



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

**ESTUDO COMPARATIVO DA MARCAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD20 COM
¹⁸⁸Re**

CARLA ROBERTA DE BARROS RODRIGUES DIAS

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:
Dr. João Alberto Osso Júnior

São Paulo
2010

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

ESTUDO COMPARATIVO DA MARCAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD20 COM
 ^{188}Re

CARLA ROBERTA DE BARROS RODRIGUES DIAS

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:
Dr. João Alberto Osso Júnior

São Paulo
2010

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

AGRADECIMENTOS

No final destes quatro anos de doutorado quero expressar o meu mais profundo agradecimento...

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

... ao Dr. João Alberto Osso Júnior que, além de orientador é um grande amigo. Agradeço pelos conhecimentos e experiência transmitidos, não só a nível profissional como também a nível pessoal. As palavras são poucas para descrever a minha gratidão por todo o apoio que me foi dado em todos esses anos.

... a Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva e MSc. Marycel Rosa F. F. De Barboza, por me concederem a oportunidade de ingressar na área de Radiofarmácia, transmitirem seus valiosos conhecimentos e iniciar assim a minha passagem pelo mundo da ciência e investigação.

... a toda a minha família, pelo apoio e incentivo constante, em especial aos meus pais José Carlos e Elide por todo o amor, dedicação, esforço, compreensão e incansável apoio ao longo de toda minha vida. Também por toda a educação que, na sua forma simples de a transmitirem, me levou a ser o eu de hoje.

... as grandes amigas, Bárbara Szot Marczewski, Tânia Brambilla, Graciela Barrio e Kátia Suzuki por toda a amizade e carinho e por todas as experiências e momentos compartilhados.

... aos colegas de Pós-Graduação do IPEN e a todas as meninas da "Salinha" pelas palavras de incentivo e pela ajuda nas dificuldades encontradas.

... ao amigo Rodrigo Teodoro, pela parceria nestes quatro anos, pelas longas conversas sobre trabalho, futuro, sonhos, pelas risadas, pelas festas, enfim, por estar presente em muitos momentos, sempre com uma palavra de consolo e incentivo.

... à equipe de controle de qualidade da DIRF, pela paciência e grande colaboração na utilização dos equipamentos, especialmente ao Natanael pela sua grande ajuda na realização dos experimentos em animais.

... aos funcionários da DIRF que contribuíram de alguma maneira na realização deste trabalho.

... as alunas Fabiana, Paula e Tatiana do Centro de Biotecnologia pela ajuda com o crescimento das células e inoculação nos animais.

... ao Dr. Marcelo Mamede do Instituto Nacional de Câncer (INCA/RJ) pela gentil doação de amostras do anticorpo Rituximab e das células de linfoma e ao seu aluno Jânio Mororó pela colaboração no cultivo dessas células.

... a todos os meus amigos que, perto ou longe, me apoiaram nesta fase tão importante da minha vida, sempre com sua amizade incondicional, nos melhores e piores momentos, com a força que só um verdadeiro amigo pode dar.

... ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que proporcionou a execução deste trabalho pela concessão de uma bolsa de estudo e também pela concessão da bolsa de doutorado-sanduíche, que me proporcionou conhecer e trabalhar no *Paul Scherrer Institute (PSI)* na Suíça.

... a todos os outros não mencionados que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão e elaboração deste trabalho.

O meu obrigado a todos vocês... independentemente da proximidade ou distância, as recordações ficarão para sempre...

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

(Clarice Lispector)

ESTUDO COMPARATIVO DA MARCAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD20 COM ^{188}Re

Carla Roberta de Barros Rodrigues Dias

RESUMO

A Medicina Nuclear é uma modalidade de particular importância em oncologia e a investigação de novos radiofármacos direcionados a tumores, seja para diagnóstico e/ou terapia, é uma área de interesse para os pesquisadores. Rituximab (RTX) é um anticorpo monoclonal (AcM) quimérico (IgG 1) que se liga especificamente ao antígeno CD20 com alta afinidade e tem sido usado com sucesso para tratar Linfoma Não-Hodgkin (LNH) de células-B. O antígeno CD20 é expresso sobre mais de 90% dos LNH de células-B. Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) e rênio-188 (^{188}Re) representam um atrativo par de radionuclídeos para uso médico devido as favoráveis propriedades de decaimento para diagnóstico ($^{99\text{m}}\text{Tc}$: $T_{1/2} = 6$ h, radiação $\gamma = 140$ keV) e terapia (^{188}Re : $T_{1/2} = 17$ h, radiação β^- máxima = 2,12 MeV) e por causa de sua disponibilidade graças aos sistemas de geradores correspondentes $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ e $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. Estes dois radionuclídeos podem ser conjugados aos anticorpos usando métodos químicos similares. O objetivo geral deste trabalho foi estudar a marcação do AcM anti-CD20 (Rituximab) com o radioisótopo ^{188}Re usando duas técnicas: método direto de marcação [$^{188}\text{Re}(\text{V})$] e método de marcação via núcleo carbonila [$^{188}\text{Re}(\text{I})$]. Além do controle de qualidade, o anticorpo radiomarcado foi submetido a estudo biológico *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*. Para a marcação direta, o RTX foi reduzido pela incubação com o agente redutor 2-mercaptoetanol para a geração de grupos sulfidrilas (-SH) e posteriormente marcado com $^{188}\text{Re}(\text{V})$, fazendo-se um amplo estudo de variáveis para se chegar a uma formulação otimizada. Para a marcação usando o núcleo carbonila foram usados os radioisótopos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re e dois procedimentos de radiomarcção: (1) RTX nativo marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ e (2) RTX reduzido (RTX_{red}) marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})/^{188}\text{Re}(\text{I})$. Também foi feito um estudo de variáveis para se chegar a formulação otimizada. O método de controle de qualidade para avaliação da pureza radioquímica mostrou um bom rendimento de marcação (93%) para o método direto. Na marcação com o núcleo carbonila, os resultados mostraram que os grupos -SH do anticorpo reduzido são uma possível via de ligação. A formação do composto $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi mais rápida do que $^{188}\text{Re}(\text{I})\text{-RTX}_{\text{red}}$, que por sua vez mostrou melhor estabilidade em plasma humano e nenhuma transquelação no desafio a histidina ou cisteína. Os dois compostos mostraram boa afinidade de ligação e uma biodistribuição em camundongos portadores de tumor coerente com a biodistribuição normal do anticorpo e razoável captação no tumor provando a eficiência do método de marcação e potencial uso clínico.

COMPARATIVE STUDIES OF ANTIBODY ANTI-CD20 LABELED WITH ^{188}Re

Carla Roberta de Barros Rodrigues Dias

ABSTRACT

Nuclear Medicine is an unique and important modality in oncology and the development of new tumor-targeted radiopharmaceuticals for both diagnosis and therapy is an area of interest for researchers. Rituximab (RTX) is a quimeric monoclonal antibody (mAb) (IgG 1) that specifically binds to CD20 antigen with high affinity and has been successfully used for the treatment of Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) of cell B. The CD20 antigen is expressed over more than 90% of cell B NHL. Technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) and rhenium-188 (^{188}Re) are an attractive radionuclide pair for clinical use due to their favorable decay properties for diagnosis ($^{99\text{m}}\text{Tc}$: $T_{1/2} = 6$ h, γ radiation = 140 keV) and therapy (^{188}Re : $T_{1/2} = 17$ h, maximum β^- energy = 2.12 MeV) and to their availability in the form of $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ and $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generators. The radionuclides can be conjugated to mAb using similar chemical procedures. The aim of this work was to study the labeling of anti-CD20 mAb (RTX) with ^{188}Re using two techniques: the direct labeling method [$^{188}\text{Re}(\text{V})$] and the labeling method via the carbonyl nucleus [$^{188}\text{Re}(\text{I})$]. Besides the quality control, the radiolabeled mAb was submitted to *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* biological studies. For the direct labeling, RTX was reducing by incubation with 2-mercaptoethanol for generating sulphhydryl groups (-SH) and further labeled with $^{188}\text{Re}(\text{V})$, in a study of several parameters in order to reach an optimized formulation. The labeling via the carbonyl nucleus both $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and ^{188}Re were employed through 2 different procedures: (1) labeling of intact RTX with $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ and (2) reduced RTX (RTX_{red}) labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})/^{188}\text{Re}(\text{I})$. Also a parameter study was performed to obtain an optimized formulation. The quality control method for evaluating the radiochemical purity showed a good labeling yield (93%) for the direct method. The labeling method via carbonyl group, the results showed that the -SH groups of RTX_{red} are a possible way of labeling. The formulation of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})\text{-RTX}_{\text{red}}$ was faster than $^{188}\text{Re}(\text{I})\text{-RTX}_{\text{red}}$, that on the other hand showed better stability in human plasma and no transchelation in the cysteine or histidine challenge studies. Both compounds showed good binding affinity and a biodistribution in mice bearing tumor compatible with the normal mAb distribution and a reasonable tumor uptake proving the efficiency of the labeling and the potential clinical use.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Linfoma Não-Hodgkin (LNH).....	19
1.2 Anticorpos.....	23
1.2.1 Conceitos básicos.....	23
1.2.2 Mecanismos de Ação.....	25
1.2.3 Anticorpos monoclonais.....	27
1.2.3.1 Anticorpos monoclonais murinos.....	28
1.2.3.2 Anticorpos monoclonais quiméricos, humanizados e totalmente humanos.....	29
1.2.4 Aplicação dos anticorpos monoclonais na terapia de tumores.....	29
1.2.4.1 O antígeno CD20.....	29
1.2.4.2 O anticorpo monoclonal Rituximab	30
1.3 A Medicina Nuclear e os Radiofármacos.....	32
1.3.1 Imagem radionuclídica.....	34
1.3.1.1 Tecnécio-99 meta estável (^{99m}Tc).....	35
1.3.2 Terapia radionuclídica.....	36
1.3.2.1 Radioimunoterapia.....	39
1.3.2.1.1 Rênio-188.....	42
1.4 Métodos de marcação de anticorpos com ^{99m}Tc e ^{188}Re	43
1.4.1 Método direto de marcação.....	44
1.4.2 Método indireto de marcação.....	47
1.4.3 Marcação usando o núcleo carbonila.....	49
2 OBJETIVO.....	54
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	55
3.1 Marcação de anti-CD20 com ^{188}Re	55

3.2 Marcação de anti-CD20 com ^{99m}Tc	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1 Infraestrutura e Equipamentos.....	58
4.2 Lista de Materiais e Reagentes.....	59
4.3 Preparo das soluções.....	61
4.3.1 Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,4.....	61
4.3.2 Tampão Fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 8,0.....	61
4.3.3 Solução de cisteína.....	61
4.3.4 Reagente de Ellman.....	62
4.4 Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$	62
4.5 Sistema de concentração.....	63
4.6 Redução do anticorpo.....	64
4.6.1 Construção da curva de calibração do RTX.....	65
4.7 Determinação dos grupos sulfidrilas livres (-SH).....	65
4.7.1 Construção da curva padrão de cisteína.....	66
4.8 Cultura celular.....	66
4.9 Método de marcação direta: $^{188}\text{Re(V)}$	67
4.9.1 Parâmetros da marcação direta.....	67
4.9.2 Análise radioquímica do $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$	67
4.9.2.1 Cromatografia de papel (CP) e camada delgada (CCD).....	67
4.9.2.2 Cromatografia de filtração em gel (CGF).....	70
4.9.2.2.1 Cromatografia de filtração em gel (CGF) em coluna PD-10.....	70
4.9.3 Desafio a cisteína: $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$	72
4.9.4 Estudos <i>in vivo</i> : $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$	72
4.10 Método de marcação via carbonila.....	73
4.10.1 Preparação do núcleo $[\text{M}(\text{CO})_3]$ ($\text{M} = ^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$).....	73
4.10.2 Método de marcação: núcleo $[\text{M}(\text{CO})_3]$ ($\text{M} = ^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$).....	74
4.10.3 Análise do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{nat/red}}$	75
4.10.4 Desafio a histidina e cisteína: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	75

4.10.5 Estabilidade <i>in vitro</i> do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ no plasma humano..	76
4.10.6 Imunorreatividade: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	76
4.10.7 Afinidade de ligação: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	77
4.10.8 Estudos <i>in vivo</i> : $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	78
4.10.9 Autorradiografia <i>ex vivo</i>	79
4.10.10 Autorradiografia <i>in vitro</i>	79
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	81
5.1 Redução do anticorpo Rituximab.....	81
5.2 Determinação do nº de grupos sulfidrilas (-SH)	83
5.3 Método de marcação direta: $^{188}\text{Re}(\text{V})$	85
5.3.1 Marcação direta: Variáveis e Análise radioquímica usando CP e CCD.....	85
5.3.2 Marcação direta: Análise radioquímica usando CGF em coluna PD-10.....	93
5.3.3 Desafio a cisteína: $^{188}\text{Re}(\text{V})\text{-RTX}_{\text{red}}$	99
5.3.4 Estudos <i>in vivo</i> : $^{188}\text{Re}(\text{V})\text{-RTX}_{\text{red}}$	101
5.4 Método de marcação via carbonila: $\text{M}(\text{CO})_3$ (M = ^{99m}Tc e ^{188}Re).....	104
5.4.1 Desafio a histidina e cisteína: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	117
5.4.2 Estabilidade do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ no plasma humano.....	119
5.4.3 Imunorreatividade e afinidade de ligação do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	120
5.4.4 Estudos <i>in vivo</i> : $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	122
5.4.5 Autorradiografia <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> : $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	128
5.5 Análise comparativa dos resultados das marcações do anticorpo RTX_{red} com ^{188}Re pelos dois métodos estudados: método direto e via carbonila.....	129
6 CONCLUSÕES.....	132
ANEXO – Cromatografia: análise radioquímica do RTX radiomarcado...	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Radionuclídeos usados na técnica PET.....	34
TABELA 2	Radionuclídeos usados na técnica SPECT.....	35
TABELA 3	Alguns radiofármacos de tecnécio-99m e seus usos.....	36
TABELA 4	Vantagens e limitações da terapia radionuclídica.....	37
TABELA 5	Radionuclídeos usados com fins terapêuticos.....	38
TABELA 6	<i>Highlights</i> da história da RAIT para pacientes com LNH.....	41
TABELA 7	Relação da fase estacionária com a fase móvel adotadas nos sistemas cromatográficos CP e CCD.....	68
TABELA 8	Determinação dos R_f dos produtos para cada fase móvel usada.....	69
TABELA 9	Influência da variação do pH no rendimento de marcação do $^{188}\text{Re(V)}\text{-RTX}_{\text{red}}$	92
TABELA 10	Comparação do rendimento de marcação do RTX_{red} marcado com ^{188}Re , eluído de um gerador novo ou passado pelo sistema de concentração	93
TABELA 11	Comparação do rendimento de marcação de duas preparações do $^{188}\text{Re(V)}\text{-RTX}_{\text{red}}$ obtido com a coluna PD-10 usada como controle de qualidade.....	98
TABELA 12	Porcentagem de dissociação da marcação do $^{188}\text{Re(V)}\text{-RTX}_{\text{red}}$ na ausência e na presença de cisteína.....	100
TABELA 13	Biodistribuição do $^{188}\text{Re(V)}\text{-RTX}_{\text{red}}$ em camundongo nude contendo linfoma de células Raji expresso como porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g).....	101
TABELA 14	Efeito da variação da massa de RTX_{nat} no rendimento de marcação.....	106
TABELA 15	Efeito do tempo de incubação no rendimento de marcação do RTX_{nat}	108
TABELA 16	Efeito da massa de RTX_{red} no rendimento de marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$	108

TABELA 17 Efeito do volume de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ no rendimento de marcação do RTX_{red}	110
TABELA 18 Efeito da massa de RTX_{red} no rendimento de marcação com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ para o tempo de incubação de 24 h a 37°C	114
TABELA 19 Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ em camundongo nude contendo linfoma de células Ramos expresso como porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g).....	123
TABELA 20 Biodistribuição do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ em camundongo nude contendo linfoma de células Ramos expresso como porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g)	123

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Estrutura básica das imunoglobulinas. A região N terminal (N) é a região de ligação do antígeno, compreendendo regiões variáveis de ambas as cadeias leve (VL) e pesada (VH). A cadeia pesada contém uma longa região constante, composta da região Fc (fragmento cristalizado), que compreende a extremidade C-terminal (C), e por uma região CH1 após a dobradiça. A cadeia leve também tem uma porção constante (CL) e uma porção variável (VL)..... 24
- FIGURA 2** Tipos de anticorpos monoclonais: AcM murino; AcM quimérico-fusão das cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo de camundongo, com as cadeias constantes humanas, formando moléculas quimeras; AcM humanizado - os protocolos mais modernos de humanização preconizam o transplante das CDR murinas para cadeias variáveis humanas. Esta molécula teria ainda as cadeias constantes de Ig humanas como na quimera e se apresenta de forma suficientemente invisível para o sistema imune..... 28
- FIGURA 3** A classificação dos AcM terapêuticos de acordo com os diferentes tipos de anticorpos: murino, quimérico, humanizado e humano. Destaque para o AcM quimérico Rituximab..... 31
- FIGURA 4** Produção e decaimento do radionuclídeo pai ^{188}W para o radionuclídeo filho ^{188}Re 43
- FIGURA 5** Esquema do método direto de marcação de proteína com o radionuclídeo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ que serve como analogia para o radionuclídeo ^{188}Re 45
- FIGURA 6** Esquema da técnica de pré-marcação (*pre-labeling* ou *pre-formed chelate approach*), a qual envolve primeiro a formação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -quelato BFC e conjugação posterior à biomolécula em uma etapa separada..... 48
- FIGURA 7** Esquema da técnica de pós-marcação (*post-labeling approach*), onde um BFC é primeiramente ligado à biomolécula (BM) para formar o conjugado BFC-BM. Uma vez formado o conjugado BFC-BM, a radiomarcagem pode ser feita pela redução direta do $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ou por troca

de ligante com um complexo intermediário de ^{99m}Tc , como por exemplo $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ -gluconato.....	49
FIGURA 8 (A) Esquema da reação de produção do ^{99m}Tc -carbonila e (B) Foto do kit para produção do ^{99m}Tc -carbonila, chamado de “Isolink” e comercializado pela Mallinckrodt.....	51
FIGURA 9 Esquema do sistema de concentração utilizado.....	64
FIGURA 10 Representação esquemática do desenvolvimento da cromatografia.....	69
FIGURA 11 Curva de calibração obtida para o AcM quimérico RTX.....	81
FIGURA 12 Concentração protéica (mg/mL) obtida para cada fração coletada (1 mL cada) na redução do anticorpo RTX. Este resultado representa a redução de 10 mg de RTX com o agente redutor 2-ME.....	82
FIGURA 13 Curva padrão de cisteína construída para determinação dos grupos -SH.....	83
FIGURA 14 Pureza radioquímica (%) após a variação da massa do anticorpo RTX_{red} . Os parâmetros usados foram: 82,8 mg de tartarato; 1,67 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,25 mg de ácido gentísico, 1 mL de ^{188}Re (542,1 MBq / 14,7 mCi) e pH $5,8 \pm 0,6$ (média \pm DP, $n = 4$). Tempo de reação de 1 h em temperatura ambiente. Os resultados são expressos como média \pm DP: $n = 3$ para 0,25 e 1,0 mg de RTX_{red} e $n = 2$ para 0,5 e 2,5 mg.....	85
FIGURA 15 Pureza radioquímica (%) de acordo com a variação da massa do agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Os resultados são expressos como média \pm DP: $n = 1$ para 0,25 e 7,0 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $n = 3$ para 1,0 mg e $n = 2$ para as outras massas.....	86
FIGURA 16 Pureza radioquímica (%) de acordo com a variação da massa do tartarato. Os resultados são expressos como média \pm DP: $n = 3$ para todas as massas de tartarato.....	88
FIGURA 17 Pureza radioquímica (%) de acordo com a variação do tempo de reação. Os resultados são expressos como média \pm DP: $n = 1$ para 15 e 120 min; $n = 2$ para 30 min e $n = 3$ para 60 min. A atividade foi de 519,7 MBq / 14 mCi e pH $5,9 \pm 0,8$ (média \pm DP, $n = 7$).....	89
FIGURA 18 Estabilidade da marcação da formulação padrão em relação ao tempo e temperatura. No gráfico está expressado a média dos	

resultados, para 4h, $n = 2$ (TA) e $n = 1$ (GE); para 6 h, $n = 2$ (TA e GE) e $n=1$ (GS) e para 24 h, $n = 2$ (TA / GE / GS).....	90
FIGURA 19 Curva de eluição do (A) $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$, (B) $^{188}\text{ReO}_2$ e (C) $^{188}\text{Re(V)RTX}_{\text{red}}$ em PBS 0,1 mol.L ⁻¹	94
FIGURA 20 Controle de qualidade do RTX_{red} (1 mg) marcado com $^{188}\text{Re(V)}$. Curvas de eluição após o tempo de reação de 1h (A) e estabilidade após 1h (B) e 4h (C) de incubação a 37 °C.....	96
FIGURA 21 Controle de qualidade do RTX_{red} (0,25 mg) marcado com $^{188}\text{Re(V)}$. Curvas de eluição após o tempo de reação de 1h (A) e estabilidade após 1h de incubação a 37°C (B) e após 6 h em gelo seco (C).	97
FIGURA 22 Perfil cromatográfico nos 10 cm do papel Whatman 3MM da marcação após 1h de reação (); marcação após purificação (); reação com cisteína após 1h (), reação com cisteína após 4h () e reação com cisteína após 24h ().....	99
FIGURA 23 Razão tumor:não-tumor calculada para os camundongos nude, com tumor de células Raji, injetados com $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$. As razões foram calculadas para os tempos de 24, 48 e 72 h após injeção.....	102
FIGURA 24 Imagem cintilográfica obtida em um camundongo CD1-fox1 ^{nu} , portador de tumor (seta vermelha) induzido com células Raji, injetado i.v. com $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$	103
FIGURA 25 Cromatograma do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$, após o preparo, obtido em uma coluna de <i>FPLC</i> Superdex 75. O pico relativo as impurezas ficou entre 18 – 24 min.....	105
FIGURA 26 Cromatogramas do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{nat}}$ usando o sistema <i>FPLC</i> com uma coluna Superose 12 após 3 h (A) e 24 h (B) de incubação a 37°C. Neste sistema, o R_t correspondente ao RTX_{nat} é de $11,68 \pm 0,06$ min e os picos entre 17 – 23 min correspondem as impurezas.....	107
FIGURA 27 Cromatogramas do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ usando o sistema <i>FPLC</i> com uma coluna Superose 12 após 3 h de incubação a 37°C. Reação com 100 μg de RTX_{red} (A) e reação com 250 μg de RTX_{red} (B). Os R_t de 8,37 e 8,47 min correspondem ao RTX_{red} marcado e os picos entre 16,47 – 25,48 min correspondem as impurezas.....	109

