Akaike T, et al. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res.* 1998 Mar;89(3):307-14.

Novak EM, Metzger M, Chammas R, da Costa M, Dantas K, Manabe C, et al. Downregulation of TNF-alpha and VEGF expression by Sp1 decoy oligodeoxynucleotides in mouse melanoma tumor. *Gene Ther.* 2003 Nov;10(23):1992-7.

Oliveira MLS, Neto JC, Krieger JE, Raw I, Ho PL. Site-directed mutagenesis of bovine FGF-2 cDNA allows the production of the human-form of FGF-2 in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters.* 2001;23:1151-1157.

Oliveira MLS, Neto JC, Krieger JE, Raw I, Ho PL. Site-directed mutagenesis of bovine FGF-2 cDNA allows the production of the human-form of FGF-2 in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters.* 2001;23:1151-1157.

Olivier S, Mehtali M. [Alternative production systems for therapeutic monoclonal antibodies]. *Med Sci (Paris).* 2009 Dec;25(12):1163-8.

Otake AH, Mattar AL, Freitas HC, Machado CM, Nonogaki S, Fujihara CK, et al. Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010 May;66(1):79-87.

Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 20:Unit 20.1.

Parise CB, Lisboa B, Takeshita D, Sacramento CB, de Moraes JZ, Han SW. Humoral immune response after genetic immunization is consistently improved by electroporation. *Vaccine.* 2008 Jul 23;26(31):3812-7.

Paul M, Vieillard V, Da Silva Lemos R, Escalup L, Astier A. Long-term physico-chemical stability of diluted trastuzumab. *Int J Pharm.* 2013 May 1;448(1):101-4.

Plum SM, Holaday JW, Ruiz A, Madsen JW, Fogler WE, Fortier AH. Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. *Vaccine*. 2000 Dec 8;19(9-10):1294-303.

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Sep;7(3):165-97.

Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Apr;16(2):159-78.

Rastrelli M, Alaibac M, Stramare R, Chiarion Sileni V, Montesco MC, Vecchiato A, et al. Melanom

Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 9;334(4):1004-13.

Rawlins M, Dillon A. Cost-effectiveness considerations at NICE. *Lancet*. 2008 Oct 11;372(9646):1302.

Reff ME, Hariharan K, Braslawsky G. Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Control*. 2002;9(2):152-66.

Reiland J1, Kempf D, Roy M, Denkins Y, Marchetti D. FGF2 binding, signaling, and angiogenesis are modulated by heparanase in metastatic melanoma cells. *Neoplasia*. 2006 Jul;8(7):596-606.

Rennen HJ, Boerman OC, Koenders EB, Oyen WJ, Corstens FH. Labeling proteins with Tc-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC): optimization of the conjugation reaction. *Nucl Med Biol*. 2000 Aug;27(6):599-604.

Rigel DS. Malignant melanoma: Incidence issues and their effect on diagnosis and treatment in the 1990's. *Mayo Clinic Proc*. 1997; 72: 367-371.

Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):715-25. Epub 2007 Aug 17.

Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control*. 2002 Mar-Apr;9(2 Suppl):36-44.

Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J*. 2006 Aug 4;8(3):E501-7.

Sacramento CB, da Silva FH, Nardi NB, Yasumura EG, Baptista-Silva JC, Beutel A, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and granulocyte colony-stimulating factor double gene therapy in mouse limb ischemia. *J Gene Med*. 2010 Mar;12(3):310-9.

Saha GB. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 6th edition. New York: Springer; 2010.

Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and Molecular Biology of Human Melanoma. *Cancer Biol Ther*. 2002 Jan-Feb;1(1):14-7.

Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52.

Schwartz DA, Abrams MJ, Hauser MM, Gaul FE, Larsen SK, Rauh D, Zubieta JA. Preparation of hydrazino-modified proteins and their use for the synthesis of ^{99m}Tc-protein conjugates. *Bioconjug Chem*. 1991 Sep-Oct;2(5):333-6.

Scott AM, Allison JP, Wolchok JD. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun*. 2012;12:14.

Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*. 1984 Mar 23;223(4642):1296-9.

Siiman O, Burshteyn A. Cell surface receptor-antibody association constants and enumeration of receptor sites for monoclonal antibodies. *Cytometry*. 2000 Aug 1;40(4):316-26.

Sineh Sepehr K, Baradaran B, Majidi J, Abdolalizadeh J, Aghebati L, Zare Shahneh F. Mass-Production and Characterization of Anti-CD20 Monoclonal Antibody in Peritoneum of Balb/c Mice. *Adv Pharm Bull*. 2013;3(1):109-13.

Smith GP. Kinetics of amine modification of proteins. *Bioconjug Chem*. 2006 Mar-Apr;17(2):501-6.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85.

Sodee DB, Ellis RJ, Samuels MA, Spirnak JP, Poole WF, Riester C, et al. Prostate cancer and prostate bed SPECT imaging with ProstaScint: semiquantitative correlation with prostatic biopsy results. *Prostate*. 1998 Nov 1;37(3):140-8.

Sonoda M, Takano M, Miyahara J, Kato H. Computed radiography utilizing scanning laser stimulated luminescence. *Radiology*. 1983 Sep;148(3):833-8.

Stockmann C, Doedens A, Weidemann A, Zhang N, Takeda N, Greenberg JI, et al. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*. 2008 Dec 11;456(7223):814-8.