FIGURA 28 Cromatograma do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$, após o preparo, obtido em uma coluna de <i>FPLC</i> Superose 12. Os picos apareceram entre 18,25 e 30,80 min.....	111
FIGURA 29 Efeito do tempo de incubação no rendimento de marcação do RTX_{red} usando $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$	112
FIGURA 30 Cromatogramas do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ usando o sistema <i>FPLC</i> com uma coluna Superose 12 após 3 h (A) e 24 h (B) de incubação a 37°C. O $R_t = 11,49 \pm 0,08$ min corresponde ao RTX_{red} marcado e os picos entre 17,78 – 30,68 min correspondem as impurezas.....	113
FIGURA 31 Efeito do tempo de incubação no rendimento de marcação do $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. Os valores representam a média \pm DP. Para $^{99\text{m}}\text{Tc}$: $n = 2$ (3 h) e $n = 7$ (6 e 24 h) e para ^{188}Re : $n = 2$ (6 e 48 h) e $n = 3$ (3 e 24 h).....	114
FIGURA 32 Cromatogramas do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ usando o sistema <i>FPLC</i> com uma coluna Superose 12 antes da purificação (A) (~ 17 h de incubação) e após purificação (B) em uma coluna Bio-Spin 6. Na figura (A) o $R_t = 11,43$ min corresponde ao RTX_{red} marcado e os picos entre 15 e 35 min correspondem as impurezas. Na figura (B) o $R_t = 11,47$ min corresponde ao RTX_{red} marcado.....	116
FIGURA 33 Deslocamento do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (A) e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (B) na presença de histidina ($n = 5$ e $n = 4$ para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re , respectivamente) e cisteína ($n = 3$ e $n = 4$ para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re , respectivamente). Os valores do gráfico representam a média \pm DP.....	118
FIGURA 34 Estabilidade do $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ no plasma humano. Os valores representam a média \pm DP: $n = 4$ para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e $n = 3$ para ^{188}Re	120
FIGURA 35 Curva de saturação do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (A) ($K_d=8,0$ nmol.L $^{-1}$) e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (B) ($K_d = 6,5$ nmol.L $^{-1}$) para células Raji.....	121
FIGURA 36 Razão tumor:não-tumor calculada para os camundongos nude, com tumor de células Ramos, injetados com $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. As razões foram calculadas para os tempos de 4 h (A), 24 h (B) e 48 h (C) após injeção. Os valores do tumor do lado esquerdo foram usados para o cálculo.....	126

FIGURA 37 Imagem SPECT/CT obtida de um camundongo CD1-foxn1^{nu} portador de tumor induzido com células Ramos injetado i.v. com ¹⁸⁸Re(CO)₃-RTX_{red}. As imagens (A) e (B) correspondem a duas reconstruções diferentes do mesmo animal. As setas brancas indicam a localização do tumor no flanco direito e esquerdo do animal..... 127

FIGURA 38 Autorradiograma *ex vivo* (A): seção representativa do tumor após injeção do ¹⁸⁸Re(CO)₃-RTX_{red}. *In vitro*: seções do tumor incubado somente com ^{99m}Tc(CO)₃-RTX_{red} (B) ou incubado com ^{99m}Tc(CO)₃-RTX_{red} e excesso de RTX_{nat} para bloqueio do receptor CD20 (C)..... 129

1. INTRODUÇÃO

Anticorpos radiomarcados são importantes reagentes clínicos para imagem e tratamento de tumor e ganharam destaque no tratamento de malignidades hematológicas. O exemplo mais importante dessa aplicação é o uso do anticorpo monoclonal (AcM) quimérico anti-CD20 para tratar Linfoma Não-Hodgkin (LNH) de células-B.

Radiofármacos terapêuticos são desenvolvidos com a finalidade de liberar altas doses de radiação ionizante em sítios específicos de doenças no corpo, poupando, contudo, tecidos não-alvos. A radiação emitida pelos AcM radiomarcados propicia efeitos biológicos importantes que explicam a eficiência da radioimunoterapia (RIT) comparada com a terapia usando apenas AcM não-marcado (imunoterapia).

Radionuclídeos emissores β^- , tais como iodo-131 (^{131}I), rênio-188 (^{188}Re), ítrio-90 (^{90}Y), lutécio-177 (^{177}Lu) e hólmio-166 (^{166}Ho) são úteis para o desenvolvimento de radiofármacos terapêuticos. Dentre estes, o ^{188}Re é objeto de estudo da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) e de grande interesse pela classe médica, além de fazer parte de um projeto coordenado pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA). O ^{188}Re emite β^- de alta energia e tem como vantagem, em relação ao ^{90}Y , a emissão de raio- γ que permite obtenção de imagem.

São poucas as publicações relacionadas à marcação de AcM com ^{188}Re , fato este relacionado à difícil química de redução deste elemento radioativo. Baseado nisso, o presente estudo apresenta resultados da marcação do AcM quimérico anti-CD20 (Rituximab) com o radioisótopo ^{188}Re , obtidos por meio de duas técnicas: a “marcação direta” e a inovadora técnica chamada de “núcleo carbonila”, podendo contribuir para a incorporação deste radioisótopo na realidade da Medicina Nuclear brasileira.

1.1 Linfoma Não-Hodgkin (LNH)

Os órgãos e tecidos que compõem o sistema linfático incluem linfonodos, timo, baço, amígdalas, medula óssea e tecidos linfáticos no intestino. A linfa, um líquido claro que permeia estes tecidos, contém proteínas e células linfóides. Já os linfonodos (gânglios) são encontrados em todas as partes do corpo, principalmente no pescoço, virilha, axilas, pelve, abdome e tórax; produzem e armazenam leucócitos denominados linfócitos. Existem três tipos de linfócitos: os linfócitos B (ou células B), os linfócitos T (ou células T), e os linfócitos grandes granulares - as células "*natural killer*" (células NK ou exterminadoras naturais) (Site 1).

Cada um destes três tipos de células realiza uma função específica no combate a infecções, e também têm importância no combate ao câncer:

- ◆ Os linfócitos B reconhecem as células e os corpos "estranhos" (por exemplo, bactérias que invadiram o organismo). Quando estas células entram em contato com uma proteína estranha (por exemplo, na superfície das bactérias), produzem anticorpos, que se "fixam" na superfície da célula estranha levando à sua destruição (Site 2).
- ◆ Em condições fisiológicas, a maioria dos linfócitos que circulam no organismo são linfócitos T. O seu papel é reconhecer e destruir as células anômalas (por exemplo, as células que foram infectadas por um vírus) (Site 2).
- ◆ As células NK são parte da imunidade celular mediada. Elas podem atacar a célula hospedeira, têm como alvo as células tumorais e protegem contra uma larga variedade de agentes infecciosos (Site 3).

Os linfomas são definidos como neoplasias do sistema linfóide que comprometem preferencialmente os gânglios linfáticos ou outros tecidos linfóides. Pode-se diferenciá-los dentro de dois grupos bem estabelecidos: linfomas tipo Hodgkin (LH) e tipo não-Hodgkin (LNH) (Álvarez et al., 2008).

Em geral, face à natureza circulatória da linfa, os linfomas são considerados doenças que afetam todo o organismo, e não apenas a área

visivelmente afetada pelos gânglios aumentados. A estas situações clínicas dá-se o nome de "doenças sistêmicas". São fundamentalmente os LNH os que produzem comprometimento extraganglionar com mais frequência, podendo acometer tecidos linfóides situados em diferentes localizações (Álvarez et al., 2008). O baço e a medula óssea são sítios comuns de formação de linfomas fora dos linfonodos, mas algumas pessoas desenvolvem um linfoma no estômago, no fígado, na mama, no útero ou, raramente, no cérebro. Na verdade, um linfoma pode se formar praticamente em qualquer parte do corpo e também é comum que mais de uma parte do corpo seja afetada pela doença.

Muitos sintomas de linfoma surgem por causa do inchaço causado pelas coleções de linfócitos anormais. Os sintomas dependem da parte do corpo na qual os inchaços se localizam. Além disso, os linfócitos anormais não têm capacidade para desempenhar seu papel no sistema imune do corpo e, sem tratamento, uma pessoa com linfoma tem maior probabilidade de ter infecções.

É importante saber exatamente que forma de LNH um paciente tem, qual a rapidez de seu desenvolvimento, onde ele se localiza no corpo e até onde se espalhou. Para definir esses parâmetros, a doença é subdividida por (Site 2):

- ◆ Classificação ou graduação – que informa aos médicos se o LNH é indolente (de baixo grau e crescimento lento) ou agressivo (de alto grau e desenvolvimento rápido).
- ◆ Tipo – dentro das categorias de indolente ou agressivo, a doença ainda é subdividida em mais de 30 tipos, dependendo da aparência histológica das células colhidas em amostras. Essa definição é também conhecida como 'grau'.
- ◆ Estádio ou Estágio – conforme o local do linfoma no corpo e até onde ele se espalhou, a doença é classificada em estágios I, II, III e IV. O estágio I corresponde à doença mais limitada, e o estágio IV, à mais avançada. Também é agregada uma subdivisão destes estágios aos pacientes com certos sintomas relacionados à doença, chamados sintomas B, tais como febre, sudorese noturna, perda de peso significativa. Exemplo: se um paciente tem doença avançada (estágios III ou IV), e tem sintomas B, determina-se o estadiamento como IIIB ou IVB.

Em 1994, o Grupo Internacional de Estudo de Linfomas propôs uma classificação de vários grupos uniformes de linfoma, levando em consideração as diferenças morfológicas, histopatológicas, fenotípicas, anatômicas e os dados clínicos. Dependendo do critério de malignidade e o índice prognóstico, uma estratégia de tratamento é definida e avaliada. Muitos dos linfomas são de células B (85% dos LNH em adultos). Eles podem ser classificados como (Djavanmardi et al., 2008):

- ◆ Linfoma folicular
- ◆ Linfomas de células do manto
- ◆ Linfomas de margem extra-nodal de tecido linfóide associado com membrana mucosa (MALT)
- ◆ Outros linfomas de pequenas células
- ◆ Linfoma de Burkitt

O linfoma não-Hodgkin (LNH) se torna cada vez mais comum com a idade sendo que a maioria dos pacientes diagnosticados se encontra na meia idade ou acima. A média de idade à época do diagnóstico é de 65 anos, mas a doença pode afetar tanto adultos, jovens, quanto crianças muito pequenas (Site 2).

A incidência de uma doença é, estritamente, representada pelo número de novos casos surgidos a cada ano na população. Trata-se de uma medida para avaliar o quão comum é a doença. A incidência do LNH vem aumentando substancialmente, embora as razões para isso ainda não estejam esclarecidas. Se o número de casos continuar a crescer às taxas atuais, o LNH terá uma incidência semelhante àquela para câncer de mama, de cólon, de pulmão e de pele por volta de 2025 (Site 2).

Entre 1973 e 1991 a incidência de LNH aumentou cerca de 73%, ficando no ranking da 5ª malignidade mais comum nos Estados Unidos após próstata, mama, pulmão e câncer de cólon. O LNH é mais comum em Caucasianos do que em Afro-americanos e Asiáticos-americanos, e mais em homens do que em mulheres (Wood, 2001).

No mundo, o número de casos novos de LNH é cerca de 287 mil, sendo que aproximadamente 60% ocorrem em homens. As maiores taxas de incidência encontram-se nas regiões desenvolvidas (América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia). As menores taxas são observadas no centro sul e na parte oriental da Ásia. O número de casos de LNH vem aumentando especialmente em pessoas idosas (Site 4).

A sobrevida média varia de acordo com o tipo celular e o estágio da doença. Em geral, nas regiões desenvolvidas, a sobrevida média cumulativa em cinco anos é em torno de 53%. Nas regiões menos desenvolvidas, a sobrevida é 50% (Site 4).

Os fatores de risco ainda não são totalmente conhecidos, mas possivelmente estão relacionados à redução da função do sistema imunológico (como, por exemplo, em pessoas com órgãos transplantados) e exposição a agentes infecciosos. O *HIV (Human Immunodeficiency Virus)* e o *HTLV-1 (Human T-cell Lymphotropic Virus type 1)* estão associados a um aumento do risco dos LNH. Na África, os linfomas de Burkitt são causados, em parte, pelo vírus Epstein-Barr. Outros fatores de risco estão relacionados à exposição ocupacional, como o uso de herbicidas, pesticidas fertilizantes e outros agentes químicos (Site 4).

Nos últimos 25 anos, o número de casos no Brasil praticamente dobrou, especialmente em pessoas acima de 60 anos. A estimativa de novos casos divulgada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA/RJ) para o ano de 2009 foi de 9.100, sendo 4.900 novos casos para homens e 4.200 para mulheres. Ao passo que o número de mortes no ano de 2007 foi de 3.593, sendo 2.036 homens e 1.557 mulheres (Site 5).

O LNH varia em curso clínico, prognóstico, e gerenciamento dependendo do subtipo histológico, massa tumoral e outros fatores paciente-específico. Estudos clínicos, incluindo anticorpos monoclonais, estão sendo correntemente examinados sozinhos ou em combinação com outras modalidades para identificar efetividade e regimes de tratamento tumor-seletivo para prolongar a sobrevida em pacientes com LNH (Wood, 2001).

1.2 Anticorpos

1.2.1 Conceitos básicos

Anticorpos (Ac), ou imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B, os plasmócitos, presentes no plasma, tecidos e secreções e que atacam proteínas estranhas ao corpo, chamadas de antígenos, realizando assim a defesa do organismo (imunidade humoral) (Site 6). A combinação de um anticorpo com seu antígeno inicia uma resposta imunológica complexa que usualmente resulta na destruição ou eliminação do antígeno. Um epítopo é uma porção pequena restrita da molécula de antígeno que determina a especificidade da reação antígeno-anticorpo. Um único antígeno pode ter múltiplos determinantes antigênicos, cada qual pode estimular um ou mais linfócitos B (Keenan et al., 1985; Malik & Lillehoj, 1994).

Estruturalmente, imunoglobulinas ou anticorpos são moléculas simétricas em forma de “Y” com um peso molecular de aproximadamente 150 kDa consistindo de quatro cadeias de polipeptídeos ligadas covalentemente por pontes dissulfídicas (S-S). São duas cadeias pesadas (H - *heavy*) idênticas (entre 55 kDa e 70 kDa) e duas cadeias leves (L - *light*) idênticas (23 kDa), como mostra a FIG. 1 (Stern & Herrmann, 2005; Goding, 1986; Ulrich et al., 2008). Cadeias leves e pesadas são mantidas unidas pela combinação de interações não-covalentes e pontes dissulfídicas covalentes intercadeias, formando uma estrutura bilateralmente simétrica. A região da dobradiça (*hinge region*) é a área das cadeias pesadas entre o primeiro e segundo domínio da região constante e é unida por pontes dissulfídicas (Thermo Scientific Science, 2009). Em cada cadeia leve e pesada, os 110 aminoácidos da porção amino-terminal constituem um domínio variável (*V – variable*) que são designados VL para as cadeias leves e VH para as cadeias pesadas. Dentro de cada região variável encontram-se três segmentos hipervariáveis (regiões determinantes de complementaridade), que juntamente com os domínios VL e VH criam o sítio de ligação ao antígeno. O remanescente de cada cadeia leve consiste de um domínio constante único (CL) e o restante de cada cadeia pesada contém três ou quatro domínios constantes

(CH). A parte constante é identicamente encontrada em todas as imunoglobulinas do mesmo isotipo (Stern & Herrmann, 2005; Goding, 1986).

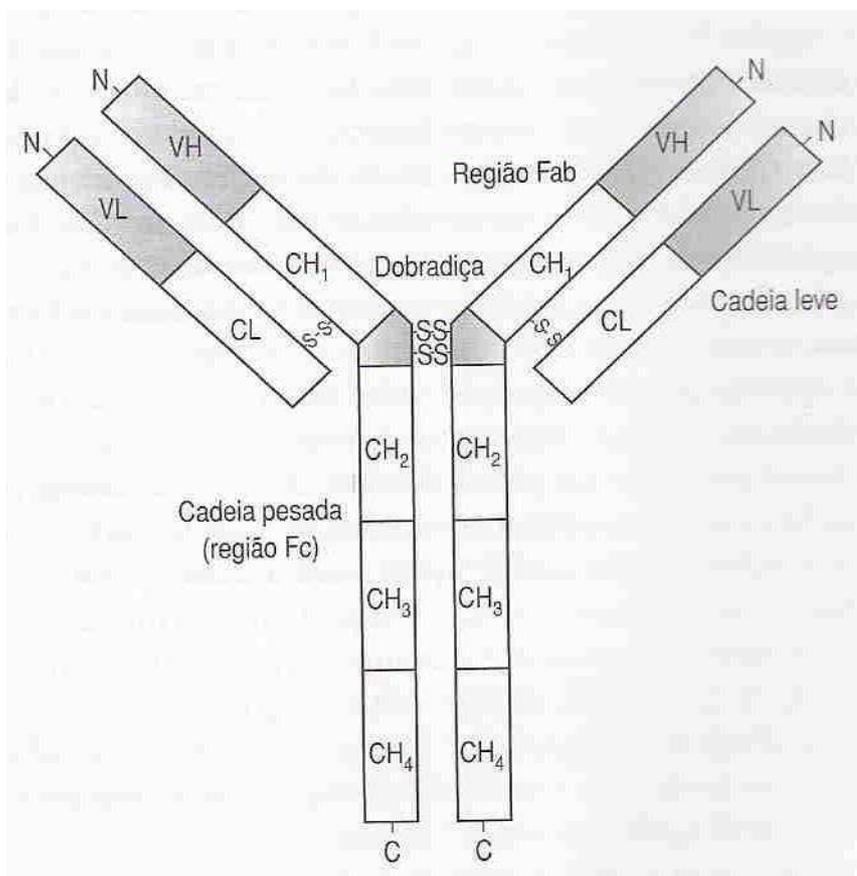


FIGURA 1. Estrutura básica das imunoglobulinas. A região N terminal (N) é a região de ligação do antígeno, compreendendo regiões variáveis de ambas as cadeias leve (VL) e pesada (VH). A cadeia pesada contém uma longa região constante, composta da região Fc (fragmento cristalizado), que compreende a extremidade C-terminal (C), e por uma região CH₁ após a dobradiça. A cadeia leve também tem uma porção constante (CL) e uma porção variável (VL) (Ulrich et al., 2008).

As cadeias leves podem ser do tipo κ (capa) ou λ (lambda). Já as cadeias pesadas definem a classe e as propriedades funcionais do anticorpo, podendo se apresentar de cinco formas ou isotipos, sendo elas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Os diferentes tipos se diferenciam pelas suas propriedades biológicas e estruturais distintas (Site 6). Cada classe ou isotipo comporta um diferente conjunto de mecanismos efetores para a eliminação do antígeno, uma vez que este é reconhecido. Como cada classe de uma molécula de imunoglobulina é determinada pelas suas cadeias pesadas, então IgA, IgD, IgE, IgG e IgM possuem cadeias pesadas definidas pelas letras gregas α , δ , ϵ , γ e μ (alfa, delta, épsilon, gama e mi), respectivamente (Goding, 1986).

A digestão das imunoglobulinas com papaína e pepsina dá origem aos fragmentos classicamente conhecidos na literatura: *Fab* (fragmento de ligação com antígeno), $(Fab)_2$ e *Fc* (fragmento cristalino). Os produtos da digestão com papaína (a quebra da molécula ocorre depois da ponte S-S, mantendo os dois fragmentos *Fab* unidos por essa ponte) são os fragmentos I e II, chamados *Fab*, região que interage com o antígeno, e a região *Fc*, responsável pela interação com receptores celulares e com as proteínas do sistema complemento. A fração *Fab* é constituída de parte da cadeia H e mais a cadeia L, contém os domínios variáveis, que consistem de três sequências de aminoácidos hipervariáveis responsáveis pela especificidade do anticorpo. Estas regiões hipervariáveis são complementares ao epítopo de um antígeno, sendo denominadas regiões determinantes de complementaridade (*CDR - complementarity determining regions*). A fração *Fc* é formada apenas pela cadeia H. Esta região é reconhecida pelas células do sistema imune, ligando-se aos receptores da membrana celular de macrófagos, entre outras células efetoras do sistema imune. Também é responsável pela ativação do complemento pela via clássica, contribuindo no processo de destruição de microorganismos, como também determina o isotipo do anticorpo (IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM). Já a digestão com pepsina quebra a molécula de imunoglobulina antes da ponte S-S, isto é, próximo à região da dobradiça, originando dois fragmentos, sendo um deles o fragmento bivalente que se liga ao antígeno $(Fab)_2$ (Stern & Herrmann, 2005).

1.2.2 Mecanismos de Ação

A resposta imune humoral mediada por anticorpos secretados pelos linfócitos B leva à destruição de organismos extracelulares e previne a disseminação das infecções intracelulares. Dentre as principais maneiras pelas quais os anticorpos contribuem para a imunidade estão (Marques, 2005):

- ♦ **Neutralização:** A maneira mais simples e direta para os anticorpos protegerem contra agentes patogênicos ou seus produtos tóxicos é pela ligação com estes, bloqueando seu acesso às células que podem infectar ou destruir. Tal mecanismo é conhecido como neutralização e protege contra toxinas microbianas e contra patógenos intracelulares como os

vírus, impedindo-os de penetrar nas células onde se replicariam. Os anticorpos recobrem os sítios tóxicos do agente antigênico, neutralizando-o.

- ◆ **Opsonização:** Em relação às bactérias que se multiplicam no meio extracelular, apenas a ligação pelos anticorpos não é suficiente para eliminá-las. Neste caso, uma função do anticorpo é a de permitir que a célula fagocitária, como neutrófilo e macrófago, ingira e destrua a bactéria. Alternativamente, os fagócitos possuem receptores de membrana que reconhecem a região *Fc* dos anticorpos IgG que recobrem a bactéria, resultando na fagocitose do complexo antígeno-anticorpo. O mecanismo de revestimento de patógenos e de partículas estranhas pelos anticorpos é chamado de opsonização.
- ◆ **Citotoxicidade Mediada por Células Dependentes de Anticorpo – ADCC:** Diversas células, como as NK (*Natural Killer*), macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, possuem potencial citotóxico e expressam receptores de membrana para a região *Fc* da molécula do anticorpo (IgG e IgE). A destruição pelas células NK de células alvo recobertas por anticorpos é denominada citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC - *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) e ocorre quando anticorpos ligados à superfície de uma célula interagem com os receptores *Fc* nas células NK. Inicia-se então a destruição citotóxica das células alvo através da liberação de grânulos citoplasmáticos da célula NK contendo perforinas e granzimas.
- ◆ **Ativação do complemento:** Uma outra função dos anticorpos IgM e IgG é a de ativar, pela via clássica, um sistema de proteínas plasmáticas conhecido como complemento. Os poros formados pelos componentes ativos do complemento podem destruir diretamente os microorganismos. Alguns dos componentes do complemento são opsoninas que se ligam ao antígeno alvo e direcionam os fagócitos que possuem receptores específicos para estas, promovendo a fagocitose.
- ◆ **Lesão física e lesão química:** As células podem morrer de duas formas diferentes. A primeira por lesão física ou química (quimiotaxia): o complemento induz a quimiotaxia pelos neutrófilos e macrófagos, causando, assim, a migração de grande número de fagócitos para área

tecidual adjacente ao agente antigênico e também por danos causados à membrana (lesão física), pelo anticorpo e complemento, que levarão à desintegração celular ou necrose. A segunda forma é conhecida como morte celular programada ou apoptose, que leva a fragmentação do DNA, à ruptura do núcleo e à modificações na morfologia celular. A célula se autodestrói de dentro para fora, contraindo-se e degradando-se. Essa degradação também leva à destruição aos agentes patogênicos que nela se encontrem, como vírus, por exemplo. Desta forma, o mecanismo de apoptose é preferível à necrose como meio de eliminação celular, pois, nesta última, os agentes patogênicos intactos são liberados pela célula morta, podendo dar continuidade à infecção de células sadias, ou podem parasitar os macrófagos que os ingeriram.

1.2.3 Anticorpos monoclonais

Se um animal, tipicamente um camundongo ou coelho, é imunizado com um agente antigênico, o soro retirado desse hospedeiro sensibilizado conterá anticorpos contra diferentes epítopos do antígeno. Se os anticorpos são derivados de uma população de linfócitos B estimulados e suas células filhas do plasma, o termo policlonal é aplicado. Todavia, se linfócitos individuais ou células do plasma podem ser extraídos e clonados em cultura de tecido, cada clone terá o potencial de produzir uma espécie única de molécula de anticorpo, ou um anticorpo monoclonal (Keenan et al., 1985).

Os anticorpos monoclonais (AcM) podem ser nomeados de acordo com seu método de produção (FIG. 2):

- ◆ AcM murinos: oriundo de células linfocitárias originárias do baço de um animal (previamente imunizado) fundidas com células tumorais.
- ◆ AcM quiméricos: são cerca de 65 – 90% humanos e consistem de regiões variáveis murinas fundidas à parte constante de um AcM humano.
- ◆ AcM humanizados: são cerca de 90% humanos e são feitos da região hipervariável de um AcM murino sobre o “esqueleto” de um AcM humano.
- ◆ AcM totalmente humanos: são 100% humanos.

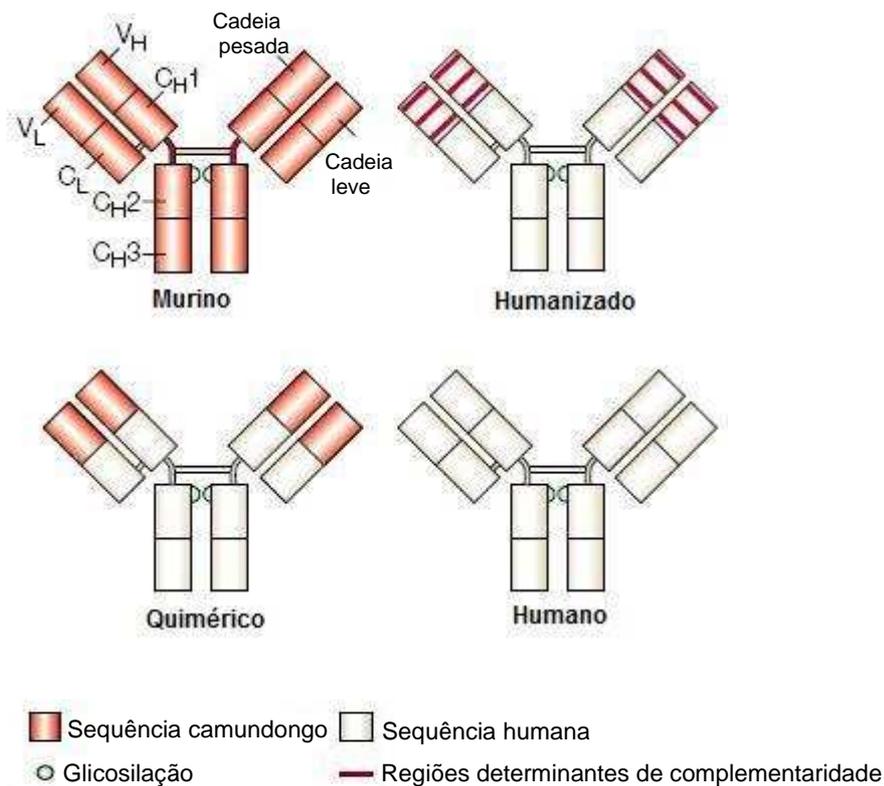


FIGURA 2. Tipos de anticorpos monoclonais: AcM murino; AcM quimérico - fusão das cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo de camundongo, com as cadeias constantes humanas, formando moléculas quimeras; AcM humanizado - os protocolos mais modernos de humanização preconizam o transplante das CDR murinas para cadeias variáveis humanas. Esta molécula teria ainda as cadeias constantes de Ig humanas como na quimera e se apresenta de forma suficientemente invisível para o sistema imune (Carter, 2001).

1.2.3.1 Anticorpos monoclonais murinos

Os anticorpos monoclonais resolveram os problemas de especificidade e reprodutibilidade associados com o tradicional anti-soro (policlonal). Em 1975, Köhler e Millstein reportaram a primeira fusão de sucesso entre células normais de baço produtoras de anticorpos (advindas de um camundongo imunizado com um antígeno específico) e células “imortais” de mieloma (Köhler & Millstein *apud* Malik & Lillehoj, 1994). A célula resultante foi chamada de “hibridoma”. Esses hibridomas são adaptados para crescer em cultura de tecido e são capazes de produzir anticorpos (Malik & Lillehoj, 1994).

Usando a tecnologia de hibridoma, pode-se produzir anticorpos monoclonais (AcM), originalmente murinos, que reagem somente com um único determinante antigênico. A injeção de AcM murinos em humanos resulta na

produção de anticorpos humanos anti-anticorpos murinos (resposta imune HAMA – *human anti-mouse antibodies*) (Allen, 2002). Este HAMA não somente inativa e elimina AcM murinos após administrações repetidas, como também a formação dos complexos anticorpos-HAMA levam à reações alérgicas até choque anafilático, limitando a possibilidade de administração repetida (Stern & Herrmann, 2005).

1.2.3.2 Anticorpos monoclonais quiméricos, humanizados e totalmente humanos

Para minimizar a resposta HAMA, os avanços recentes na engenharia de anticorpos levaram à produção de AcM quiméricos, humanizados e totalmente humanos (anticorpos humanos) (Allen, 2002; Boswell & Brechbiel, 2007; Chinn et al., 2003).

A quimerização envolve a junção dos domínios variáveis de um AcM murino com o domínio constante de um anticorpo humano. A estratégia da humanização envolve a transferência das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de um anticorpo murino à IgG humana (Carter, 2001, 2006; Robinson et al., 2004).

Além dos anticorpos quiméricos e dos humanizados, outras alternativas existem para a produção de anticorpos totalmente humanos, bem como de reagentes derivados de anticorpos humanos. Através do isolamento de genes codificantes de várias regiões humanas, como na biblioteca de anticorpos em fagos e por meio da tecnologia do DNA recombinante, obtém-se um AcM integralmente humano da classe IgG (Marques, 2005; Robinson et al., 2004).

1.2.4 Aplicação dos anticorpos monoclonais na terapia de tumores

1.2.4.1 O antígeno CD20

CD20 humano é uma molécula de superfície celular de peso molecular de aproximadamente 33 – 37 kDa com um *loop* extracelular limitado de 44 aminoácidos. Está relacionado com a regulação do crescimento e diferenciação dos linfócitos B, possivelmente por funcionar como um canal regulador de cálcio.

Sua expressão é restrita às células B desde o estágio celular pré-B até o estágio tardio de diferenciação. Muitas células do plasma, por exemplo, são CD20 negativas, todavia, elas podem induzir a expressão CD20 por cultura com interferon- γ (Eisenberg & Looney, 2005).

O antígeno CD20 é considerado um ótimo alvo na terapia de câncer baseada em anticorpos por apresentar as seguintes propriedades (Stern & Herrmann, 2005):

- ◆ É densamente expressado (cerca de 100.000 moléculas/células) na maioria das células dos linfomas de células-B, mas não em muitas outras células do corpo;
- ◆ É expressado na maioria dos linfócitos B excluindo células precursoras imaturas (permitindo reconstituição do compartimento das células B após terapia) e células do plasma (permitindo a produção contínua das imunoglobulinas);
- ◆ Não muda ou internaliza como resposta a ligação com o anticorpo,
- ◆ É essencial na diferenciação e proliferação dos linfócitos B.

Além do mecanismo geral de ação bem conhecido (ex, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e citotoxicidade mediada por complemento), a ligação do anticorpo rituximab ao CD20 leva a um influxo do cálcio e apoptose.

1.2.4.2 O anticorpo monoclonal Rituximab

Rituximab (MabThera/Roche e Rituxan/Genentech, Biogen) é um AcM quimérico anti-CD20 produzido por tecnologia recombinante. Ele foi preparado de um AcM CD20 murino pela combinação genética das regiões variáveis das cadeias leve e pesada murinas com regiões constantes humanas IgG1/k (FIG. 3) (Eisenberg & Looney, 2005).

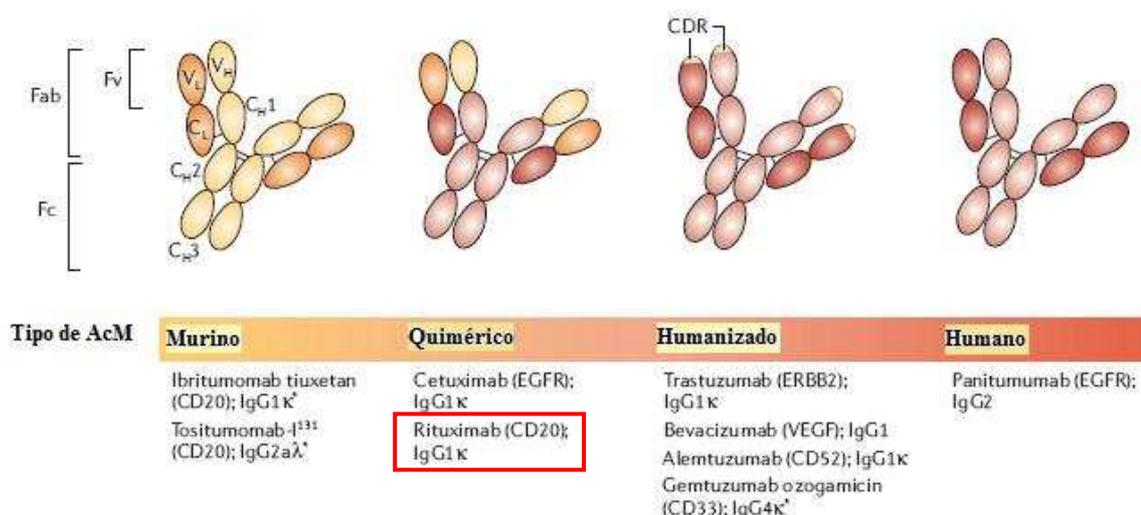


FIGURA 3. A classificação dos AcM terapêuticos de acordo com os diferentes tipos de anticorpos: murino, quimérico, humanizado e humano. Destaque para o AcM quimérico Rituximab (Imai & Takaoka, 2006).

O Rituximab é composto de duas cadeias pesadas de 451 aminoácidos e duas cadeias leves de 213 aminoácidos (baseado na análise do cDNA) e tem um peso molecular de aproximadamente 145 kDa. Tem uma afinidade de ligação para o antígeno CD20 de aproximadamente $8,0 \text{ nmol.L}^{-1}$, ligando-se especificamente à este antígeno que é expressado pela maioria dos linfócitos B humano (Scheinfeld, 2006; Cartron et al., 2004).

A imunoterapia tornou-se uma modalidade de tratamento aprovada para LNH de células-B em 1997, com a aprovação do Rituximab pelo “*United States Food and Drug Administration*” (US FDA) para o tratamento de LNH de células-B de baixo grau ou folicular e relapso ou refratário (Chinn et al., 2003; Milenic et al., 2004). Em menos de um ano depois, Rituximab também foi aprovado para uso na União Européia indicado para LNH de estágio III/IV, folicular, quimiorresistente ou relapso (dois ou mais relapsos) (Chinn et al., 2003).

Desde sua aprovação em 1997 até o ano de 2005, Rituximab foi usado em mais de 500.000 pacientes com LNH. As indicações usuais são: (a) LNH refratário de baixo grau de células-B CD20⁺; (b) retratamento de pacientes com LNH relapso após primeira terapia com Rituximab; (c) primeira linha de tratamento para LNH folicular combinado com ciclofosfamida (CYP – *cyclophosphamide*); (d) terapia de manutenção para estabilidade de LNH induzido por CYP, (e) primeira linha de tratamento para linfoma difuso de células-B combinado com um regime CHOP (CYP-prednisona-vincristina-doxorrubicina) e (f) terapia de manutenção

para LNH indolente refratário. A eficácia e segurança da terapia com Rituximab em câncer de células-B estimulou o uso deste anticorpo em outros tipos de doenças, como doenças autoimunes (Gürçan et al., 2009). Rituximab é também usado para tratar leucemia linfocítica crônica, macroglobulinemia de Waldenstrom e trombocitopenia idiopática púrpura (ITP) ou imune (Scheinfeld, 2006).

Quando Rituximab é adicionado à quimioterapia, alta taxa de resposta e longa sobrevida sem toxicidade clinicamente significativa são encontradas (Bienert et al., 2005).

Dados *in vitro* sugerem que Rituximab induz apoptose, lise mediada por complemento (CDC – *complement-dependent cytotoxicity*) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC – *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) e alguns estudos confirmam o envolvimento desses mecanismos *in vivo* (Cartron et al., 2004; Hernandez & Knox, 2004).