Storch D, Béhé M, Walter MA, Chen J, Powell P, Mikolajczak R, et al. Evaluation of [^{99m}Tc/EDDA/HYNIC0]octreotide derivatives compared with [¹¹¹In-DOTA0,Tyr3,Thr8]octreotide and [¹¹¹In-DTPA0]octreotide: does tumor or pancreas uptake correlate with the rate of internalization? *J Nucl Med*. 2005 Sep;46(9):1561-9.

Strome SE, Sausville EA, Mann D. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist*. 2007 Sep;12(9):1084-95.

Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, et al. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* 2000 Apr;57(4):1521-38.

Suemizu H, Kawai K, Higuchi Y, Hashimoto H, Ogura T, Itoh T, et al. A versatile technique for the in vivo imaging of human tumor xenografts using near-infrared fluorochrome-conjugated macromolecule probes. *PLoS One.* 2013 Dec 17;8(12):e82708

Takahashi K, Kohda K, Miyahara J. Mechanism of photostimulated luminescence in BaFX:Eu²⁺ (X=Cl,Br) phosphors. *J. Lumin.*, 31–32 (1984), pp. 266–268.

Telikepalli SN, Kumru OS, Kalonia C, Esfandiary R, Joshi SB, Middaugh CR, et al. Structural Characterization of IgG1 mAb Aggregates and Particles Generated Under Various Stress Conditions. *J Pharm Sci.* 2014 Mar;103(3):796-809.

Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res.* 2004 May 1;64(9):2941-55.

Vieira SC, Silva BB, Pinto GA, Vassallo J, Moraes NG, Santana JO, et al. CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. *Pathol Res Pract.* 2005;201(4):313-8.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 1;20(3):719-26.

Vonderheide RH, Glennie MJ. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013 Mar 1;19(5):1035-43.

Wang J, Lin D, Peng H, Huang Y, Huang J, Gu J. Cancer-derived immunoglobulin G promotes tumor cell growth and proliferation through inducing production of reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* 2013 Dec 5;4:e945

Wang Y, Becker D. Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* 1997, 3:887–893.

Wascher TC. Long-term statin safety and efficacy in secondary prevention: can combination therapy improve outcomes? *Atheroscler Suppl.* 2003 Dec;4(5):11-6.

Wei L, Shi J, Afari G, Bhattacharyya S. Preparation of clinical-grade (89) Zr-panitumumab as a positron emission tomography biomarker for evaluating epidermal growth factor receptor-targeted therapy. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2014 Jan;57(1):25-35.

Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010 May;10(5):317-27.

Wright A, Sato Y, Okada T, Chang K, Endo T, Morrison S. In vivo trafficking and catabolism of IgG1 antibodies with Fc associated carbohydrates of differing structure. *Glycobiology.* 2000 Dec;10(12):1347-55.

Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res.* 1998 Jan 1;58(1):159-65.

Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, et al. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 1993, 53:5289–5296.

Yokoyama WM. Production of monoclonal antibody supernatant and ascites fluid. *Curr Protoc Mol Biol.* 2008 Jul;Chapter 11:Unit 11.10.

Zhang A, Singh SK, Shirts MR, Kumar S, Fernandez EJ. Distinct aggregation mechanisms of monoclonal antibody under thermal and freeze-thaw stresses revealed by hydrogen exchange. *Pharm Res.* 2012 Jan;29(1):236-50.

Zhang Q, Chen G, Liu X, Qian Q. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy. *Cell Res.* 2007a Feb;17(2):89-99.

Zhang Q, Qian WJ, Knyushko TV, Clauss TR, Purvine SO, Moore RJ, et al. A method for selective enrichment and analysis of nitrotyrosine-containing peptides in complex proteome samples. *J Proteome Res.* 2007 Jun;6(6):2257-68.

Zolle I. Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine. New York: Springer Berlin Heidelberg; 2007.

Zuckier LS, Berkowitz EZ, Sattenberg RJ, Zhao QH, Deng HF, Scharff MD. Influence of affinity and antigen density on antibody localization in a modifiable tumor targeting model. *Cancer Res.* 2000 Dec 15;60(24):7008-13.

ANEXO I

Carta de aprovação pelo Comitê de Ética¹

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/10/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0942/09**, intitulado: "**AValiação de Mecanismos Antitumorais do Anticorpo Anti-FGF2 em Modelo de Melanoma Murino**" apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Roger Chammas**

Pesquisador (a) Executante: **Rodrigo Barbosa de Aguiar**

CAPPesq, 08 de Outubro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

¹ O trabalho "Aplicação diagnóstica e terapêutica de um novo anticorpo anti-FGF2 em processos de angiogênese em melanoma experimental" está contido no Protocolo de Pesquisa nº. 0942/09 acima mencionado.

ANEXO II

Aplicação de células de hibridoma gama-irradiadas como estratégia para administração de anticorpos monoclonais

LISTA DE FIGURAS

FIGURA AII-1. Esquema simplificado do decaimento de ^{137}Cs a ^{137}Ba	2
FIGURA AII-2. Estabelecimento das condições de irradiação das células de hibridoma 3F12E7 com fótons gama provenientes do decaimento de ^{137}Cs	4
FIGURA AII-3. Proliferação e secreção de anticorpos monoclonais pós-exposição de células de hibridoma à fonte de ^{137}Cs	6
FIGURA AII-4. Detecção de mAb anti-FGF2 no soro de animais injetados com células 3F12E7 gama-irradiadas	7

CENÁRIO

Anticorpos monoclonais direcionados a alvos expressos no microambiente tumoral ocupam um espaço importante no campo terapêutico de tumores (Vacchelli E et al., 2014).

Uma possível estratégia a ser explorada para a infusão sistêmica de imunoglobulinas é o emprego de ferramentas que propiciem uma entrega constante e contínua desses agentes terapêuticos, dentro de um modelo de dosagem metronômica.

A manutenção dos níveis séricos de IgG é desejável em abordagens antiangiogênicas, cuja descontinuação pode resultar em revascularização acelerada de tumores, superior à observada no início do tratamento, com consequente aumento da agressividade tumoral e de sua capacidade invasiva (Zuniga RM et al., 2010; Mautner VF et al., 2010). Ainda, uma entrega sustentada do produto terapêutico acarreta em menor frequência de injeções e, assim, em maior conforto ao paciente.

Dentro desse contexto, o uso de hibridomas como veículo para a administração de anticorpos monoclonais parece ser uma abordagem interessante. Essas células são geradas a partir de clones de células B, que produzem anticorpos monoclonais específicos para um determinado epítopo, fusionados com células de mieloma imortalizadas (Kohler G et al., 1975).

A aplicação terapêutica de células requer mecanismos que bloqueiem sua taxa proliferativa. Uma possibilidade a ser considerada é o uso de baixas doses de radiação ionizante como estratégia para interromper a proliferação celular, sem interferir em sua capacidade secretória. Alterações no padrão de crescimento e parada de ciclo celular são respostas celulares comuns ao estresse genotóxico decorrente de radiação ionizante (Fornace AJ Jr, 1992).

O contato com radiação pode ser alcançado através da exposição à fonte de ^{137}Cs . O isótopo ^{137}Cs ($T_{1/2} = 30$ anos) desintegra-se por emissão de partículas β^- ao isômero metaestável de baixa energia ^{137m}Ba , o qual, por sua vez, decai em poucos minutos ($T_{1/2} = 2,55$ min) para o estado fundamental do núcleo de bário (^{137}Ba), através da emissão de fóton gama de 661 keV (Hsue ST et al., 1966; **Fig. AII-1**).

Figura AII-1. Esquema simplificado do decaimento de ^{137}Cs a ^{137}Ba (Hsue ST et al., 1966).

Assim, exploramos a habilidade de células de hibridoma γ -irradiadas em entregar anticorpo monoclonal *in vivo*. Para esse propósito, nós determinamos (1) a viabilidade dessas células após irradiação com fótons gama e (2) sua habilidade em secretar anticorpos *in vitro* e *in vivo* após a irradiação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células de hibridoma 3F12E7 (secretoras de mAb anti-FGF2) e 1F5H2 (secretoras de mAb ligante de CEA; controle de isotipo) foram suspensas em meio RPMI-1640 desprovido de soro fetal bovino (SFB) e expostas, no interior de tubos cônicos de centrifugação, a raios gama procedentes de fonte de ^{137}Cs (taxa de 3,5 Gy/min). Utilizou-se equipamento Gammacell[®] Elan 3000 (Nordion International, Canadá) de uso multiusuário da Escola Paulista de Medicina.

Na sequência, para avaliarmos o efeito da irradiação na capacidade proliferativa de 3F12E7 e de 1F5H2, essas células foram lavadas em solução salina fosfato-

tamponada pH 7,4 (PBS) e incubadas em meio de cultura RPMI-1640 contendo 10% (v/v) de SFB em placa de 24 poços (1×10^5 células por poço). O monitoramento da ausência de replicação celular e da taxa de morte foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 h pós-irradiação, através do método de exclusão por azul de tripan (Sigma-Aldrich, EUA), em microscópio de luz convencional.

Para aplicação *in vivo*, as células de hibridoma 3F12E7 e 1F5H2 γ -irradiadas foram lavadas em PBS e, na sequência, ressuspensas em meio RPMI-1640 desprovido de SFB. 1×10^7 céls/animal (100 μ L) foram implantadas intraperitonealmente em camundongos C57Bl/6. O manejo dos animais de experimentação e a coleta de sangue para obtenção de soro foram conduzidos conforme os itens **3.3** e **3.6** de **MATERIAIS E MÉTODOS** da tese, respectivamente.

A detecção de mAbs anti-FGF2 e ligante de CEA em amostras de sobrenadante de cultura celular e de soro de camundongo (diluído 1:200 em PBS/BSA 0,1%) foi obtida por ELISA indireto em placas de poliestireno de 96 poços (Falcon®, Becton Dickinson, EUA), com poços recobertos com antígeno FGF2 conforme item **3.7** de **MATERIAIS E MÉTODOS** da tese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos *in vitro* foram realizados com o propósito de estabelecer as condições de irradiação para que as células de hibridoma 3F12E7 não crescessem, porém mantivessem sua capacidade secretória. Para isso, suspensões dessas células foram expostas a uma única dose de radiação gama proveniente de fonte de ^{137}Cs . Foram utilizadas doses de 2 a 30 Gy. Em 24, 48 e 72 h pós-irradiação, o número de células foi

contado em microscópio de luz convencional pelo método de exclusão por azul de tripan.

Nota-se no gráfico apresentado na **Fig. AII-2** que doses inferiores a 10 Gy são suficientes para interferir no potencial replicativo das células 3F12E7. Apesar da alta taxa de morte associada à irradiação – cerca de 70% das células apresentam-se mortas 24 h após exposição a uma única dose de 6 Gy –, uma parcela das células se manteve viável durante um período de 72 h em condições *in vitro*.