1.3 A Medicina Nuclear e os Radiofármacos

A base da técnica de Medicina Nuclear é a administração de uma pequena quantidade de um agente químico o qual é marcado com uma quantidade traçadora de um isótopo radioativo, um radionuclídeo. Esses agentes radiomarcados são chamados de radiofármacos (Britton, 1995). Esses radiofármacos são rotineiramente usados em Medicina Nuclear e quase todos são administrados via injeção intravenosa. Os radiofármacos são, muitas vezes, pequenos compostos orgânicos ou inorgânicos com composição definida. Também podem ser macromoléculas tais como anticorpos monoclonais e seus fragmentos marcados com um radionuclídeo. Dependendo de sua aplicação médica, radiofármacos podem ser divididos em duas classes primárias: diagnóstica e terapêutica, sendo que mais de 85% dos radiofármacos são usados com propósitos diagnósticos, enquanto que o restante é usado para aplicações terapêuticas (Liu, 2008; Junnotula, 2006).

Esses radiofármacos para diagnóstico são projetados para indicar uma função normal ou um distúrbio do órgão, tecido ou sistema para o qual eles foram escolhidos (Britton, 1995).

As técnicas de imagem em medicina nuclear tais como tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT - *single photon emission-*

computed tomography) e tomografia por emissão de pósitrons (PET - *positron emission tomography*) fornecem informações das mudanças funcionais e metabólicas relacionadas aos processos patológicos (Papathanassiou & Liehn, 2008). Essas técnicas de imagem são de grande valor clínico para o reconhecimento precoce da presença e extensão das malignidades baseadas no fato que as mudanças bioquímicas geralmente precedem as mudanças anatômicas (Hamoudeh et al., 2008).

O objetivo de uma aplicação diagnóstica é a descrição detalhada da estrutura morfológica, e também da função fisiológica, dos órgãos ou tecidos por meio do acúmulo do radiofármaco. Um radiofármaco com propósito diagnóstico é composto por uma molécula marcada com um isótopo emissor-gama para SPECT ou com um isótopo emissor de pósitrons para PET. Em geral, esses radiofármacos são usados em baixas concentrações e não devem causar nenhum efeito farmacológico. Também são úteis para o acompanhamento da eficácia de um tratamento terapêutico específico (Liu, 2008).

Radiofármacos terapêuticos são moléculas radiomarcadas designadas para liberar doses terapêuticas de radiação ionizante para o sítio específico da doença (mais frequentemente câncer) (Volkert & Hoffman, 1999; Liu, 2008). Os principais obstáculos para a radioterapia com radiofármacos assumir um papel mais amplo na prática clínica são a disponibilidade dos isótopos terapêuticos e técnicas para sua localização específica nos tecidos doentes, tais como tumor. A administração sistêmica dos radiofármacos que são designados para alvos específicos liberando o radionuclídeo terapêutico aos sítios tumorais fornece oportunidades para o tratamento de tumores metastáticos disseminados. Idealmente, radiofármacos terapêuticos devem localizar-se em sítio tumoral em concentração suficiente para liberar uma dose de radiação citotóxica às células tumorais, e ao mesmo tempo clarear rapidamente do sangue e órgãos não cancerosos para minimizar danos pela radiação aos tecidos normais (Liu, 2008).

Muitas biomoléculas, incluindo anticorpos monoclonais, pequenos peptídeos, ou ligantes não receptores de peptídeos, tem sido usadas com sucesso para liberar radionuclídeos à alvos específicos (Liu, 2008).

1.3.1 Imagem radionuclídica

Como mencionado no item 1.3, a imagem radionuclídica é normalmente dividida em duas modalidades gerais: PET e SPECT. Geralmente, estudos de imagem incluem imagens estáticas ou dinâmicas e testes de funções *in vivo*. Imagens dinâmicas fornecem dados necessários sobre o movimento biológico dos radioisótopos nos diferentes compartimentos do corpo e órgãos.

Os radionuclídeos emissores de pósitrons emitem um elétron positivo a partir do seu núcleo. Este elétron positivo, por sua vez, percorre uma curta distância no tecido e interage com um elétron negativo livre ou fracamente ligado. O resultado desta interação é um elétron positivo e um elétron negativo aniquilando um ao outro, com as massas sendo convertidas em dois fótons, consistindo cada um numa energia de 511 keV e sendo formado em direções opostas (Liu, 2008).

Os radionuclídeos usados em PET são tipicamente isótopos com meia-vida física ($T_{1/2}$) curta e estão exemplificados na TAB. 1. Estes radionuclídeos são incorporados a compostos normalmente usados no corpo humano tais como glicose, ácidos graxos ou anticorpos e então injetados como radiofármacos para visualizar os processos ativos (Van der Vaart et al., 2008).

TABELA 1. Radionuclídeos usados na técnica PET.

Radionuclídeo	$T_{1/2}$ (min)	E_{β^+} máx (keV)	Produção
Flúor-18	110	640	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$
Carbono-11	20,4	960	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$
Nitrogênio-13	9,96	1190	$^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$
Oxigênio-15	2,07	1720	$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$
Gálio-68	68	1077	Gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$

O principal radiofármaco de PET é o [^{18}F]-2-flúor-2-deoxiglicose (^{18}F -FDG) que age como um análogo da glicose permitindo a visualização do consumo da glicose, um processo metabólico sendo aumentado em muitas malignidades.

A técnica SPECT é baseada na detecção da radiação gama emitida pelos radionuclídeos (que varia entre aproximadamente 75 – 360 keV). Exemplos de alguns destes radionuclídeos são apresentados na TAB. 2 (Liu, 2008).

TABELA 2. Radionuclídeos usados na técnica SPECT.

Radionuclídeo	T _{1/2}	E _γ (keV)	Produção
Iodo-131	8 d	284, 364, 637	$^{130}\text{Te}(n,\gamma) \rightarrow ^{131}\text{Te}(\beta)^{131}\text{I}$ ou $^{235}\text{U}(n,f)^{131}\text{I}$
Gálio-67	78,3 h	93, 184, 300, 393	$^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$
Tálio-201	72 h	71	$^{203}\text{Tl}(p,3n)^{201}\text{Pb} \rightarrow ^{201}\text{Tl}$
Índio-111	67,2 h	171, 245	$^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$
Iodo-123	13,2 h	159	$^{124}\text{Xe}(p,2n)^{123}\text{Cs} \rightarrow ^{123}\text{Xe} \rightarrow ^{123}\text{I}$
Tecnécio-99m	6 h	140	Gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

Dentre os radionuclídeos citados na TAB. 2, o tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) é o mais usado em imagem nuclear, devido suas propriedades químicas e físicas favoráveis que serão discutidas a seguir (Liu, 2008).

1.3.1.1 Tecnécio-99 meta estável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)

Como já mencionado, o papel do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em aplicações diagnósticas é bem estabelecido. Estima-se que ele está envolvido em cerca de 80% de todos os procedimentos de imagem em Medicina Nuclear (Vučina & Lukić, 2002).

Os motivos da sua grande utilização na medicina nuclear são suas características físicas de decaimento favoráveis (Fritzberg, 1987), tornando-o um radioisótopo “ideal” para uso em cintilografia e dentro da técnica de diagnóstico denominada de SPECT, além de ser considerado um radionuclídeo de baixo custo (Kyprianidou et al., 2009).

As propriedades físicas do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ consistem na emissão de um fóton gama de 140 keV com abundância de 89%, o que é ótimo para imagem com os equipamentos usados em medicina nuclear. Sua meia-vida física de 6 h é ótima para o preparo dos radiofármacos, realização do controle de qualidade e realização dos estudos de imagem, sendo curta o suficiente para minimizar a dose de radiação absorvida pelo paciente (García-Garayova et al., 2007; Mease & Lambert, 2001).

Uma outra vantagem é a sua disponibilidade à classe médica por meio de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), onde o ^{99}Mo ,

denominado de pai, com meia-vida física de 66 horas decai para o filho ^{99m}Tc . O gerador comercial consiste em uma coluna de vidro, contendo alumina como suporte, sobre a qual é adsorvido o ^{99}Mo de fissão. Como a afinidade do filho pela alumina é pequena, este pode ser eluído facilmente mediante solução fisiológica na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) (Banerjee et al., 2001; Liu & Edwards, 1999).

Os principais usos do ^{99m}Tc em Medicina Nuclear estão exemplificados na TAB. 3 e são: marcação de peptídeos e proteínas; espécies coloidais e partículas; células sanguíneas, e sua maior versatilidade se deve a disponibilização de uma série grande de substâncias liofilizadas, chamadas comercialmente de reagentes liofilizados de radiodiagnóstico ou *KITS*, constituídos basicamente da substância a ser complexada, do agente redutor e do sistema tampão, cada um com uma aplicação diferenciada dentro do corpo humano.

TABELA 3. Alguns radiofármacos de tecnécio-99m e seus usos.

Radiofármacos	Alguns Usos
Pertecnetato	Tireóide; Divertículo de Meckel
DTPA	Filtração glomerular; função renal
MAG3 / EC	Secreção tubular aniônica / função renal
Macroagregados	Perfusão pulmonar
Colóide	Imagem de fígado; linfocintilografia
MDP	Imagem óssea
HMPAO	Imagem cerebral
MIBI	Imagem cardíaca
Tetrofosmina	Imagem cardíaca
Peptídeos	Caracterização de tecido tumoral
Anticorpos monoclonais	Caracterização de tecido tumoral

DTPA: Dietilenotriaminopentacético; MAG3: mercaptoacetiltriglicina; EC: etilenodicisteína; MDP: metilenodifosfonato; HMPAO: hexametilpropilenoaminaoxima; MIBI: metoxiisobutilisonitrila; Tetrofosmin: 6,9-bi(2-etoxietil)-3,12-dioxi-6,9-difosfotetradecano.

1.3.2 Terapia radionuclídica

A terapia radionuclídica usa fontes de radiação não-seladas para liberação seletiva da radiação aos tumores ou órgãos alvos. No tratamento de câncer, pode ser usado como parte de uma estratégia terapêutica com intenção curativa ou para controle da doença e palição. A toxicidade é geralmente

limitada ao tecido hematopoiético e poucos efeitos colaterais são observados (Chatal & Hoefnagel, 1999).

Na TAB. 4 estão descritas as vantagens e limitações da terapia radionuclídica sumarizadas por Chatal & Hoefnagel (1999).

TABELA 4. Vantagens e limitações da terapia radionuclídica.

Vantagens	Limitações
Especificidade (dose de radiação limitada ao alvo)	Isolação dos pacientes
Eficácia	Estocagem do lixo radioativo
Baixa toxicidade	Disponibilidade (radiofármacos, camas de isolamento)
Aplicação sistêmica ou locoregional	Alto custo de algumas formas novas de terapia
Excelente palição	Enfoque multidisciplinar requerido
Consequências limitadas a longo prazo	Necessidade de cálculos dosimétricos
Pré-avaliação da captação e retenção (traçador)	Mecanismo mal compreendido
Custo moderado (a maioria das aplicações)	
Possibilidade de tratamentos múltiplos	
Novas indicações emergentes	

Um dos fatores determinantes no desenvolvimento de qualquer radiofármaco terapêutico é a seleção de um radionuclídeo apropriado. A escolha do radionuclídeo dependerá das propriedades de emissão nuclear, da meia-vida física, das características de decaimento; os outros fatores são a farmacocinética *in vivo*, o custo e a disponibilidade do radiofármaco (Volkert & Hoffman, 1999). Estes radionuclídeos são, na maioria das vezes, emissores β^- e emissores α . Mas também podem ser radionuclídeos emissores de elétron Auger. Na TAB. 5 estão ilustrados alguns radionuclídeos candidatos para o tratamento de malignidades.

TABELA 5. Radionuclídeos usados com fins terapêuticos.

Radionuclídeo	Tipo de emissão	$T_{1/2}$	$E_{máx}$ (keV)	Alcance no tecido	Produção
^{186}Re	β^- , γ	3,8 d	(β^-): 1069	Máx: 5 mm	$^{185}\text{Re}(n,\gamma)^{186}\text{Re}$
^{166}Ho	β^- , γ	26,9 h	(β^-): 1853	Máx: 10,2 mm	$^{165}\text{Ho}(n,\gamma)^{166}\text{Ho}$
^{188}Re	β^- , γ	16,9 h	(β^-): 2120	Máx: 10,8 mm	Gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$
^{177}Lu	β^- , γ	6,7 d	(β^-): 500	1,8 mm	$^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$
^{131}I	β^- , γ	8 d	(β^-): 610	2,4 mm	$^{130}\text{Te}(n,\gamma) \rightarrow ^{131}\text{Te}(\beta^-)^{131}\text{I}$ ou $^{235}\text{U}(n,f)^{131}\text{I}$
^{153}Sm	β^- , γ	1,9 d	(β^-): 800	3,0 mm	$^{152}\text{Sm}(n,\gamma)^{153}\text{Sm}$
^{89}Sr	β^-	50,5 d	(β^-): 1463	Máx: 3 mm	$^{88}\text{Sr}(n,\gamma)^{89}\text{Sr}$
^{32}P	β^-	14,3 d	(β^-): 1710	Máx: 8,7 mm	$^{32}\text{S}(n,p)^{32}\text{P}$ ou $^{31}\text{P}(n,\gamma)^{32}\text{P}$
^{90}Y	β^-	64,1 h	(β^-): 2280	Máx: 12 mm	Gerador $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$
^{211}At	α , γ	7,2 h	(α): 5870	60 – 80 μm	$^{207}\text{Bi}(\alpha,2n)^{211}\text{At}$
^{213}Bi	α , γ	45,7 min	(α): 5869	50 – 80 μm	Gerador $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$
^{225}Ac	α	10 d	(α): 5830	40 – 80 μm	Gerador $^{225}\text{Ra}/^{225}\text{Ac}$

Os radionuclídeos que decaem por emissão β^- são os mais utilizados para aplicações terapêuticas na prática clínica e possuem um alcance no tecido apropriado e baixa transferência linear de energia (LET - *linear energy transfer*). Os radionuclídeos que emitem partículas- α têm um alcance limitado no tecido (50–80 μm) e alta transferência linear de energia (LET, 100 keV/ μm) (Liu, 2008). Esses emissores monoenergéticos depositam sua energia sobre espaços curtos (usualmente de 40 – 100 μm), sendo úteis para o tratamento de tumores de diâmetros pequenos. Os elétrons Auger são emitidos durante os processos de captura eletrônica e conversão interna e depositam altas quantidades de energia sobre dimensões subcelulares, resultando em destruição das células tumorais mais eficiente nos locais onde os emissores Auger estão localizados (Volkert & Hoffman, 1999; Junnotula, 2006).

1.3.2.1 Radioimunoterapia

A terapia direcionada para o tratamento de doenças malignas é um campo que vem crescendo rapidamente e tem conseguido sucesso com a introdução das drogas aprovadas pelo *FDA* adicionando uma nova modalidade às atuais terapias de câncer como cirurgia, quimioterapia e irradiação por feixe externo (radioterapia). A especificidade que é dada pelo veículo de escolha (ex: anticorpos, peptídeos, tetrâmeros, pequenas moléculas) pode ser complementada pela adição de uma carga de citotoxicidade para fornecer uma potente dose terapêutica. Isótopos radioativos emissores de partículas são alguns dos elementos mais promissores quando ligados a moléculas carregadoras a tumor alvo (Miederer et al., 2008).

O câncer é caracterizado por um crescimento celular irregular, mas o que o distingue de outras doenças é a habilidade que as células tumorais possuem de invadir e metastatizar. Se detectado precocemente, antes dele espalhar para fora dos limites e atingir os tecidos normais (ex: estágio 1), o tumor usualmente pode ser removido cirurgicamente sem requerer intervenção adicional, dando ao paciente um excelente prognóstico. Todavia, uma vez que o câncer escapou dos limites naturais, apenas cirurgia não é suficiente. Uma determinação da extensão que o câncer atingiu é essencial para seleção da estratégia de tratamento. Uma ampla escala de modalidades diagnósticas (ex: tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética, ultrasonografia, medicina nuclear) são usadas para rastrear a evidência da doença. Já o tratamento sistêmico mais comum para as doenças disseminadas é a quimioterapia, mas nos últimos 10 – 15 anos, um número crescente de agentes biológicos tem trazido um significativo impacto no tratamento de câncer, não apenas como terapêuticos (ex: interleucina-2, interferon-alfa, Rituximab, Trastuzumab e outros anticorpos), mas também para ajudar o corpo a neutralizar alguns dos efeitos colaterais da quimioterapia (Sharkey & Goldenberg, 2008).

Radioimunoterapia (RAIT) corresponde ao uso de anticorpos radiomarcados (seja com emissores α ou β) no tratamento de câncer (Olivier, 2004) e ganhou um lugar de destaque na terapia de Linfoma Não-Hodgkin (LNH). Seu princípio é combinar os mecanismos de ação do anticorpo “frio” com o dano causado pela radiação (De Decker et al., 2008).

O tratamento de LNH é baseado na histologia do tumor, extensão da doença (ou estágio) e fatores relacionados aos pacientes tais como idade, estado funcional e a presença de outras doenças. Várias opções de tratamento estão disponíveis, incluindo terapia oral alquilante (clorambucil ou ciclofosfamida com ou sem prednisona), outros regimes quimioterápicos (ex: CHOP, CVP [ciclofosfamida, vincristina e prednisona], fludarabina sozinha ou combinada com ciclofosfamida e outros), quimioterapia combinada com interferon alfa e radioterapia sozinha ou combinada com quimioterapia. Um tratamento objetivo importante para pacientes com LNH indolente é empregar drogas seletivas a tumores que prolongam a sobrevida com mínima toxicidade. Terapia com anticorpo monoclonal direcionado a antígenos de superfícies de células específicas a tumores fornecem uma alternativa promissora ou adjunta à quimioterapia convencional (Wood, 2001).

Nadler e colaboradores foram os primeiros a tratar pacientes com LNH com AcM em 1980 (Nadler et al. *apud* DeNardo, 2005). Miller e colaboradores produziram AcM antiidiotípicos para tratar pacientes com LNH linfocítico de células-B (Miller et al. *apud* DeNardo, 2005). Mais ou menos na mesma época, DeNardo e colaboradores usaram RAIT com sucesso para pacientes com LNH e leucemia linfocítica crônica (LLC) (DeNardo et al. *apud* DeNardo, 2005). Desde então, outros pesquisadores confirmaram o potencial de vários AcMs radiomarcados para LNH. McLaughlin e colaboradores demonstraram a eficácia dos AcM quiméricos anti-CD20 para imunoterapia para pacientes com LNH de baixo grau em um teste piloto que levou à aprovação do Rituximab (McLaughlin et al. *apud* DeNardo, 2005). Após isso os fármacos ^{90}Y -ibritumomab e ^{131}I -tositumomab foram aprovados para RAIT (DeNardo, 2005). A TAB. 6 sumariza os *highlights* da história da RAIT para pacientes com LNH de acordo com DeNardo (2005). As datas dos eventos apresentados na TAB.6 ocorridos após o ano 2000 foram baseadas nas publicações de Macklis (2007) e Torres-García e colaboradores (Torres-García et al., 2008).

TABELA 6. *Highlights* da história da RAIT para pacientes com LNH .

Ano	Acontecimento
1980	Descrição original da imunoterapia usando AcM CD20, Nadler.
1982	Descrição original da imunoterapia efetiva usando AcMs antiidiotípicos, Miller.
1987	Descrição original da RAIT em LNH (e LLC) usando o AcM ¹³¹ I-Lym-1, DeNardo.
1989	Descrição original da RAIT mieloablativa usando AcM ¹³¹ I-anti CD20, Press.
1990	Descrição original do uso da RAIT usando ⁹⁰ Y e AcM antiidiotípico, Parker.
1998	Aprovação do Rituximab baseado no teste piloto, McLaughlin.
2000	Descrição original da RAIT de pré-alvo, Weiden.
2002	Aprovação do tositumomab baseado em teste piloto, Kaminski.
2003	Aprovação do ibritumomab tiuxetan baseado no teste piloto, Witzig.

Os primeiros fármacos radioimunoterapêuticos que finalmente receberam aprovação oficial do *FDA* foram o ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan ou “Zevalin” (Biogen-Idec, Boston, MA) em 2002, e o ¹³¹I-tositumomab ou “Bexxar” (GlaxoSmith Kline Research, Triangle Park, NC) em 2003. Os dois radiofármacos foram aprovados com indicações clínicas para o tratamento de LNH de células-B CD20⁺ transformado, relapsado ou refratário (Macklis, 2007; Torres-García et al., 2008).