Figura AII-2. Estabelecimento das condições de irradiação das células de hibridoma 3F12E7 com fótons gama provenientes do decaimento de ^{137}Cs . Células não irradiadas foram utilizadas como controle experimental. Resultado representativo de três experimentos independentes. Ensaio em triplicatas.

A irradiação dessas células com dose única de 2, 4 ou 6 Gy resulta em viabilidade pós-irradiação semelhante, tendo como base um período de observação de 72 h (**Fig. AII-2**). Doses de 6 Gy (600 rad; correspondente a 1,7 min de exposição à fonte de ^{137}Cs) foram selecionadas para estudos posteriores, com as quais obteve-se

resultados similares tanto para 3F12E7 quanto 1F5H2 (secretoras de ligante de CEA IgG1, utilizado como controle de isotipo) (**Fig. AII-3**).

Estudos imunoenzimáticos revelam que células 3F12E7 e 1F5H2 γ -irradiadas possuem potencial de secretar anticorpos tanto em condições *in vitro* (**Fig. AII-3**), bem como *in vivo*, quando implantadas intraperitonealmente em camundongos C57Bl/6 (**Fig. AII-4**). Entretanto, nota-se uma significativa queda nos níveis séricos detectáveis de imunoglobulina anti-FGF2 48 h pós-inóculo de células 3F12E7 irradiadas, quando comparado com o obtido no tempo 24 h, o que é condizente com a redução do número de células viáveis.

De modo geral, essa informação sugere que, para mantermos níveis séricos sustentados de mAb anti-FGF2, objetivo inicial de nossa proposta terapêutica, serão necessários inóculos periódicos das células 3F12E7 γ -irradiadas. É importante apontar que não se observou formação de ascites nem alteração comportamental dos animais tratados com essas células dentro de um período de sete dias, comparado com o de animais tratados com solução salina (controle experimental).

Apesar de não conseguirmos manter uma entrega contínua do anticorpo a partir de um único inóculo, os resultados mostram que, quando implantadas em modelo animal, células de hibridoma previamente expostas à radiação ionizante conseguem, de modo satisfatório, secretar anticorpo na corrente sanguínea em níveis detectáveis por ELISA. Assim, a aplicação de anticorpos monoclonais por intermédio do implante de células de hibridoma γ -irradiadas fornece um sistema experimental alternativo à infusão exógena de solução contendo imunoglobulina purificada.

Figura AII-3. Proliferação e secreção de anticorpos monoclonais pós-exposição de células de hibridoma à fonte de ^{137}Cs . (A) Porcentagem de células de hibridoma 3F12E7 e 1F5H2 viáveis após exposição à dose de 600 rad, em fonte de ^{137}Cs (3,5 Gy/min). Células viáveis foram contadas pelo método de exclusão por azul de tripan. Detecção por ELISA de anticorpos monoclonais anti-FGF2 (B) e ligante de CEA (C) no sobrenadante de células de hibridoma 3F12E7 e 1F5H2 γ -irradiadas, respectivamente (1×10^5 células no tempo 0 h; meio de cultura trocado a cada 24 h). Dados representativos de três experimentos independentes. Experimentos conduzidos em triplicatas.

Figura AII-4. Detecção de mAb anti-FGF2 no soro de animais injetados com células 3F12E7 gama-irradiadas. Detecção por ELISA de anticorpos anti-FGF2 em amostras de soro coletadas de animais injetados intraperitonealmente com células de hibridoma 3F12E7 expostas à fonte de ^{137}Cs . Soro de animais que receberam células 1F5H2 (secretores de anticorpo controle de isotipo) γ -irradiadas foi utilizado como controle negativo do ensaio. Medidas foram conduzidas em triplicatas com amostras diluídas 1:200 ($n=7$ por grupo). Resultados similares foram obtidos em imunoenensaio realizado para detectar os níveis séricos de imunoglobulina ligante de CEA em amostras de soro de animais implantados com células 1F5H2 irradiadas (dados não apresentados). Análise estatística foi realizada utilizando teste t-student e diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. (* $p<0,05$ comparado com o correspondente grupo 1F5H2; # $p<0,05$ comparado com o grupo 3F12E7 24 h).

Vale destacar que os dados apresentados colocam o uso de células secretoras de imunoglobulinas como um campo promissor na terapia celular. A encapsulação de células de hibridoma por polímeros estáveis, biocompatíveis e semipermeáveis é uma

possível alternativa à irradiação a ser considerada para a entrega contínua desses produtos terapêuticos biologicamente ativos, conforme proposto anteriormente em trabalhos na literatura (Orive G et al., 2001; Murua A et al., 2007; McLenachan S et al., 2007; Dubrot J et al., 2010). O uso de cápsulas para imobilizar células de hibridoma fornece um mecanismo de proteção celular ao estresse mecânico, bem como uma barreira imunológica, de modo a manter essas células híbridas não autólogas fora de contato imediato com o sistema imune, mas, ao mesmo tempo, permitir a troca de nutrientes e oxigênio com os arredores (Orive G et al., 2001). Além disso, o uso de células mesenquimais modificadas para secretar anticorpos de interesse, na forma de fragmento variável de cadeia única (ScFv), nos parece um caminho interessante a ser seguido para o tratamento de tumores (Balyasnikova IV et al., 2010a; Balyasnikova IV et al., 2010b).