A radiação emitida dos anticorpos monoclonais radiomarcados tem importante efeito biológico que ajuda a explicar a melhor eficiência da RAIT comparada a terapia usando anticorpo não-marcado. O primeiro alvo para o dano da radiação é o DNA, mas a radiação também pode danificar as membranas e as organelas e iniciar uma sinalização na cascata apoptótica dentro das células (Ferro-Flores & Arteaga de Murphy, 2008). Foi demonstrado que irradiação das células cancerígenas com emissor β^- induz apoptose e ativa a cascata apoptótica em células de leucemia usando caminhos mitocondriais e a morte do receptor (Torres-García et al., 2008).

O efeito *bystander* da radiação também desempenha um importante papel na RAIT. Quando um anticorpo radiomarcado liga-se aos antígenos das células tumorais, a radiação proveniente do radionuclídeo é emitida em todas as direções e pode matar células vizinhas por efeito secundário. Efeito *bystander* pode também resultar de efeitos de células irradiadas sobre as células não-irradiadas (Ferro-Flores & Arteaga de Murphy, 2008).

Como o objetivo da RAIT é irradiar e destruir o tumor, cuidados devem ser tomados para que os órgãos normais não recebam radiação excessiva. A atividade terapêutica específica a ser injetada em um paciente é baseada na informação obtida na dose dosimétrica (Torres-García et al., 2008).

1.3.2.1.1 Rênio-188

Para uma identificação apropriada do radionuclídeo e do radiofármaco para uso em terapia, alguns fatores devem ser considerados, como: absorção e retenção no tumor, clareamento sanguíneo, razão de liberação da radiação, meia-vida e atividade específica e facilidade de produção em larga escala de uma forma econômica. Outras considerações práticas para a seleção são a disponibilidade e qualidade do radionuclídeo. A pureza do radionuclídeo tem que ser alta ou suficientemente alta e reprodutível, já que mínimas quantidades de impurezas podem afetar a radiomarcção e a pureza radioquímica do radiofármaco (Liu, 2008).

Neste contexto, o Rênio-188 (^{188}Re) é um radionuclídeo interessante com características físicas favoráveis, para uma variedade de aplicações médicas, nos campos de oncologia, endocrinologia, reumatologia, intervenção cardiológica e terapia radionuclídica (García-Garayova et al., 2007; Ponsard et al., 2003; Mushtaq, 2003; Vučina & Lukić, 2002).

O ^{188}Re possui uma $T_{1/2}$ física de 16,9 horas, decai para o estado fundamental do ^{188}Os , que é estável, pela emissão de uma partícula β^- de alta energia ($E_{\text{máx}} = 2,11 \text{ MeV}$), correspondendo a mesma magnitude da emissão β^- do ^{90}Y (2,3 MeV) (Faintuch et al., 2004; Jeong & Knapp Jr, 2008; Moustapha et al., 2006). A penetração média de sua partícula β^- é 3,3 mm (máximo de 10,8 mm),

proporcionando uma região circundada de deposição de alta energia com mínimo ou nenhum dano aos órgãos adjacentes (Crudo et al., 2002).

O ^{188}Re é produzido livre de carregador (Crudo et al., 2002) e pode ser obtido de maneira econômica por meio de um gerador de tungstênio-188/rênio-188 ($^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$), à base de alumina, onde o pai ^{188}W tem uma meia-vida longa de 69 dias, assegurando uma disponibilidade clínica diária (Chen et al., 2008; Murray et al., 2001; Jeong & Knapp Jr, 2008). Dessa maneira, o ^{188}Re é obtido como perrenato de sódio ($\text{Na}[^{188}\text{ReO}_4]$) pela eluição do gerador com solução salina 0,9%. O gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ fornece o radionuclídeo ^{188}Re na forma química de ânion tetraoxo $[^{188}\text{Re}][\text{ReO}_4]$, o qual constitui a espécie mais estável em solução aquosa para este metal (Boschi et al., 2003).

O radionuclídeo pai ^{188}W é produzido em um reator nuclear por uma reação de dupla captura nos alvos do ^{186}W enriquecido (abundância na natureza = 28,43 %). A produção e as propriedades de decaimento deste radioisótopo estão ilustradas na FIG. 4.



FIGURA 4. Produção e decaimento do radionuclídeo pai ^{188}W para o radionuclídeo filho ^{188}Re (Ponsard et al., 2003; Moustapha et al., 2006).

Uma outra vantagem é que o ^{188}Re emite um raio- γ de 155 keV (abundância de 15%), energia comparável a do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, permitindo então a detecção pelos equipamentos de imagem, sendo útil para avaliação da biocinética e dosimetria (El-Mabhouh & Mercer, 2008; Wunderlich et al., 2008).

1.4 Métodos de marcação de anticorpos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re

Muito se discute sobre a semelhança dos radioisótopos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re . Ambos pertencem ao grupo 7 dos elementos, espera-se então que sua química seja similar em muitos aspectos. O Rênio, que é localizado exatamente abaixo do tecnécio na tabela periódica, tem a mais versátil química de coordenação entre os elementos de transição. Alcança uma extensa cadeia de estados de oxidação de +1 a +7 sob condições moderadas, sendo que a diferença mais significativa

estruturalmente nos complexos análogos de tecnécio e rênio pode ser encontrada no seu potencial de redução (Sasaki, 2005).

Devido a essa química similar, muitos dos métodos de marcação com ^{188}Re (ou ^{186}Re) são baseados nos métodos para $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Eckelman e colaboradores (Eckelman et al., 1989), em uma conferência em 1988, apresentaram três rotas de marcação de anticorpos com o radioisótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$: (1) marcação direta, (2) marcação indireta por meio de um grupo quelante ligado ao anticorpo (pré-conjugação) e (3) marcação indireta pela ligação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -quelante ao anticorpo (pós-conjugação) (Eckelman & Steigman, 1991; Luo et al., 2009; Crudo et al., 2002; De Decker et al., 2008).

Os próximos tópicos discutirão três tipos de métodos de marcação, aqui denominados: método direto, método indireto e via carbonila.

1.4.1 Método direto de marcação

O método direto de marcação baseia-se na ligação do radionuclídeo com os grupos endógenos ou grupos tióis livres da proteína (pontes dissulfídicas).

No procedimento de marcação direta, a proteína, o radionuclídeo e o agente redutor são misturados, sendo que o íon estanho é o mais usado para marcar proteínas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, servindo como redutor das pontes dissulfídicas dos AcM. Anticorpos do tipo IgG contém de 4 a 6 pontes dissulfídicas intercadeias e numerosas pontes dissulfídicas intracadeias. Baseado nisso, Buck Rhodes desenvolveu o método de marcação "*pretinning*" por incubação do anticorpo com cloreto estanoso durante a noite (Rhodes *apud* Eckelman & Steigman, 1991). Este procedimento é a base conceitual para muitos métodos de marcação direta que são usados hoje em dia (Eckelman & Steigman, 1991).

Reno & Bottino em 1987 (Reno & Bottino *apud* Eckelman & Steigman, 1991) refinaram e expandiram o método de Rhodes sugerindo uma série de agentes redutores (ditiotreitól, borohidreto de sódio, fósforotioato de sódio, ditioeritritól, 2-mercaptoetanol, cisteína, N-acetilcisteína e glutatona), agentes transquelantes fracos para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (tartarato, glucoheptonato) e estabilizadores para os grupos sulfidrilas formados (íon zinco) (Eckelman & Steigman, 1991).

Em muitos casos, a técnica de marcação direta é uma combinação da técnica para aumentar o número dos grupos sulfidrilas em um anticorpo com um agente redutor e o uso de um ligante capaz de solubilizar o Tc(V) para troca rápida do metal com o anticorpo (Eckelman & Steigman, 1991).

A marcação direta de proteínas com ^{99m}Tc ou ^{188}Re envolve, em resumo (FIG. 5): (1) Aplicação de um agente redutor para quebrar as pontes dissulfídicas com a finalidade de expor os resíduos de cisteína da proteína; (2) Redução do ^{99m}Tc ou ^{188}Re para o requerido estado reduzido, com um agente redutor, principalmente cloreto estanoso, na presença de um agente complexante apropriado (tampão de transquelatação) com complexação simultânea do ^{99m}Tc ou ^{188}Re reduzido (presumidamente no estado pentavalente) e (3) Transquelatação do ^{99m}Tc ou ^{188}Re reduzido do complexo intermediário aos resíduos de cisteína da proteína (Dadachova & Mirzadeh, 1997; Castiglia, 2003).

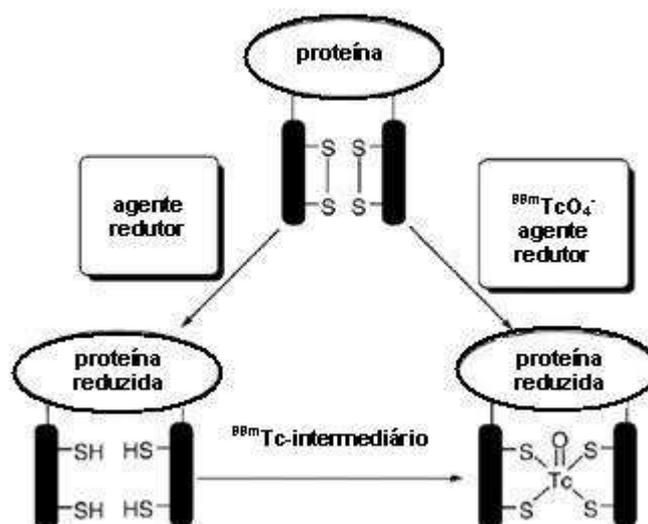


FIGURA 5. Esquema do método direto de marcação de proteína com o radionuclídeo ^{99m}Tc que serve como analogia para o radionuclídeo ^{188}Re (Liu, 2008).

Steigman e colaboradores (Steigman et al., 1975) foram os primeiros a sugerir que os grupos sulfidrilas eram responsáveis pela marcação direta com o ^{99m}Tc (Eckelman et al., 1989; Eckelman & Steigman, 1991). Eles provaram o papel das sulfidrilas ou sulfúricos na marcação de albumina, quando desenvolveram uma coluna de Sephadex G-25 para separar e medir o rendimento da união de alta afinidade do ^{99m}Tc aos anticorpos, comprovando sua verdadeira

potencialidade. Como resultado deste método de análise descobriram que era necessário uma incubação prolongada de anticorpos com íons de estanho, antes da marcação com ^{99m}Tc , para obter uma proteína marcada com alta afinidade (Castiglia, 2003).

Paik e colaboradores em 1985 substanciaram essa hipótese determinando o número de grupos sulfidrilas livre (-SH), produzidos pela incubação com o íon estanho, por titulação com reagente de Ellman (Paik et al., 1985). Nenhum grupo -SH pôde ser detectado antes da adição do íon estanho (Eckelman & Steigman, 1991). O mesmo grupo também provou a existência de sítios de alta e baixa afinidade de união, medindo a quantidade de proteína marcada na presença de quantidades variáveis de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), um agente quelante forte para íons de ^{99m}Tc . Estes autores sugeriram que os sítios de alta afinidade estavam relacionados com a presença destes grupos sulfúricos (Castiglia, 2003).

O uso de Sn (II) para reduzir a cisteína está reconhecido a muitos anos e pode ser usado para reduzir as pontes dissulfídicas das proteínas e para protegê-las da reoxidação. Rhodes e colaboradores demonstraram esta hipótese utilizando anticorpos marcados com ^{125}I que logo foram reduzidos e quantificaram a união em fase sólida em um gel que unia os grupos tióis (Rhodes et al. *apud* Castiglia, 2003). Os autores encontraram que a incubação com Sn reduz as pontes dissulfídicas e estimaram em 4% esta redução. Estes valores foram achados também por outros investigadores. Todavia, a hidrólise fácil do íon Sn^{2+} tornou o método inconveniente para uso (Castiglia, 2003).

O agente redutor 2-Mercaptoetanol (2-ME) foi proposto por Bremer em 1986 e aperfeiçoado por Schwarz & Steinstrasser em 1987 (Schwarz & Steinstrasser *apud* Xiangyun et al., 2000). Outros redutores, tais como sulfito, ácido ascórbico, ditiotrose, tiosulfato, ditionato, também são usados por outros pesquisadores (Xiangyun et al., 2000). Mather & Ellison em 1990 (Mather & Ellison *apud* Castiglia, 2003) estudaram a redução de pontes dissulfídicas usando 2-mercaptoetanol e encontraram que um incremento na redução estava acompanhado por um incremento na eficiência de marcação (Castiglia, 2003).

Com respeito aos complexos intermediários do ^{99m}Tc e a marcação por transquelação tem-se usado diversos agentes tais como glucoheptonato,

tartarato, pirofosfato, metilendifosfonato (MDP) e vários análogos que servem de ligantes de transferência para marcar anticorpos após a redução dos mesmos (Castiglia, 2003).

A principal vantagem do método direto é sua simplicidade experimental e a possibilidade de desenvolver formulações liofilizadas, prontas para marcar em apenas uma etapa e serem utilizadas no diagnóstico por imagem em centros de Medicina Nuclear (Castiglia, 2003; Eckelman et al., 1989).

1.4.2 Método indireto de marcação

No método indireto de marcação de anticorpos o ^{99m}Tc é coordenado por meio de um agente quelante sintético, o qual pode ser conjugado à proteína antes ou depois do processo de radiomarcação. A marcação de compostos bioativos com ^{99m}Tc requer então a conjugação a um agente quelante bifuncional (*BFC – bifunctional chelating agent*). Este agente contém em sua estrutura um grupo funcional através do qual pode-se unir covalentemente a um composto bioativo, sendo as uniões de diferentes tipos, por exemplo amida, tiouréia, éster ou também carbono-carbono. A segunda condição é que se deve ter um grupo doador de átomos de tal modo que se possa formar um complexo estável com ^{99m}Tc (Castiglia, 2003; Jeong et al., 2004).

Esta técnica pode ser usada também para marcar peptídeos, agentes de união a receptores e outras moléculas bioativas. Utilizam-se geralmente dois esquemas de marcação: um primeiro que usa um quelato pré-formado marcado, o qual é conjugado ao composto bioativo ou um segundo esquema no qual se realiza a marcação imediata da conjugação biomolécula-quelante (Castiglia, 2003).

No primeiro caso, os primeiros desenvolvimentos de marcação utilizaram o DTPA, conjugado às proteínas por meio de diversos derivados, como por exemplo o anidrido bicíclico. Também usaram derivados da bis-N-metil semicarbazona. Em ambos os casos observaram-se problemas de baixos rendimentos de marcação específica com o ^{99m}Tc e união de colóides ao anticorpo (Castiglia, 2003).

Para evitar este inconveniente Fritzberg e colaboradores desenvolveram a técnica de quelato pré-formado (FIG. 6) marcando um quelato do tipo N_2S_2

formando-se um complexo estável de ^{99m}Tc com valência +V (Fritzberg et al. *apud* Castiglia, 2003). Posteriormente se forma um éster ativo o qual é finalmente conjugado ao anticorpo. Este processo é lento e requer purificações dos intermediários e do conjugado final marcado. Tem-se realizado modificações desta técnica, usando ligantes tipo N_3S mercaptoacetiltriglicina (MAG3), ou preparando outros ésteres ativos. No entanto, dificilmente podem-se adaptar estas técnicas para usá-las em um serviço de Medicina Nuclear (Castiglia, 2003).

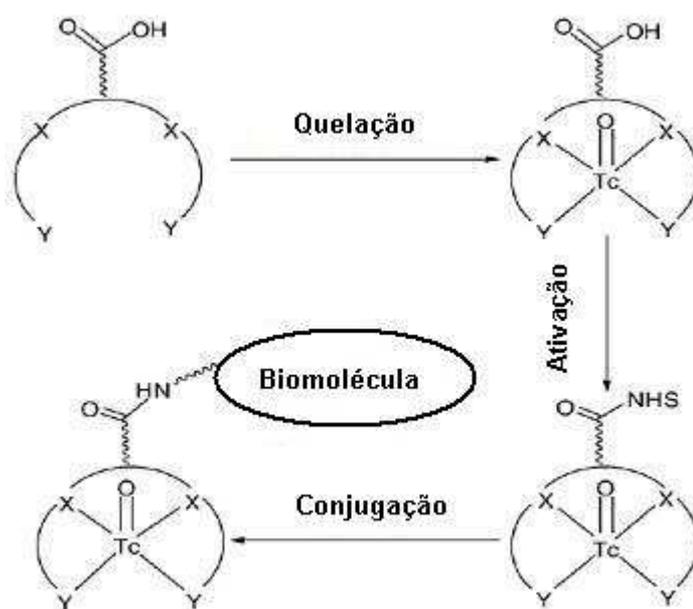


FIGURA 6. Esquema da técnica de pré-marcação (*pre-labeling* ou *pre-formed chelate approach*), a qual envolve primeiro a formação do ^{99m}Tc -quelato BFC e conjugação posterior à biomolécula em uma etapa separada (Liu, 2008).

Com respeito à marcação pós-conjugação (FIG. 7), foram desenvolvidos agentes biquelantes que permitem uma marcação pós-conjugação. Estes compostos podem unir-se ao composto bioativo e logo marcar este conjugado por agregação de um complexo fraco de ^{99m}Tc tal como o ^{99m}Tc -gluconato (Castiglia, 2003).

Entre as técnicas que empregam este método pode-se citar a de Abrams e colaboradores na qual o quelante hidrazina-nicotinamida está unido covalentemente à proteína e o ^{99m}Tc é agregado ao sistema como um complexo com o gluconato (Abrams et al. *apud* Castiglia, 2003). Usando o quelante N-hidroxisuccinimidil 6-hidrazinonicotinato (S-Hynic), geralmente através de um

ligante, tem-se marcado anticorpos com sucesso com ^{99m}Tc , resultando em uma marcação estável tanto *in vitro* como *in vivo* (Castiglia, 2003).

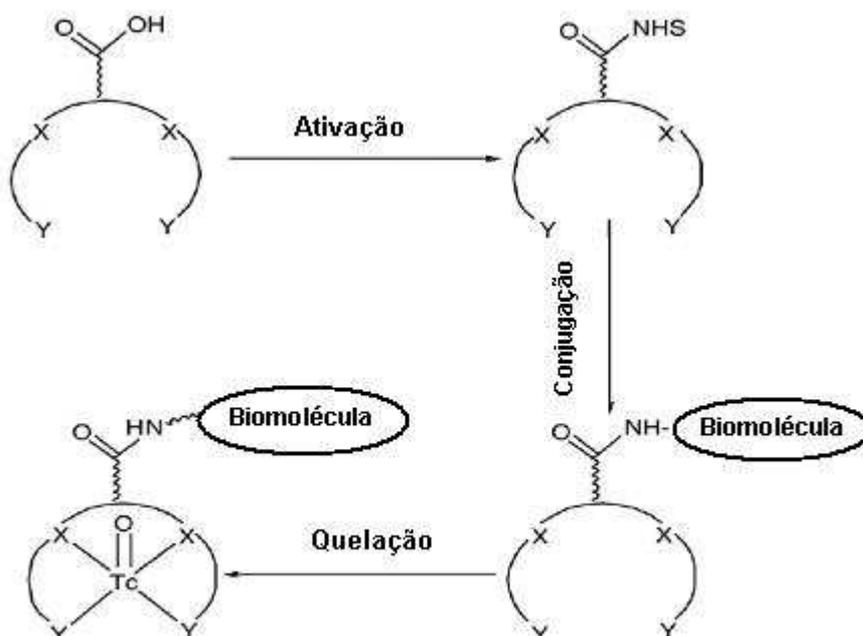


FIGURA 7. Esquema da técnica de pós-marcação (*post-labeling approach*), onde um BFC é primeiramente ligado à biomolécula (BM) para formar o conjugado BFC-BM. Uma vez formado o conjugado BFC-BM, a radiomarcagem pode ser feita pela redução direta do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ou por troca de ligante com um complexo intermediário de ^{99m}Tc , como por exemplo $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ -gluconato (Liu, 2008).