CONCLUSÃO

A irradiação de células de hibridoma 3F12E7 e 1F5H2 com fótons gama resulta em inibição de seu potencial proliferativo e em morte celular. O percentual de células viáveis pós-irradiação mantém sua atividade de secretar imunoglobulinas, o que as tornam uma possível ferramenta a ser explorada para a administração de anticorpos de potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS

Balyasnikova IV, Ferguson SD, Sengupta S, Han Y, Lesniak MS. Mesenchymal stem cells modified with a single-chain antibody against EGFRvIII successfully inhibit the growth of human xenograft malignant glioma. *PLoS One*. 2010a Mar 18;5(3):e9750.

Balyasnikova IV, Franco-Gou R, Mathis JM, Lesniak MS. Genetic modification of mesenchymal stem cells to express a single-chain antibody against EGFRvIII on the cell surface. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010b Jun;4(4):247-58.

Dubrot J, Portero A, Orive G, Hernández RM, Palazón A, Rouzaut A, et al. Delivery of immunostimulatory monoclonal antibodies by encapsulated hybridoma cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Nov;59(11):1621-31.

Fornace AJ Jr. Mammalian genes induced by radiation; activation of genes associated with growth control. *Annu Rev Genet*. 1992;26:507-26.

Hsue ST, Langer LM, Tang SM. Precise determination of the shape of the twice forbidden beta spectrum of ¹³⁷Cs. *Nucl. Phys.*, 1966. 86(1), p. 47-55.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.

Mautner VF, Nguyen R, Knecht R, Bokemeyer C. Radiographic regression of vestibular schwannomas induced by bevacizumab treatment: sustain under continuous drug application and rebound after drug discontinuation. *Ann Oncol*. 2010 Nov;21(11):2294-5.

McLenachan S, Sarsero JP, Ioannou PA. Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. *Genomics*. 2007 Jun;89(6):708-20.

Murua A, de Castro M, Orive G, Hernandez RM, Pedraz JL. In vitro characterization and in vivo functionality of erythropoietin-secreting cells immobilized in alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules. *Biomacromolecules*. 2007 Nov;8(11):3302-7.

Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Rojas A, Pedraz JL. Microencapsulation of an anti-VE-cadherin antibody secreting 1B5 hybridoma cells. *Biotechnol Bioeng*. 2001 Dec;76(4):285-94.

Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Zitvogel L, et al. Trial Watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2014 Jan 1;3(1):e27048.

Zuniga RM, Torcuator R, Jain R, Anderson J, Doyle T, Schultz L et al. Rebound tumour progression after the cessation of bevacizumab therapy in patients with recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol*. 2010 Sep;99(2):237-42.

ANEXO III
Participação de anti-FGF2 3F12E7 IgG em processos de cicatrização
tecidual

LISTA DE FIGURAS

FIGURA AIII-1. Camundongo C57Bl/6 portador de lesão cutânea	4
FIGURA AIII-2. Anticorpo anti-FGF2 3F12E7 não compromete significativamente a cicatrização tecidual por segunda intenção em animais desprovidos de tumor	7
FIGURA AIII-3. Anti-FGF2 3F12E7 IgG acelera o início da cicatrização tecidual em animais portadores de tumor B16-F10.....	9
FIGURA AIII-4. Plano experimental para aquisição de imagens SPECT/CT de camundongos portadores de lesão cutânea.....	11
FIGURA AIII-5. FGF2 participa de processo de cicatrização tecidual.....	12
FIGURA AIII-6. Captação de ^{99m} Tc-HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em ferida cutânea em camundongos C57Bl/6	14

CENÁRIO

Angiogênese é uma etapa essencial no processo de cicatrização. Novos vasos sanguíneos são requeridos para o suprimento de oxigênio e nutrientes, remoção de *debris* celulares e formação de um tecido de granulação (Tonnesen MG et al., 2000).

Partindo dessa premissa, um dos pontos críticos a respeito de terapias antiangiogênicas é a sua possível interferência em eventos de cicatrização tecidual. Um exemplo é o bevacizumabe, anticorpo monoclonal IgG1 específico para VEGF, um dos fatores angiogênicos mais estudados. Apesar de seu uso ser vinculado a um aumento de sobrevida livre de progressão em diversos tumores, bevacizumabe está associado a múltiplas complicações no processo de cicatrização tecidual, como deiscência, equimose, sangramento no sítio da lesão e infecção local (Gordon CR e al., 2009). Esse é o motivo pelo qual se recomenda a interrupção do tratamento por mais de quarenta dias antes de cirurgias e o reinício do tratamento apenas quatro semanas após a intervenção cirúrgica.

Essas informações são suportadas pela literatura. Hurwitz e colaboradores (Hurwitz H et al., 2004) demonstraram uma quantidade significativa de sítios cirúrgicos com sangramento em pacientes portadores de câncer colorretal dentro de 60 dias de cirurgia. Ainda, trabalho de Scappaticci (Scappaticci FA et al., 2005) aponta para significativo aumento de complicações na cicatrização tecidual em pacientes submetidos a cirurgia sem prévia interrupção do tratamento com bevacizumabe, comparado com o obtido em pacientes não tratados previamente com esse anticorpo.

Tal questão influencia consideravelmente decisões médicas, sendo necessário levar em consideração os riscos e benefícios da cirurgia em pacientes sob tratamento com bevacizumabe, uma vez que a interrupção pode comprometer significativamente a resposta desejada.

FGF compreende uma família de 23 membros diferentes que regulam a proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de vários tipos celulares. Sua participação ocorre não apenas na angiogênese patológica, como também no reparo tecidual. Secretado por uma variedade de células no sítio da lesão, o que inclui queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas, condrócitos e mastócitos, FGF2 é um importante mitógeno e quimioatraente para células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. Esse fator estimula o metabolismo celular, depósito de matriz extracelular e movimentação de células de origem mesodérmica (Barrientos S et al., 2008).

Achados de Shi HX e colaboradores apontam para a participação de FGF2 na cicatrização tecidual em lesões não-patológicas em pele de ratos. A administração local de FGF2 acelera a cicatrização tecidual, com aumento da produção e subsequente depósito de colágeno no local da ferida (Shi HX et al., 2013).

Dentro desse cenário, perguntamos: o anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7, aqui proposto como uma ferramenta de potencial uso terapêutico apontado em estudos com melanoma experimental B16-F10, interfere na cicatrização tecidual?

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Estudo de cicatrização tecidual por segunda intenção *in vivo*

Lesões circulares, de 5 mm de diâmetro, foram realizadas em região dorso-cervical de camundongos C57Bl/6, portadores ou não de melanoma B16-F10 (**Fig. AIII-1**).

As lesões foram realizadas empregando-se *punch* dermatológico (Kolplast, Brasil) estéril, após tricotomia do pelo local e assepsia com EtOH 70% (v/v). Todo o procedimento foi conduzido no interior de cabine de fluxo laminar, em animais sob anestesia com 100 mg/kg de cloridrato de quetamina (Vetanarcol®; König, Argentina) e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan; Vetbrands, Brasil) (Damy SB et al., 2010). O dia da lesão foi definido como dia 0. Os animais do grupo portador de tumor receberam via veia caudal 500 mil células viáveis de B16-F10 sete dias antes da incisão.

O tratamento foi realizado endovenosamente, via veia caudal, nos dias 0, 2, 4 e 6 com anti-FGF2 3F12E7 IgG (2 mg/kg; 100 µL) ou com anticorpo 1F5H2 (controle de isotipo; 2 mg/kg). $N \geq 5$ /grupo.

As lesões foram fotografadas diariamente a partir da data da incisão. Uma régua foi posicionada ao lado de cada um dos animais com o propósito de normalizar o tamanho das fotografias adquiridas. A área aberta das feridas foi calculada através da análise dessas imagens em software ImageJ versão 1,41 (NIH, EUA). A taxa de fechamento das incisões foi determinada considerando a área da lesão no dia 0 como sendo 100%.

Figura AIII-1. Camundongo C57Bl/6 portador de lesão cutânea. Lesão circular de 5 mm de diâmetro foi realizada com auxílio de *punch* dermatológico (instrumento metálico circular cortante) estéril, após raspagem do pelo local e assepsia com EtOH 70% (v/v). Seta indica lesão, localizada em região dorso-cervical do camundongo, no dia 1 pós-incisão.

2. Imagem SPECT/CT *in vivo* e estudos de biodistribuição *ex vivo* em animais portadores de lesão

O acesso do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 ao local da lesão foi determinado por meio de aquisição de imagens SPECT/CT *in vivo* bem como de estudos de biodistribuição *ex vivo*, utilizando ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG (ou ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 IgG, como controle de isotipo) (n=4/grupo). Foram utilizados camundongos C57Bl/6 portadores de lesão em área dorso-cervical da pele. Estudos conduzidos no 3º dia pós-injúria.

A aquisição de imagens cintilográficas foi realizada após inóculo via veia caudal de 37 MBq (100 μL) de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG (10 mg/kg de IgG por animal) ou de ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2 IgG (controle de isotipo). Os procedimentos de aquisição SPECT/CT são apresentados no item **3.25 de MATERIAIS**

E MÉTODOS da tese. Estudos realizados com anticorpos ^{99m}Tc -marcados com pureza radioquímica superior a 90%.

Regiões de interesse bidimensionais (ROI; do inglês *region of interest*) foram delimitadas manualmente ao redor da ferida no plano sagital do SPECT, utilizando as imagens CT como referência anatômica, e o seu valor médio de contagem por pixel () determinado, conforme descrito anteriormente (Hirano T et al., 1995). Uma ROI de mesma área foi desenhada em região de pele desprovida de lesão para a obtenção dos valores médios de CPP de fundo (*background*). Análise realizada em software PMODTM, versão 3,503 (PMOD Technologies Ltd., Suíça).

Os valores da razão foram calculados para cada animal injetado com ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG e comparados com os obtidos para o grupo injetado com anticorpo inespecífico ^{99m}Tc -HYNIC-ligante de CEA 1F5H2.

Após a aquisição das imagens, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram a radioatividade associada à lesão determinada. Para isso, fragmentos de pele com ferida e de pele desprovida de lesão foram coletados, tiveram sua massa mensurada em balança analítica e, na sequência, foram aferidos quanto à radioatividade em contador automático de radiação gama tipo poço Wallac 1480 Wizard 3'' (PerkinElmer Inc., Finlândia). Os valores da razão (%ID/g pele com ferida)/(%ID/g pele desprovida de lesão) foram calculados a partir da equação abaixo:

(Equação AIII-1)

onde CPM = contagens por minuto e m = massa do tecido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar o papel do anticorpo monoclonal anti-FGF2 3F12E7 na cicatrização tecidual, nós avaliamos a taxa de fechamento de feridas circulares de 5 mm de diâmetro, em área dorso-cervical de camundongos C57Bl/6. A área da lesão foi fotografada diariamente e o processo de cicatrização foi quantificado na forma de percentual da área da lesão, comparada com a inicial.