1.4.3 Marcação usando o núcleo carbonila

Como membros do grupo 7 da Tabela Periódica, os elementos com o número atômico 43 (tecnécio) e 75 (rênio) possuem uma rica química de coordenação. Isto cobre 8 diferentes estados de oxidação e vários sistemas de ligantes (Abram & Alberto, 2006).

É fato que o rênio necessita de fortes condições para ser reduzido de seu estado de oxidação original +VII para estados de oxidação mais baixos, tipicamente +V/+III. É também frequentemente observado que estes complexos de rênio têm uma maior tendência a se reoxidar do que seus análogos de tecnécio. Entretanto, complexos mais inertes cineticamente contendo tecnécio e rênio num baixo estado de oxidação +I receberam mais atenção nos anos de 1990 a 2000. Centros de metais leves mostram uma inércia de cinética aumentada e uma baixa afinidade para fortes grupos doadores de nitrogênio e

oxigênio, facilmente presentes no sangue. Estas características protegem os complexos *in vivo* contra dissociação do ligante ou troca do ligante (Schibli et al., 2000).

Os complexos organometálicos de tecnécio e rênio em baixos estados de oxidação ganharam considerável atenção no desenvolvimento de novos radiofármacos alvo-específicos. As razões são primariamente as características excepcionais dos compostos correspondentes em termos de tamanho reduzido e cinética inerte dos complexos. Provavelmente o radiofármaco mais importante com o tecnécio em um baixo estado de oxidação é o $^{99m}\text{Tc}[\text{MIBI}]^{6+}$ (Sestamibi), o qual contém somente pontes monodentadas M-C, e é perfeitamente estável *in vivo*, mas completamente inerte contra substituição, não sendo então útil para propósitos de marcação. Uma técnica para resolver esse problema é o uso do composto de Tc(I)-carbonila (Waibel et al., 1999).

Em particular, complexos tricarbonila de Tc(I) e Re(I) parecem ser candidatos ideais para a marcação de biomoléculas ávidas receptoras. Todavia, os primeiros desenvolvimentos para produzir complexos de $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ -tricarbonila sofreram pela dificuldade de serem realizados em um ambiente de rotina clínica devido a alta pressão do gás CO e múltiplas sínteses necessárias. Isto pode ser contornado por uma preparação conveniente de um kit aquoso do precursor organometálico $fac\text{-}[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, $\text{M} = ^{99m}\text{Tc}$ e ^{188}Re , desenvolvido pelo grupo de Schibli e colaboradores, sob condições fracas de reação na presença de monóxido de carbono gasoso e borohidrato de sódio (Alberto et al., 1998). Este precursor não é somente rapidamente solúvel em água como também revela boa estabilidade em soluções aquosas sob uma ampla faixa de pH (de 2 – 12) por várias horas. As três moléculas de água coordenadas ao núcleo $fac\text{-}[\text{M}(\text{CO})_3]$ altamente inerte são rapidamente substituídas por uma variedade de grupos funcionais tais como aminas, tioéters, tióis e fosfinas. Isto pode ser representativamente mostrado por numerosas reações de substituição com sistemas ligantes mono, bi e tridentados a nível macroscópico (Schibli et al., 2000).

O precursor tricarbonila $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ mostrou ser um excelente material de início para a síntese do posterior complexo tricarbonila $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ e $^{188}\text{Re}(\text{I})$ assim como para radiomarcção de biomoléculas alvo específicas. Primeiramente, o complexo foi preparado em um procedimento de etapa única a

partir do $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ na presença de CO e BH_4^- como um agente redutor. Infelizmente, a preparação publicada de $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, por depender do monóxido de carbono gasoso, é inapropriada para uso em kits comerciais. Então, o desafio foi encontrar um sólido, fonte de monóxido de carbono estável no ar, agindo possivelmente como um agente redutor. Os chamados boranocarbonatos (BC), tais como o sal potássio $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ foram descritos primeiramente por Malone & Parry em 1967 (Malone & Parry *apud* Alberto et al., 2001). Eles foram reportados por liberar CO a temperaturas elevadas em água. Em conjunção com um tampão apropriado (Borax) e um agente complexante para tecnécio no estado de oxidação intermediário (tartarato), isso poderia ser usado para preparar o complexo de tecnécio-carbonila $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ solúvel e estável em água (Alberto et al., 2001).

Uma formulação na forma de kit liofilizado (IsoLink – Mallinckrodt Medical), FIG. 8, foi desenvolvida substituindo o gás CO e o NaBH_4 por boranocarbonato de potássio, $\text{K}_2[\text{BH}_3\text{CO}_2]$, como uma fonte de monóxido de carbono, para preparo do complexo precursor de ^{99m}Tc . Este reagente sólido serve como uma fonte de monóxido de carbono e como um agente redutor do ^{99m}Tc . Isso também foi usado por Schibli e colaboradores (Schibli et al., 2002) para o preparo do correspondente complexo precursor de ^{188}Re (Park et al., 2006).

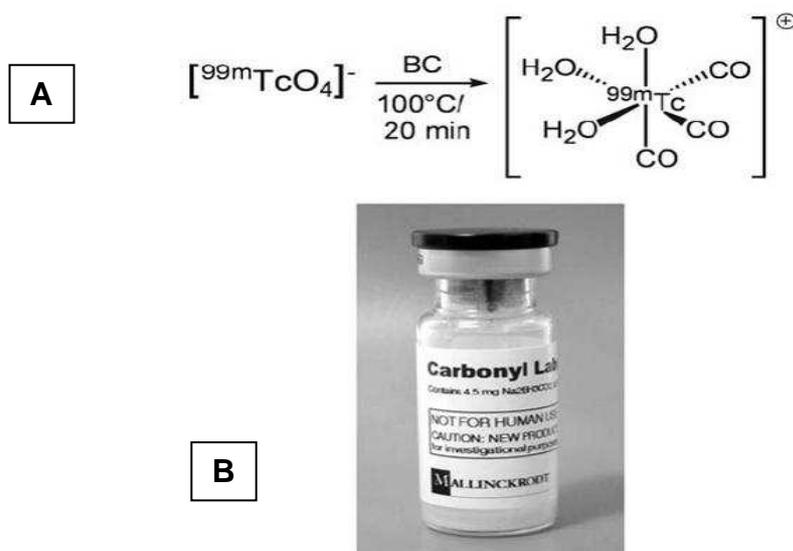


FIGURA 8. (A) Esquema da reação de produção do ^{99m}Tc -carbonila e (B) Foto do kit para produção do ^{99m}Tc -carbonila, chamado de “IsoLink” e comercializado pela Mallinckrodt.

O precursor $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ é o foco da técnica da carbonila e pode ser chamado de um “íon semi aquoso” com três CO firmemente ligados e três ligantes H_2O fracos. O $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ representa um precursor estável. Importante citar que, como um precursor, não requer necessariamente de coligantes, como nas espécies oxo Tc(V), para estabilizar o estado de oxidação +I, e independente de temperatura, pH e tempo, o único produto preparado no kit é o $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$. Após o preparo ele pode ser estocado por algumas horas normalmente no kit. Sensibilidade a O_2 a temperatura ambiente é moderada comparada com a dos intermediários Tc(V). Ligantes monodentados tais como imidazol ou purinas, ligantes bidentados tais como histamina, aminoácidos e ácido picolínico e ligantes tridentados tais como histidina eficientemente substituem os ligantes H_2O e protegem a molécula $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ contra transmetalção ou reoxidação. Do ponto de vista químico, a conveniência do preparo do $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ em um kit e sua reação limpa com uma variedade de ligantes livres ou acoplados a biomoléculas são os argumentos mais favoráveis em favor da técnica da carbonila (Alberto, 2003).

No caso do ^{188}Re , o núcleo $\text{Re}(\text{CO})_3^+$ tricarbonila fornece um novo desenvolvimento para marcar biomoléculas com este radionuclídeo. A química da carbonila foi primeiramente investigada a nível macroscópico usando rênio estável, seguida pela investigação da marcação com ^{99m}Tc para aplicações na imagem e posteriormente marcando com radorênio para aplicações terapêuticas. A marcação com ^{99m}Tc -tricarbonila foi estudada por vários anos, enquanto que a marcação de biomoléculas com rênio é algo recente. O kit do ^{99m}Tc -carbonila fornece um rendimento de aproximadamente 95%. Um procedimento para o preparo do ^{188}Re -tricarbonila com um rendimento acima de 90% tem sido desenvolvido (Alberto, 2007).

De maneira parecida para o ^{99m}Tc , dois protocolos para o preparo de ^{188}Re -tricarbonila foram propostos por Schibli e colaboradores, cada um fornecendo uma pureza radioquímica de 80 - 85%. No primeiro, $\text{BH}_3.\text{NH}_3$ foi usado como um agente redutor e gás CO como uma fonte de carbono. Após introdução de uma solução combinada do eluído de ^{188}Re e H_3PO_4 concentrado em um frasco contendo $\text{BH}_3.\text{NH}_3$ e CO, o frasco foi aquecido a 60°C por 15 min. O rendimento final foi de 85% e o pH foi neutralizado pelo NH_3 gerado do $\text{BH}_3.\text{NH}_3$. O segundo protocolo também usou $\text{BH}_3.\text{NH}_3$ como um redutor mas

substituiu o gás CO por $K_2[H_3BCO_2]$ como fonte de carbono. O procedimento de marcação foi o mesmo do primeiro protocolo e o rendimento final foi de 80% (Schibli et al., 2002). Uma propriedade importante do ^{188}Re -tricarbonila é sua instabilidade levando à oxidação lenta para perrenato. Todavia, o núcleo é mais estável após coordenação aos ligantes orgânicos. A propriedade química mais importante para o núcleo ^{188}Re -tricarbonila pode ser sua habilidade para formar complexos com um quelante ligado à biomolécula. As 3 posições livres do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3^+$ são ocupadas com H_2O e podem ser substituídas por ligantes monodentados, bidentados e tridentados (Alberto, 2007).

2. OBJETIVO

O objetivo geral do trabalho foi estudar a marcação do anticorpo monoclonal anti-CD20 (Rituximab) com o radioisótopo ^{188}Re usando duas técnicas de marcação distintas:

- ◆ Método direto de marcação – com o ^{188}Re no estado de oxidação V.
- ◆ Método de marcação via carbonila – com o ^{188}Re no estado de oxidação I.

Especificamente, pretendeu-se:

1. Otimizar os parâmetros de marcação para encontrar a melhor formulação, denominada de “formulação otimizada”.

Para esta formulação otimizada, avaliaram-se:

2. O comportamento *in vitro*: estabilidade no plasma; testes de transquelação, imunorreatividade e afinidade de ligação,
3. O comportamento *in vivo* em animais portadores de tumor.

O trabalho apresenta como contribuição inédita o estudo de marcação via carbonila, uma vez que não é referenciada em literatura a marcação deste anticorpo com ^{188}Re por este método.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Marcação de anti-CD20 com $^{188}\text{Re(V)}$

Oliver e colaboradores reduziram o anti-CD20 com 2-ME para formulação de um kit liofilizado para marcação instantânea com ^{188}Re . Cada kit continha 1 mg de anti-CD20; 82,8 mg de tartarato de sódio; 1,67 mg de fluoreto estânico e 0,25 mg de ácido gntísico. Para a marcação, perrenato de sódio (1,5 – 1,9 GBq / 40,5 – 51,3 mCi) foi acidificado, adicionado ao kit e então incubado por 1 hora em temperatura ambiente. A marcação com ^{188}Re forneceu uma pureza radioquímica maior que 95% para um tempo de reação de até 3 horas e a atividade específica foi 1,48 – 1,85 MBq/ μg (40 – 50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). A distribuição biológica mostrou alta eliminação urinária até 24h (59%) enquanto a excreção gastrointestinal foi de 10%. Captação insignificante pela tireóide e estômago (menor que 0,75 e 1,9%, respectivamente) foi observada (Oliver et al., 2005).

Leyva e colaboradores reportaram sua experiência usando ^{188}Re marcando o anticorpo quimérico anti-CD20 (Rituximab). A redução do anticorpo monoclonal (AcM) foi realizada com 2-ME numa razão molar de 2000:1 (2-ME:anticorpo). Eles obtiveram de 4 - 5 grupos sulfidrilas na redução. A eficiência de marcação (>95%) deste método mostrou que o produto final não necessitou de purificação posterior para propósitos clínicos. Estudos de estabilidade *in vitro* do anti-CD20 marcado foram realizados a temperatura ambiente a 4 h, 24 h e 48 h em cisteína, soro humano e salina. Na presença do soro humano, durante as primeiras 4 h ocorreu transquelação de cerca de 15% do ^{188}Re para proteínas do soro. ^{188}Re radiomarcado também foi transcomplexado para cisteína após 1 h de incubação a 37°C. Estudos de biodistribuição foram realizados mostrando uma pequena atividade nos rins (10,41%), pulmões (14,72%) e sangue até 4 h. Estes valores foram reduzidos até 24 h. Os outros órgãos (coração, fígado, estômago, baço, etc) tiveram baixa acumulação do radiotraçador. A imunorreatividade não foi afetada pela marcação (Leyva et al., 2005).

Ferro-Flores e colaboradores marcaram o anti-CD20 com ^{188}Re por um método de marcação direto usando tartarato de sódio como um ligante competidor fraco. Diferentes formulações liofilizadas foram preparadas para otimizar a concentração de cloreto estanoso e de tartarato, o pH e o tempo de reação. Estudos de biodistribuição em camundongos normais foram realizados para assegurar a estabilidade *in vivo* do complexo ^{188}Re -anti-CD20. Foi obtida uma alta pureza radioquímica (>97%) e alta atividade específica (0,5 – 0,7 GBq.mg⁻¹ / 13,5 – 18,9 mCi.mg⁻¹) 1 – 1,5 h após adição do perrenato de sódio ao kit liofilizado otimizado contendo 2 mg de anti-CD20, 2,3 mg de cloreto estanoso anidro, 87 mg de tartarato de sódio dihidratado e 0,5 mg de ácido ascórbico, em pH 4,0. Nenhuma evidência do ^{188}Re livre foi encontrada nas 2, 4 e 24 h após administração do ^{188}Re -anti-CD20 em camundongos. Kits liofilizados mostraram alta estabilidade durante a estocagem a 4 °C por 6 meses (Ferro-Flores et al., 2005).

Torres-García e colaboradores fizeram um estudo preliminar para estabelecer a biocinética do ^{188}Re -anti-CD20 em pacientes e avaliar sua dosimetria como um radiofármaco específico para radioimunoterapia de LNH. A composição do kit foi de 1 mg de anti-CD20; 90 mg de tartarato; 2,4 mg de SnCl₂ e 0,25 mg de ácido ascórbico. Os kits foram reconstituídos com 3 mL (74 – 110 MBq, 2 – 3 mCi / 3 mL;) de perrenato, aos quais 40 µL de HCl 12 mol.L⁻¹ foram adicionados para ajustar o pH para 3 – 3,5 sendo esta solução adicionada ao kit para reconstituição instantânea (pH 4). Após incubação em temperatura ambiente por 60 minutos e imediatamente antes da administração aos pacientes, 1 mL de tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹ estéril pH 7,0 foi adicionado à solução radiofarmacêutica, aumentando o pH final para 5 – 5,5. A pureza radioquímica determinada por ITLC e HPLC foi maior que 95% com menos de 2% de $^{188}\text{ReO}_4^-$, de 2 – 3% de ^{188}Re -tartarato e menos de 1% de ^{188}Re -hidrolisado. Imagens do corpo inteiro dos pacientes foram adquiridas nos vários tempos após administração do ^{188}Re -anti-CD20. Estudos dosimétricos indicaram que após administração de 4,87 – 8,72 GBq (131,62 – 235,67 mCi) de ^{188}Re -anti-CD20, a dose total absorvida pelo corpo seria 0,75 Gy, o que corresponde à dose recomendada para terapia de LNH (Torres-García et al., 2008).

3.2 Marcação de anti-CD20 com ^{99m}Tc (V)

Gmeiner Stopar e colaboradores marcaram o Rituximab com ^{99m}Tc usando o método de fotoativação para a redução do anticorpo. O anticorpo foi purificado da solução de MabThera (Roche), fotoativado por irradiação UV e marcado com ^{99m}Tc (500 MBq/13,5 mCi). A eficiência do método de marcação foi avaliada pela determinação do número de grupos tióis livres por anticorpo fotoreduzido, pela pureza radioquímica e estabilidade *in vitro*. O rendimento de marcação foi maior que 95% e reprodutivo após estocagem do anticorpo fotoativado a 80°C por 195 dias. Uma média de 4,4 grupos tióis livres por anticorpo fotoreduzido foi determinada e a imunorreatividade foi mantida (Gmeiner Stopar et al., 2006).

Gmeiner Stopar e colaboradores demonstraram a primeira experiência clínica do Rituximab marcado com ^{99m}Tc . O anticorpo foi reduzido e marcado com ^{99m}Tc (700 MBq/18,9 mCi) pelo mesmo método apresentado pelo grupo em trabalho prévio. Dez pacientes (entre 31 – 70 anos) foram administrados com ^{99m}Tc -rituximab. Imagens SPECT e de corpo inteiro foram realizadas após 1, 3, 6 e 20 h pós-injeção do marcado e os resultados cintilográficos comparados com os achados da tomografia computadorizada (CT). Em todos os pacientes a atividade injetada foi vista na corrente sanguínea, fígado, rins e baço. Em um paciente, atividade aumentada do ^{99m}Tc -rituximab foi adicionalmente vista em uma região não evidenciada pelo CT. Em outros três pacientes acumulação aumentada foi vista na medula óssea (Gmeiner Stopar et al., 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Infraestrutura e Equipamentos

Os procedimentos de marcação pelo método direto e controle de qualidade foram realizados nos laboratórios da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). Com a gratificação de uma bolsa CNPq de doutorado sanduíche, o estudo de marcação via carbonila foi realizado no Centro de Radiofarmácia do *Paul Scherrer Institute* (PSI) na Suíça. Os equipamentos utilizados, tanto nos laboratórios do IPEN quanto nos do PSI, estão listados a seguir:

IPEN:

- ◆ Calibrador de dose, modelo CRM-35R: Capintec
- ◆ Chapa de aquecimento com agitador
- ◆ Estufa com microprocessador de controle de temperatura, modelo Orion 515: Fanen
- ◆ Espectroscopia gama com detetor de Ge hiperpuro, modelo GX1518 da Canberra, acoplado ao programa Geniepc para tratamento dos dados
- ◆ Balança analítica, modelo M-220: Denver Instrument
- ◆ Balança analítica, modelo AUW 220D: Shimadzu
- ◆ Contador automático tipo poço, com cristal NaI (TI), modelo D5002 cobra II: Packard-Canberra
- ◆ Espectrofotômetro UV-VISÍVEL, modelo U-2010: Hitachi Instruments
- ◆ pHmetro, modelo DM-20: Digimed
- ◆ Gama-câmara para animais, modelo Nuclide TH22: Mediso

PSI:

- ◆ Equipamento de cromatografia líquida rápida de proteína (*Fast-protein liquid chromatography – FPLC*), modelo Biologic Duo Flow: BIO-RAD,

acoplado com detetor radioativo do tipo Radioactivity Monitor CB506 C-1: Berthold

- ◆ Contador automático tipo poço, com cristal NaI (TI), modelo D5002 cobra II: Packard-Canberra
- ◆ Equipamento SPECT/CT para pequenos animais: X-SPECT, Gamma Medica-Ideas Inc
- ◆ Espectrofotômetro UV-VISÍVEL, modelo Lambda 35: Perkin Elmer
- ◆ Forno de microondas para síntese, modelo Initiator 2.5: Biotage
- ◆ Termomixer, modelo 5436: Eppendorf
- ◆ Incubadora, *shaker* Heidolph Unimax 1010 e *heating* Heidolph Inkubator 1000: Heidolph
- ◆ Leitor de fósforo, resolução do tipo super – 12,5 x 25,2 cm²: Perkin Elmer
- ◆ Imageador de fósforo, modelo Cyclone Plus: Perkin Elmer
- ◆ Centrífuga, modelo 5415C: Eppendorf
- ◆ pHmetro, modelo 654: Metrohm
- ◆ Balança analítica, modelo AE 240: Metler

4.2 Lista de Materiais e Reagentes

- ◆ Geradores de ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re: Polatom e ITG (*Isotope Technologies Garching*)
- ◆ Gerador de ⁹⁹Mo-^{99m}Tc: Mallinckrodt
- ◆ Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20, MabThera (Rituximab, 100mg / 10 mL): Roche
- ◆ Camundongos nude imunodeficientes atímicos fêmeas (CD1-foxn1^{nu}): Charles River e biotério IPEN-CNEN/SP
- ◆ Células de linfoma de Burkitt: Ramos (ATCC) e Raji (ATCC e BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro)
- ◆ 2-mercaptoetanol (2-ME): Sigma e Fluka
- ◆ Solução isotônica de cloreto de sódio à 0,9% (NaCl 0,9%): Aster
- ◆ Nitrogênio gasoso (> 99,9% pureza): White Martins
- ◆ Fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O), FR: Merck
- ◆ Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), grau de pureza p.a.: Merck
- ◆ Cloreto de Sódio (NaCl), grau de pureza p.a.: Merck

- ◆ Hidróxido de sódio (NaOH): Merck
- ◆ Ácido Gentísico (ácido-2,5-dihidroxibenzóico) P.A. (> 99% pureza): Aldrich
- ◆ Potássio e Sódio tartarato tetraidratado ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$): Merck
- ◆ Cloreto Estanoso - $SnCl_2 \cdot 2H_2O$: Quimex
- ◆ Ácido 4-morfolinopropanosulfônico (MOPS): Sigma
- ◆ Borano de amônia (BH_3NH_3): Fluka
- ◆ Boranocarbonato de sódio ($Na_2BH_3CO_2$): Sigma-Aldrich
- ◆ Borato de sódio anidro ($Na_2B_4O_7$): Fluka
- ◆ Carbonato de sódio (Na_2CO_3): Merck
- ◆ Ácido ascórbico, $\geq 99\%$: Fluka
- ◆ Água bidestilada - Purificador Milli-RX 45: Millipore
- ◆ Metiletilcetona (MEC): Synth (Labsynth)
- ◆ Etanol: Merck
- ◆ Hidróxido de amônia: F. Maia
- ◆ Ácido clorídrico fumegante 37%, p.a: Merck
- ◆ Soro Albumina Humana (SAH), Albumina humana a 20% Immuno: Baxter
- ◆ Soro Albumina Bovino (BSA): Sigma
- ◆ Soro fetal bovino: Cultilab
- ◆ Suplementos de cultura celular: BioConcept
- ◆ Cloridrato de cisteína ($C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$): Merck
- ◆ L-Cisteína ($C_3H_7NO_2S$): Fluka
- ◆ L-Histidina ($C_6H_9N_3O_2$): Aldrich
- ◆ Reagente de Ellman , 5,5'-Ditio-Bis (Ácido 2-nitrobenzóico): Sigma
- ◆ Coluna PD-10 de Sephadex G25 médio: Amersham Pharmacia Biotech
- ◆ Coluna Bio-Spin 6: BioRad
- ◆ Coluna de *FPLC*, Superose 12 (10 x 300 mm) e Superdex 75 (10 x 300 mm): Amersham Biosciences
- ◆ Cartucho de troca catiônica (IC-Ag): Alltech Associates
- ◆ Cartucho de troca aniônica (QMA light Sep Pak): Waters Corporation
- ◆ Suportes cromatográficos: ITLC-SG fibra de vidro (Gelman), TLC-Al sílica gel 60 (Merck) e Papel Whatman 3MM (Whatman)
- ◆ Suporte universal e vidrarias

- ◆ Filtros 0,22 μm : Millipore
- ◆ Agulhas e seringas: BD (Becton Dickinson)
- ◆ Papel indicador de pH (0 – 14): EMD / Merck
- ◆ Pipetas automáticas de 50 – 100 μL e 1 mL: Gilson
- ◆ Cabine de fluxo laminar

4.3 Preparo das soluções

4.3.1 Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4

Para preparo da solução (A) pesou-se 5,516 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e dissolveu-se em 200 mL de água (H_2O) bidestilada; para a solução (B) pesou-se 14,19 g de Na_2HPO_4 e dissolveu-se em 500 mL de H_2O bidestilada. Foram misturados 95 mL da solução (A), 405 mL da solução (B) e 9 g de NaCl para preparo de um litro de solução de tampão. O pH foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH (2 mol.L⁻¹).

4.3.2 Tampão Fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0

Pesou-se 6,1 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 8,7 g de Na_2HPO_4 para preparo de um litro de solução de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0. Para ajuste do pH foi usado NaOH (2 mol.L⁻¹).

4.3.3 Solução de cisteína

Para a construção da curva padrão de cisteína, que foi usada no teste de Ellman, preparou-se uma solução mãe de cisteína de 1,0 mmol.L⁻¹, pesando 88 mg de cisteína para 500 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0. As diluições feitas foram: 0,75, 0,5 e 0,25 mmol.L⁻¹.

4.3.4 Reagente de Ellman

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

4.4 Geradores de ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re

Os geradores de ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re produzidos pela Polatom foram adquiridos pelo IPEN e enviados para o Brasil em meados de 2006, fim de 2007 e meados de 2009. Os 3 geradores enviados possuíam uma atividade entre 11,1 e 16 GBq (~ 300 – 432,4 mCi).

O gerador de ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re produzido pela ITG foi adquirido pelo PSI em novembro de 2008 com uma atividade de aproximadamente 10,5 GBq (~ 284 mCi).

Os devidos controles radioquímicos usando papel Whatman 3MM e NaCl 0,9% (para determinação da porcentagem de ¹⁸⁸Re na forma de perrenato de sódio) e radionuclídicos por meio de espectroscopia γ utilizando o detetor de Ge hiperpuro (para determinação de contaminantes na solução eluída, por ex: ¹⁸⁸W) foram realizados antes do uso dos geradores da Polatom para assegurar a qualidade do eluído, mesmo que essa qualidade seja certificada pelo fabricante.

De acordo com as especificações da Polatom, o gerador de ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re consiste basicamente de:

- ◆ Coluna de gerador preenchida com alumina, na qual o ¹⁸⁸W é adsorvido;
- ◆ Agulhas de aço inoxidável, as quais conectam a coluna do gerador com o frasco com a solução eluente e os frascos para eluição;
- ◆ A coluna e as agulhas estão localizadas dentro de uma blindagem de chumbo de 50 mm de espessura;
- ◆ Membrana filtrante assegurando esterilidade do eluato;
- ◆ 2 frascos contendo agente bacteriostático (solução de 0,2% de brometo de lauril-dimetil-benzilamônio);

- ◆ Controlador de volume de eluição. Essa construção permite a obtenção do volume de eluição requerido (mudando o volume do eluente de 4 a 8 mL). A precisão do controlador de volume está dentro de $\pm 0,5$ mL). Isto ajuda a obtenção da concentração radioativa desejada do ^{188}Re em solução.

A eluição de todos os geradores foi realizada usando NaCl 0,9% e os eluatos foram coletados com frascos à vácuo. O volume de eluição foi variado entre 6 e 8 mL dependendo da concentração radioativa necessária. No período entre o fim da vida útil de um gerador e a aquisição de um novo gerador, volumes menores de eluição foram utilizados, geralmente 4 mL, e se fez necessário o uso de sistema de concentração para continuidade dos experimentos.

4.5 Sistema de concentração

O sistema de concentração é essencial para aumentar consideravelmente a vida útil do gerador, a partir do momento que as eluições apresentarem pequenas atividades em grandes volumes, impossibilitando as marcações dos agentes terapêuticos.

Para prolongar o uso do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ e dar continuidade nos experimentos de marcação, o uso do sistema de concentração se fez necessário até a aquisição de um gerador novo.

As reações de troca iônica são as responsáveis pela concentração da atividade em um pequeno volume do solvente. Essa concentração foi feita por meio de dois cartuchos, um de troca catiônica à base de prata (IC-Ag) e um de troca aniônica (QMA Light).

Na coluna de troca catiônica, com a capacidade de 2-4 mEq em cloretos, ocorre a saturação química (todos os íons cloreto do eluato são retirados), dada pela passagem do eluato do gerador (com solução NaCl 0,9%), formando um precipitado insolúvel com a prata (AgCl), deixando passar o perrenato de sódio para a segunda coluna, a QMA de troca aniônica, que é capaz de reter toda a atividade do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$. O $^{188}\text{ReO}_4^-$ é posteriormente eluído com NaCl 0,9% em volumes apropriados entre 1 – 3 mL.

O esquema do sistema de concentração está exemplificado na FIG. 9. Antes do início do procedimento de concentração, os cartuchos foram

condicionados da seguinte forma: na coluna de QMA foram passados 20 mL de água deionizada enquanto que na coluna IC-Ag foram passados 10 mL também de água deionizada. O ^{188}Re foi eluído do gerador num volume de 4 mL. Este foi o volume passado pelo sistema de concentração, coletando-se no final um volume de ^{188}Re concentrado de aproximadamente 2 mL que foi usado para alguns experimentos de marcação. O fator de concentração foi de aproximadamente 2.

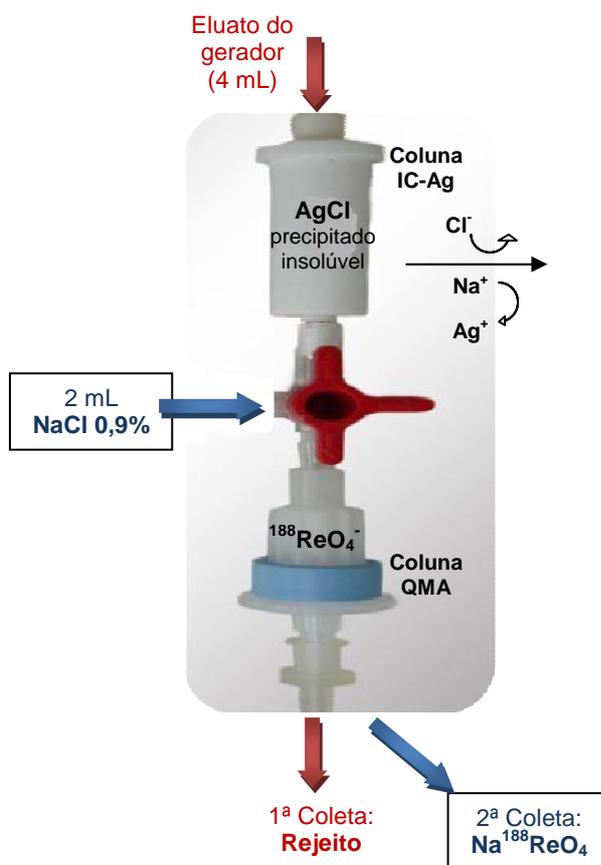


FIGURA 9. Esquema do sistema de concentração utilizado.

4.6 Redução do anticorpo

O anticorpo Rituximab (RTX) (5 e 10 mg) foi reduzido por reação com 5 e 10 μL de 2-mercaptoetanol (2-ME) a temperatura ambiente por 30 min para gerar grupos sulfidrilas livres. A solução resultante foi passada por uma coluna de exclusão molecular PD-10 (preenchida com Sephadex G-25 M) usando tampão fosfato salina (PBS) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, como fase móvel e frações de 1 mL foram

coletadas (10 frações). A concentração do anticorpo reduzido foi determinada por densidade ótica a 280 nm em um espectrofotômetro UV/VIS e as amostras foram diluídas usando-se PBS numa proporção de 1:10 (anticorpo:PBS). O cálculo para determinar a concentração de anticorpo reduzido foi feito usando-se a equação 1:

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

Nesta equação o $\epsilon_{280} = 1,4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, representa o coeficiente de extinção molar de IgG a 1 mg/mL e A_{280} representa a absorbância da amostra lida em espectrofotômetro a 280 nm.

4.6.1 Construção da curva de calibração do RTX

A construção da curva de calibração do RTX foi realizada com as seguintes concentrações de anticorpo: 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL. De 20 a 100 μL de anticorpo nativo foram diluídos com PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,4), obtendo-se volume final de 1 mL com as concentrações de anticorpo mencionadas acima. Para obtenção da curva de calibração, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro UV/VIS, com um comprimento de onda de 280 nm.

4.7 Determinação dos grupos sulfidrilas livres (-SH)

O método mais usado para determinação dos grupos -SH é o método de Ellman, no qual 5,5'-ditio-2 nitrobenzoato (DTNB) é usado para reagir com os grupos -SH para produzir uma substância amarela com uma absorbância máxima de 412 nm. Este método é simples, rápido e direto. Para tanto seguiu-se o seguinte procedimento: a 50 μL da amostra do anticorpo reduzido foi adicionado 50 μL de reagente de Ellman (0,3 mg/mL) e diluído a 1 mL com tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 min e a absorbância medida em um espectrofotômetro UV/VIS em 407 nm. O número de tióis livres foi determinado por comparação com uma curva padrão de cisteína. O resultado foi expresso como grupos sulfidrilas (-SH) por molécula de anticorpo.

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

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

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

Segundo o protocolo da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) (2001), a faixa esperada do nº de grupos -SH por molécula de anticorpo está entre 4 a 6 grupos. Na literatura o nº encontrado por alguns pesquisadores varia de 3 a 10 grupos –SH por molécula de anticorpo.

4.7.1 Construção da curva padrão de cisteína

A construção da curva padrão de cisteína foi realizada com as seguintes concentrações milimolares: 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0. Amostras de 50 µL de cada solução de cisteína foram incubadas com 50 µL de solução de reagente de Ellman e 0,9 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0 por 5 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS, com um comprimento de onda de 407 nm. Como solução de referência usou-se 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0.

4.8 Cultura celular

Duas linhagens de células de linfoma Burkitt humano foram usadas neste trabalho: células Raji e Ramos. As células foram cultivadas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal 10%, glutamina-L 2 mmol.L⁻¹, penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e fungicida 0,25 µg/mL em ar umidificado com CO₂ 5%. As células cultivadas foram lavadas com meio RPMI 1640 frio e resuspensas em PBS 0,1 mol.L⁻¹ /BSA 0,5% frio (pH 7,4) para a concentração final desejada para os ensaios. A concentração das células foi medida usando uma câmara Neubauer e um microscópio.

4.9 Método de marcação direta: $^{188}\text{Re(V)}$

Inicialmente, os estudos de marcação direta foram realizados com a formulação proposta por Oliver e colaboradores¹: 1 mg de RTX_{red}; 82,8 mg de tartarato de sódio; 1,67 mg de cloreto estano (SnCl₂.2H₂O) e 0,25 mg de ácido gentísico (Oliver et al., 2005). Perrenato (Na¹⁸⁸ReO₄) eluído de um gerador de ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re em cloreto de sódio 0,9% (NaCl 0,9%) foi adicionado (642,5 MBq / 17,4 mCi) a essa solução que foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente.

4.9.1 Parâmetros da marcação direta

A otimização da marcação foi realizada pela variação dos seguintes parâmetros: massa do anticorpo RTX_{red} (0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 mg), massa do agente redutor (SnCl₂.2H₂O) (0,25; 0,5; 1,0; 1,67; 3,0; 5,0 e 7,0 mg), massa de tartarato (20,7; 41,4; 82,8; 165,6 e 331,2 mg) e tempo de reação (15; 30; 60 e 120 min). Para a formulação otimizada foi estudada a estabilidade em diferentes tempos (4, 6 e 24 h) e temperaturas (temperatura ambiente, geladeira e gelo seco) como também a influência do pH.

4.9.2 Análise radioquímica do $^{188}\text{Re(V)}\text{-RTX}_{\text{red}}$

A qualidade final do produto, $^{188}\text{Re(V)}\text{-RTX}_{\text{red}}$, foi avaliada com técnicas radioquímicas, nas quais o rendimento da radiomarkação foi estimado com os seguintes estudos cromatográficos: Cromatografia de papel (CP); Cromatografia de camada delgada (CCD) e Cromatografia de filtração em gel (CGF). No Anexo é apresentada a teoria sobre a técnica de cromatografia.

4.9.2.1 Cromatografia de papel (CP) e camada delgada (CCD)

A cromatografia de camada delgada (CCD) em fitas de vidro revestidas de sílica gel (ITLC-SG: *Instant Thin Layer Chromatography*) foi utilizada para separar o anticorpo radiomarcado das possíveis impurezas geradas no processo.

¹ Oliver e colaboradores realizaram a marcação usando 1,67 mg de fluoreto estano (SnF₂) enquanto que neste trabalho foi usado 1,67 mg de cloreto estano (SnCl₂.2H₂O) (Oliver et al., 2005).

Devido a interrupção do fornecimento das fitas de ITLC-SG fibra de vidro pelo fabricante PALL, a avaliação de outras fases estacionárias foi feita caso fosse necessário a substituição destas fitas na continuidade do trabalho. Com esse propósito, estudou-se também a cromatografia de papel (CP) em papel Whatman 3MM e a cromatografia de camada delgada (CCD) em fitas de alumínio revestidas de sílica gel (TLC-SG/Al: *thin layer chromatography silica gel / aluminium sheets*). A TAB. 7 relaciona o suporte (fase estacionária) com a respectiva fase móvel que foram utilizadas.

TABELA 7. Relação da fase estacionária com a fase móvel adotadas nos sistemas cromatográficos CP e CCD.

FASE ESTACIONÁRIA	FASE MÓVEL
ITLC-SG fibra de vidro	NaCl 0,9% Metiletilcetona (MEC)
ITLC-SG fibra de vidro/albumina 5%	Etanol:amônia:água
Whatman 3 MM	NaCl 0,9% MEC
TLC-SG alumínio	NaCl 0,9% MEC

A mistura de solvente etanol:amônia:água (EtOH:NH₄OH:H₂O) foi preparada numa proporção de 2:1:5 (v:v:v). A fita de ITLC-SG fibra de vidro usada com esta fase móvel teve um preparo especial, sendo embebida em uma solução de SAH a 5%, seca ao ar livre e então estocada em geladeira, por até dois dias no máximo, para utilização na cromatografia.

Após o tempo de reação estipulado para a marcação, uma alíquota da solução de ¹⁸⁸Re(V)-RTX_{red} foi aplicada nos suportes (fitas de 1,5 x 12 cm) a um centímetro e meio da margem inferior. O suporte foi colocado em uma cuba de vidro, com a fase móvel correspondente, que por capilaridade desenvolve pelo suporte até 12 cm do ponto de aplicação. Ao final, as fitas foram secas em estufa a 60°C e cortadas em 10 segmentos. A FIG. 10 mostra uma representação esquemática das etapas do desenvolvimento da cromatografia. Para determinação da pureza radioquímica, os 10 segmentos das fitas foram colocados

dentro de tubos de contagem e levados ao contador gama para medida da radioatividade. Todas as fitas foram feitas em duplicata.

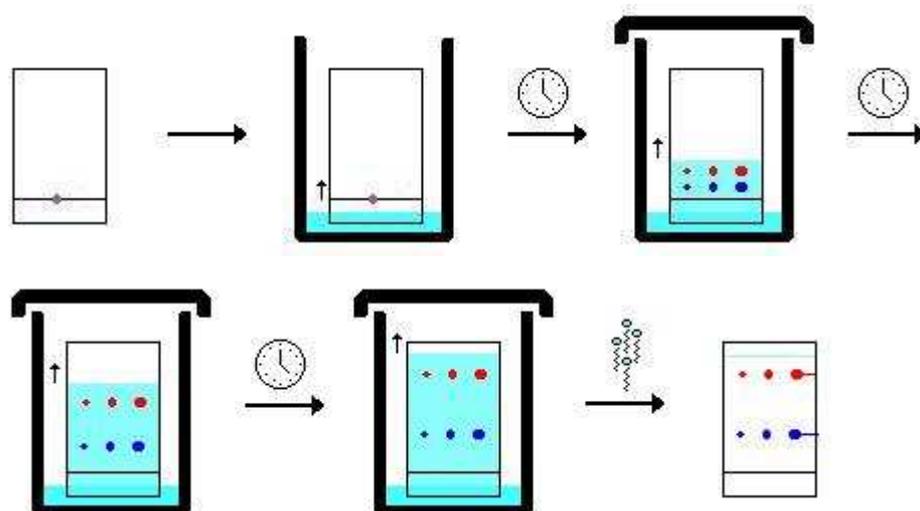


FIGURA 10. Representação esquemática do desenvolvimento da cromatografia (Site 7).