Em animais desprovidos de tumor, nota-se um aparente atraso no fechamento da ferida entre os dias 1 e 4 pós-incisão cirúrgica. Entretanto, não se observou diferença significativa em comparação com o obtido no grupo controle, tratado com anticorpo inespecífico de mesmo isotipo (teste t-Student; n=5 por grupo). A partir do dia 5 pós-incisão, as curvas de fechamento da lesão passam a ficar sobrepostas, o que aponta para ausência de comprometimento na cicatrização tecidual a longo prazo (**Fig. AIII-2**).

Curiosamente, quando lesões de 5 mm são feitas em animais C57Bl/6 portadores de nódulos metastáticos de B16-F10, nota-se uma maior taxa de fechamento da ferida nos animais tratados com o anticorpo anti-FGF2 3F12E7, comparado com o observado nos controles salina e de isotipo (n=7 por grupo) (**Fig. AIII-3**). Essa maior velocidade de cicatrização pode ser resultado do aumento da expressão de fatores pró-angiogênicos compensatórios, produzidos por células do microambiente tumoral em resposta à inibição da disponibilidade de FGF2. Estudos complementares são necessários para entender melhor esse achado.

Figura AIII-2. Anticorpo anti-FGF2 3F12E7 não compromete significativamente a cicatrização tecidual por segunda intenção em animais desprovidos de tumor. (Ver próxima página)

Figura AIII-2. Anticorpo anti-FGF2 3F12E7 não compromete significativamente a cicatrização tecidual por segunda intenção em animais desprovidos de tumor.

(Página anterior) (A) Plano de trabalho. Lesões circulares de 5 mm de diâmetro foram realizadas em região dorso-cervical de camundongos C57Bl/6. Os animais foram tratados via veia caudal, a cada dois dias, com 2 mg/kg (100 µL) de anticorpo anti-FGF2 3F12E7 (ou anticorpo controle de isotipo), a partir da data da lesão. Dois grupos experimentais: anticorpo controle de isotipo 1F5H2, n=5; anticorpo anti-FGF2 3F12E7, n=5. (B) Fotos representativas do local da lesão nos dias 0, 3, 4 e 7. Gráfico (C) apresenta a porcentagem da área da lesão nos dias observados, considerando a área observada no dia 0 como sendo 100%. Não há diferença estatística entre os grupos (teste t-Student não pareado; n=5 por grupo).

Figura AIII-3. Anti-FGF2 3F12E7 IgG acelera o início da cicatrização tecidual em animais portadores de tumor B16-F10. (Ver próxima página)

Figura AIII-3. Anti-FGF2 3F12E7 IgG acelera o início da cicatrização tecidual em animais portadores de tumor B16-F10. (Página anterior) (A) Plano de trabalho. Lesões circulares de 5 mm de diâmetro foram realizadas em região dorso-cervical de camundongos C57Bl/6 sete dias pós-inóculo endovenoso de células B16-F10. Os animais foram tratados endovenosamente, a cada dois dias, com 2 mg/kg (100 µL) de anticorpo anti-FGF2 3F12E7 (ou anticorpo 1F5H2, como controle de isotipo), a partir da data da lesão. Total de três grupos experimentais: salina, n=7; anticorpo controle de isotipo 1F5H2, n=7; anticorpo anti-FGF2 3F12E7, n=7. A eficácia das células B16-F10 em colonizar o parênquima pulmonar foi aferida através da detecção de nódulos no pulmão ao término do experimento (B). (C) Fotos representativas do local da lesão nos dias 0, 3, 4 e 7. Gráfico (D) apresenta a porcentagem da área da lesão nos dias observados, considerando a área observada no dia 0 como sendo 100%. Nos dias 2 e 3, a área lesionada dos animais tratados com anti-FGF2 IgG é significativamente menor que a observada nos animais dos grupos controle. * $p < 0,05$; análise de variância de uma via.

Apesar do acompanhamento longitudinal do fechamento das feridas não evidenciar atraso significativo da cicatrização tecidual na vigência de terapia anti-FGF2 (**Fig. AIII-2** e **Fig. AIII-2**), estudos SPECT/CT *in vivo* realizados no 3º dia pós-lesão cirúrgica apontam para a captação de anticorpo anti-FGF2 3F12E7, em sua forma radiomarcada com ^{99m}Tc , no local da lesão. O plano experimental encontra-se na **Fig. AIII-4**. Imagens CT e SPECT/CT representativas de n=4 animais são apresentadas na **Fig. AIII-5**.

Figura AIII-4. Plano experimental para aquisição de imagens SPECT/CT de camundongos portadores de lesão cutânea. (A) Imagens SPECT/CT foram adquiridas 3 dias pós-lesão cirúrgica em pele de região dorso-cervical, após tricotomia dos pelos locais. (B) Fotografia representativa do local da ferida no momento de aquisição das imagens. Seta aponta local da lesão. Legenda: frag., fragmento; iv, inóculo via veia caudal.

Figura AIII-5. FGF2 participa de processo de cicatrização tecidual. (Ver próxima página)

Figura AIII-5 (Página anterior). FGF2 participa de processo de cicatrização tecidual. Plano sagital de imagens CT e SPECT/CT representativas de camundongos C57Bl/6 portadores de lesão cutânea. Imagens adquiridas 4 h (painel A) e 24 h (painel B) pós-inóculo, via veia caudal, de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG (37 MBq; 50 μg) ou de anticorpo controle de isotipo ^{99m}Tc -HYNIC-1F5H2 (37 MBq; 50 μg). Circunferência em cinza aponta para local da lesão. Circunferência pontilhada em azul aponta para região desprovida de lesão onde ROI foi posicionado para quantificação de pixels em área de referência (*background*) das imagens SPECT (**Fig. AIII-6**). Camundongos desprovidos de lesão foram utilizados como controle da captação local. Todas as imagens SPECT foram ajustadas para o mesmo valor máximo de intensidade de captação. Escala = porcentagem do limiar de intensidade máximo (max; 40% da contagem máxima) e mínimo (min; 0% da contagem máxima). Legenda: F, fígado; C, coração; R, balão pneumático utilizado para detecção do ritmo respiratório dos animais.

Figura AIII-6. Captação de ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG em ferida cutânea em camundongos C57Bl/6. Gráfico (A) apresenta valores da razão obtida a partir de análise das imagens SPECT nos tempos de 4 e 24 h pós-inóculo. Os animais foram injetados com ^{99m}Tc -HYNIC-anti-FGF2 3F12E7 IgG (37 MBq; 1 mCi; 50 μ g) ou ^{99m}Tc -controle de isotipo 1F5H2 IgG. N=4/grupo. Gráfico (B) apresenta as razões obtidas por biodistribuição *ex vivo* em animais sacrificados pós-aquisição SPECT/CT no tempo de 24 h pós-inóculo. * $p < 0,05$ comparado com o obtido para o grupo controle de isotipo; teste t-Student. Legenda: CPP, contagens por pixel; CPM, contagens por minuto; ROI, região de interesse.

Observa-se notável captação do anticorpo anti-FGF2 3F12E7 ^{99m}Tc -marcado em área com ruptura cutânea, evidenciada pelas imagens CT (**Fig. AIII-5**), tanto no tempo de 4 h como 24 h pós-inóculo, comparado com o obtido com o anticorpo controle de isótipo. A análise dos valores de contagem por pixel em imagens SPECT (**Fig. AIII-6A**), bem como dos dados de distribuição *ex vivo* quantificam esse achado (**Fig. AIII-6B**). Apesar de aparentemente maior, não há diferença significativa ($p>0,05$; teste t-student) entre os valores de razão de 4h e de 24 h. Contribuem para este resultado o fato de que, apesar da depuração sanguínea do anticorpo no intervalo de tempo observado (%ID/g no sangue: $30,5\pm 1,5$, em 4 h vs $20,0\pm 0,4$, em 24 h; ver **RESULTADOS – PARTE II-B** da tese), há aumento nos níveis de radioatividade detectados em fragmentos de pele e de músculo esquelético. Os valores de %ID/g em 4 h e 24 h pós-inóculo obtidos são, respectivamente: $3,2\pm 0,6$ vs $5,0\pm 1,5$ em pele dorso-cervical; $0,7\pm 0,1$ vs $1,8\pm 0,8$ em músculo esquelético.

Imagens CT correlacionam a presença de ruptura cutânea com área onde há maior sinal radioativo no SPECT (**Fig. AIII-5**; circunferência em cinza). De modo geral, esses dados cintilográficos sugerem que FGF2 é expresso em processos de cicatrização tecidual, o que vai ao encontro dos achados descritos por Whitby e Ferguson (Whitby DJ et al., 1991), que demonstram, por métodos de imunohistoquímica, a expressão desse fator de crescimento em processos de cicatrização em neonatos e adultos.

CONCLUSÃO

O tratamento com anti-FGF2 3F12E7 IgG não está associado a atraso significativo na cicatrização tecidual de lesões tanto em animais portadores como desprovidos de tumor, apesar de ser observado captação específica desse anticorpo no local da ferida. Essa informação é interessante na medida em que aponta para uma vantagem de estratégias com alvo em FGF2 quando eventos cirúrgicos são frequentes.

REFERÊNCIAS

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008 Sep-Oct;16(5):585-601.

Gordon CR, Rojavin Y, Patel M, Zins JE, Grana G, Kann B, Simons R, et al. A review on bevacizumab and surgical wound healing: an important warning to all surgeons. *Ann Plast Surg.* 2009 Jun;62(6):707-9.

Hirano T, Otake H, Yoshida I, Endo K. Primary lung cancer SPECT imaging with pentavalent technetium-99m-DMSA. *J Nucl Med.* 1995 Feb;36(2):202-7.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun 3;350(23):2335-42.

Scappaticci FA, Fehrenbacher L, Cartwright T, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, et al. Surgical wound healing complications in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *J Surg Oncol.* 2005 Sep 1;91(3):173-80.

Shi HX, Lin C, Lin BB, Wang ZG, Zhang HY, Wu FZ, et al. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013;8(4):e59966.

Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. J Investig Dermatol Symp Proc. 2000 Dec;5(1):40-6.

Whitby DJ, Ferguson MW. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. Dev Biol. 1991 Sep;147(1):207-15.