Com este sistema cromatográfico as espécies de interesse pesquisadas foram: ^{188}Re reduzido hidrolisado ($^{188}\text{ReO}_2$); $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$, ^{188}Re -tartarato e ^{188}Re livre ($^{188}\text{ReO}_4^-$). Os valores do fator de retenção (R_f), que é a relação entre o quanto a espécie química migrou em relação à corrida do solvente, das possíveis espécies químicas presentes após a marcação para cada fase móvel usada estão listados na TAB. 8.

TABELA 8. Determinação dos R_f dos produtos para cada fase móvel usada.

ESPÉCIE	R_f		
	NaCl 0,9% ^a	MEC ^a	EtOH:NH ₄ OH:H ₂ O ^b
$^{188}\text{ReO}_2$	0,0	0,0	0,0
$^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$	0,0	0,0	1,0
^{188}Re -tartarato	1,0	0,0	1,0
$^{188}\text{ReO}_4^-$	1,0	1,0	1,0

^aFita ITLC-SG fibra de vidro, TLC-SG (Al) e papel Whatman 3 MM.

^bFita ITLC-SG fibra de vidro embebida em albumina 5%.

4.9.2.2 Cromatografia de filtração em gel (CGF)

A expressão *filtração em gel*, ou *exclusão molecular*, é utilizada para descrever a separação de moléculas de diversos tamanhos através de grânulos constituídos por compostos orgânicos poliméricos com a capacidade de estabelecer uma rede tridimensional de poros que lhes confere propriedade de crivo molecular (Marques, 2001).

O princípio desta técnica baseia-se no fato de que moléculas com diferentes tamanhos demoram tempos diferentes a atravessarem uma coluna constituída por grânulos de gel em equilíbrio com uma fase móvel. Moléculas grandes, que são excluídas dos poros, passam por fora dos grânulos do gel e são as primeiras a serem eluídas, enquanto que moléculas menores, que podem penetrar nos poros dos grânulos, passam mais devagar, sendo assim retardada a sua eluição. As moléculas de uma amostra são portanto eluídas segundo uma ordem decrescente do seu tamanho molecular (Marques, 2001).

Uma outra aplicação da filtração em gel, e tirando partido da exclusão molecular dos géis, é a dessalinização de amostras, nomeadamente de extratos protéicos. Pode também ser aplicada para trocas de tampão dos extratos ou soluções protéicas. As moléculas de elevado peso molecular (M_r) são eluídas com o volume morto da coluna enquanto moléculas de baixo M_r são distribuídas entre a fase estacionária, sendo eluídas num volume mais elevado. Na dessalinização de amostras protéicas, a porosidade do gel é escolhida de modo a excluir as proteínas sendo eluídas com o volume nulo da coluna, sendo assim separadas de moléculas pequenas como sais (Marques, 2001).

4.9.2.2.1 Cromatografia de Filtração em Gel (CGF) em coluna PD-10

As colunas comerciais PD-10 contém como enchimento o SephadexTM G-25 médio, um polímero de dextrano, e são especialmente preparadas para dessalinização e/ou troca de tampão de amostras. O Sephadex (nome comercial) é um gel polimérico de dextrano, com ligações cruzadas de pontes de hidrogênio entre as cadeias, criando uma estrutura porosa. Este tipo de coluna apresenta uma altura de 5 cm e tem um volume de gel de 9,1 mL (Marques, 2001).

A coluna foi equilibrada com 25 mL de tampão PBS 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4. As amostras (1 mL) foram colocadas no topo do gel. A eluição do gel foi feita com PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,4) e o volume das frações coletadas foi de 1 mL. O número de frações coletadas variou de 20 a 40 frações, dependendo da amostra aplicada. Em todos os experimentos, a radioatividade da coluna foi contada em um calibrador de dose logo após a aplicação da amostra (atividade inicial) e ao final da eluição (atividade residual). As frações coletadas também foram analisadas pela contagem da radioatividade com o calibrador de dose.

As amostras analisadas por CGF em coluna PD-10 foram preparadas de acordo com os procedimentos listados abaixo:

(1) ¹⁸⁸Re(V)-RTX_{red}: A marcação foi realizada com 1 mg RTX_{red}; 82,8 mg tartarato; 1 mg SnCl₂.2H₂O; 0,25 mg ácido gentísico e 1 mL ¹⁸⁸ReO₄⁻. Após o tempo de reação de 1 h em TA, 0,5 mL dessa solução foi diluído para 1 mL com PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,4) e então feito o controle em coluna PD-10. O volume restante da solução de marcação foi incubado em estufa a 37 °C e após 1 e 4 h feito o controle em PD-10 (20 frações foram coletadas).

(2) ¹⁸⁸Re(V)-RTX_{red}: A marcação foi realizada com 0,25 mg RTX_{red}; 82,8 mg tartarato; 1 mg SnCl₂.2H₂O; 0,25 mg ácido gentísico e 1 mL ¹⁸⁸ReO₄⁻. Após o tempo de reação de 1 h em TA, 0,5 mL dessa solução foi diluído para 1 mL com PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,4) e então feito o controle em coluna PD-10. O volume restante da solução de marcação foi dividido em 2 alíquotas de 0,5 mL, sendo uma alíquota incubada em estufa a 37 °C e após 1 h feito o controle em PD-10 e a outra alíquota mantida em gelo seco e após 6 h feito o controle em PD-10 (20 frações foram coletadas).

(3) ¹⁸⁸ReO₄⁻ + SnCl₂.2H₂O: 13 mg de SnCl₂.2H₂O foi dissolvido com 1 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹ e nitrogenado por 10 min. Em seguida, essa solução foi adicionada à 1 mL de ¹⁸⁸ReO₄⁻ eluído do gerador. Após o tempo de reação de 10 min, para redução do perrenato de sódio, foi feito controle em PD-10 (40 frações foram coletadas).

(4) ¹⁸⁸ReO₄⁻: 0,5 mL de ¹⁸⁸ReO₄⁻, eluído do gerador, foi diluído para 1 mL com PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,4) e feito o controle em PD-10 (40 frações foram coletadas).

O objetivo dos experimentos (1) e (2) foi comprovar a melhor massa de RTX_{red} no processo de marcação e a estabilidade da radiomarcagem em relação ao tempo e temperatura. Os experimentos (3) e (4) consistiram na determinação do perfil de eluição do ¹⁸⁸Re coloidal (¹⁸⁸Re reduzido – experimento 3) e do perrenato livre (experimento 4).

4.9.3 Desafio a cisteína: ¹⁸⁸Re(V)-RTX_{red}

Para o desafio a cisteína, alíquotas de 50 µL de ¹⁸⁸Re(V)-RTX_{red} foram adicionadas a 50 µL de uma solução de cisteína (10 mg/mL – 80 mmol.L⁻¹) em PBS 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4. As soluções foram incubadas a 37°C em uma estufa e após 1, 4 e 24 h alíquotas foram removidas e analisadas por cromatografia de papel usando Whatman 3MM como fase estacionária e NaCl 0,9% como fase móvel. Por meio desse sistema consegue-se mensurar a porcentagem de ¹⁸⁸Re ligado à cisteína e a porcentagem de ¹⁸⁸Re ligado ao anticorpo, sendo que para ¹⁸⁸Re-cisteína o R_f é na faixa de 0,67 – 0,83 e para o ¹⁸⁸Re-anticorpo o R_f é 0,0, como descrito por Iznaga-Escobar (2001).

4.9.4 Estudos *in vivo*: ¹⁸⁸Re(V)-RTX_{red}

Todos os estudos *in vivo*, em animais, realizados neste trabalho foram conduzidos de acordo com as Leis de Proteção aos Animais da Suíça, em protocolo próprio do PSI (nº próprio do PSI).

Para os estudos realizados no Brasil, o abrigo e a manutenção dos animais foi feito no IPEN de acordo com as normas do biotério local. Estudos de biodistribuição e de imagem foram realizados em camundongos nude imunodeficientes atímicos fêmeas (CD1- foxn1^{nu}).

Células Raji (2x10⁶ células / 100 µL), preparadas no INCA (RJ) foram injetadas subcutaneamente no dorso dos camundongos nude de oito semanas de idade (fêmeas). Após o aparecimento do tumor, os estudos de biodistribuição foram iniciados com a injeção intravenosa de 100 µL de ¹⁸⁸Re(V)-RTX_{red} (100 µg de RTX_{red}, 18,5 MBq/0,5 mCi) na veia caudal. Os animais foram sacrificados cortando-se a veia jugular 24, 48 e 72 h após injeção. No total foram 5 animais

para cada grupo de tempo. Amostras de sangue foram coletadas, e o tumor, órgãos normais (coração, pulmão, fígado, baço, estômago, intestino, rins e bexiga), fêmur e músculo foram dissecados, colocados em tubos pré-pesados, pesados e contados em um contador gama automático Packard Cobra II. A porcentagem de captação da atividade administrada de $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$ nos diferentes órgãos foi calculada em função da atividade administrada de acordo com as equações 4 e 5. A contagem por minuto (cpm) padrão foi determinada pela contagem de uma alíquota de 10 μL da solução injetada nos animais contendo a mesma concentração radioativa de ^{188}Re .

$$\% \text{ Atividade / órgão} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \cdot 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ Atividade / grama de tecido} = \frac{\% \text{ Atividade / órgão}}{\text{Peso do órgão}} \quad (5)$$

Para a imagem cintilográfica, um camundongo nude de cada grupo de tempo foi sacrificado (24, 48 e 72 h) e imediatamente adquirida a imagem. O estudo foi realizado usando uma gama-câmara. A imagem planar estática foi adquirida por mais de uma hora de aquisição, em uma matriz 256x256x16, usando o mesmo protocolo do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($E_{\gamma} = 140 \text{ keV}$).

4.10 Método de marcação via carbonila

O estudo de marcação do RTX via carbonila foi realizado no PSI/Suíça e por não haver relatos deste procedimento na literatura, optou-se por iniciar os experimentos com o radioisótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ que prediz o comportamento e a viabilidade desta nova rota de marcação com o radioisótopo ^{188}Re .

4.10.1 Preparação do núcleo $[\text{M}(\text{CO})_3]$ ($\text{M} = ^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$)

O núcleo carbonila foi preparado de duas maneiras distintas, de acordo com o radioisótopo usado. Para o preparo do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -carbonila $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ foi usado um kit, desenvolvido e produzido pelos pesquisadores do Departamento de Radiofarmácia do PSI, com a seguinte composição:

- ◆ 4,5 mg de boranocarbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{BH}_3\text{CO}_2$);
- ◆ 2,9 mg de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$),
- ◆ 7,8 mg de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e
- ◆ 9,0 mg de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

O pertecnetato [$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$] em salina (1 mL) foi eluído de um gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e adicionado a um kit de carbonila descrito acima. A mistura foi aquecida a 150°C por 40 s em um forno de microondas. Após resfriamento, o pH da solução resultante de $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ foi ajustado com uma mistura de tampão fosfato 0,6 mol.L⁻¹:HCl 1 mol.L⁻¹ (3:2) para um pH 6,5 para uso na marcação.

O preparo do ^{188}Re -carbonila [$^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$] consistiu da mistura de 50 µL de HCl 4 mol.L⁻¹, 250 µL de ácido 4-morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0,5 mol.L⁻¹, 5 mg de ácido ascórbico e 1 mL de perrenato [$^{188}\text{ReO}_4^-$] em salina, eluído de um gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. Essa solução foi purgada com gás argônio por 15 min e então adicionada à um outro frasco contendo 7,5 mg de borano de amônia (BH_3NH_3) (previamente purgado com monóxido de carbono por 20 min). Este frasco com a solução resultante foi aquecido por 1 h a 75 – 80°C em um forno convencional. Após o resfriamento, a solução de $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ foi usada para marcação, sem ajuste de pH.

4.10.2 Método de marcação: núcleo [$\text{M}(\text{CO})_3$] ($\text{M} = ^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$)

Como não há relatos do comportamento do anticorpo RTX marcado com o núcleo carbonila, dois procedimentos de radiomarcagem foram utilizados: (1) primeiramente RTX nativo (RTX_{nat}) marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ e (2) posteriormente RTX reduzido (RTX_{red}) marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$. Para RTX_{nat} , os parâmetros analisados foram o volume do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ (50 e 100 µL) e a massa de RTX_{nat} (100 e 250 µg). Para o RTX_{red} , os parâmetros analisados para marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foram o volume de $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ (10, 20, 30, 40, 50 e 100 µL), a massa de RTX_{red} (100, 250 and 500 µg) e o tempo de incubação (de 30 min a 24 h após adição de $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$). No caso da marcação com ^{188}Re os parâmetros analisados incluíram a massa de RTX_{red} (100, 250 e 500 µg) e o tempo de incubação (de 1 a 24 h após adição do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$). Todas as soluções foram

incubadas a 37°C em um *termomixer*. Para o ^{188}Re , a etapa de marcação foi feita sob gás argônio e o RTX_{red} radiomarcado [$^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$] foi purificado em coluna de exclusão molecular do tipo Bio-Spin 6 após centrifugação a 1300 rpm, durante 3 min.

4.10.3 Análise do $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{nat/red}}$

Cromatografia líquida rápida de proteína (*Fast-protein liquid chromatography - FPLC*) foi usada para avaliar o rendimento de marcação do $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{nat/red}}$. Para isso usaram-se duas colunas de gel filtração: Superdex 75 (10 x 300 mm - separação de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas de acordo com o tamanho, ideal para faixa molecular de 3 a 70 kDa) e Superose 12 (10 x 300 mm - separação de proteínas e outras biomoléculas de acordo com o tamanho, ideal para faixa molecular de 1 a 300 kDa). O tampão usado foi PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,4) contendo Tween 20 0,1% e azida sódica (NaN_3) 0,02% como fase móvel. O fluxo foi 1,0 mL/min, o tempo de corrida foi 35 min e o volume de injeção foi 50 µL. Um monitor radioativo HPLC Berthold CB506 C-1 foi usado para medida da radioatividade do efluente. A coluna Superose 12 foi usada especificamente para a análise da estabilidade em plasma humano, ao passo que as marcações no geral e os desafios (histidina/cisteína) foram analisados tanto na Superdex 75 quanto na Superose 12.

4.10.4 Desafio a histidina e cisteína: $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$

Para o desafio a histidina e cisteína, alíquotas de 50 µL de $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foram adicionadas a 50 µL de uma solução de histidina (10 mg/mL – 60 mmol.L⁻¹) e cisteína (10 mg/mL – 80 mmol.L⁻¹) em PBS 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4. As soluções foram incubadas a 37°C em um *termomixer* e após 1, 4 e 24h alíquotas foram removidas e analisadas por *FPLC* usando os parâmetros previamente descritos.

4.10.5 Estabilidade *in vitro* do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ no plasma humano

Para investigar a estabilidade do anticorpo radiomarcado no soro humano, 50 μL de solução de $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi adicionado a 100 μL de plasma humano e incubado a 37°C em um *termomixer*. Alíquotas foram removidas após 30 min, 1, 4, 6 e 24 h e analisadas por *FPLC* usando os parâmetros previamente descritos.

4.10.6 Imunorreatividade: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$

Dado que a principal característica dos anticorpos é sua capacidade de unir-se de forma extremamente seletiva a outra molécula, ex. um antígeno, é importante determinar se o anticorpo uma vez radiomarcado conserva suas propriedades imunorreativas. Esta medida pode ser realizada por métodos quantitativos ou qualitativos de imunoenálises (Dias, 2005).

A determinação da fração imunorreativa, que é a porcentagem do anticorpo radiomarcado que mantém a sua especificidade original de ligação ao antígeno, foi determinada utilizando o teste de Lindmo (Lindmo et al., 1984).

Rituximab radiomarcado (5 ng/mL) foi adicionado à uma série de seis diluições de células Raji/Ramos entre 10×10^6 e $7,812 \times 10^4$ células em PBS 0,1 mol.L⁻¹/BSA 0,5%, pH 7,4. A ligação não-específica foi determinada pela saturação dos sítios de ligação pela adição de rituximab não-marcado numa concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ para uma duplicata de diluição celular. Os tubos foram brevemente vortexados e incubados por 2 h a 37°C com rotação contínua em uma incubadora *termoshaker*. Após incubação, os tubos foram centrifugados por 5 min a 2.000 g. O sobrenadante foi aspirado e as células lavadas 2 vezes com PBS 0,1 mol.L⁻¹/BSA 0,5%, pH 7,4. Os tubos foram novamente centrifugados por 5 min a 2.000 g, o sobrenadante foi removido e a radioatividade dos *pellets* foi contada em um contador gama automático Packard Cobra II. Os dados foram analisados pelo total de radioatividade aplicada sobre a ligação específica como uma função do inverso da concentração das células. A fração imunorreativa foi determinada por meio da extrapolação linear para a concentração infinita de células.

4.10.7 Afinidade de ligação: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$

Estudos de ligação ao receptor são usados para determinar a afinidade de várias drogas para um receptor bem como a densidade dos sítios de ligação ($B_{\text{máx}}$) das famílias dos receptores e seus subtipos em diferentes amostras ou tecidos. Existem dois tipos básicos de experimentos de ligação ao receptor: saturação e competição. Experimentos de saturação são usados para determinar a afinidade de um ligante radioativo para um receptor e a densidade dos sítios de ligação do receptor em amostras ou tecidos específicos. Estudos de competição são usados para medir a afinidade de um ligante não-marcado para um receptor (Deupree & Bylund, 2002; Kenakin, 2006).

A base do estudo de ligação ao receptor é a ligação do ligante (L) ao receptor (R) para formar um complexo ligante-receptor (LR). O complexo LR é classicamente referido como “Ligado” (“*Bound*”), significando a quantidade de ligante que está “ligado” ao receptor. O ligante não “ligado” é referenciado como livre (“*Free*”), significando a quantidade de ligante que está “livre” e disponível para interagir com o receptor. O parâmetro medido é a quantidade de ligante radioativo que está “ligado” ao receptor. Isto requer a separação do ligante “livre” do ligante “ligado” após a reação ter alcançado condições de estado de equilíbrio (Deupree & Bylund, 2002; Kenakin, 2006).

A determinação da ligação ao receptor do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi realizada pelo experimento de saturação calculando-se dois parâmetros essenciais: a *constante de dissociação* (K_d), que é a concentração do ligante radioativo necessária para ocupar 50% dos receptores e a *densidade dos sítios de ligação* ($B_{\text{máx}}$), que é a medida da densidade dos receptores em um tecido e é equivalente ao ligante “ligado” quando todos os receptores estão ocupados pelo ligante radioativo (Deupree & Bylund, 2002; Kenakin, 2006).

Os estudos de afinidade de ligação foram realizados com $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ usando células Raji e Ramos. As células foram resuspensas a uma concentração final de 10^6 células/mL. Foram preparadas sete soluções teste (em triplicata) contendo RTX_{red} radiomarcado (quantidades decrescentes) e 0,5 mL de células. Rituximab não-marcado foi adicionado a uma concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para saturar os sítios de ligação para

determinação subsequente da ligação não-específica. As amostras foram incubadas a 37°C com rotação contínua por 2 h. Ao final, o sobrenadante foi removido por centrifugação e as células foram lavadas com PBS. A radioatividade do *pellet* resultante foi contada em um contador gama automático Packard Cobra II. A constante de dissociação (K_d) e a capacidade máxima de ligação ($B_{máx}$) foram calculadas analisando-se os dados com o software GraphPad Prism.

4.10.8 Estudos *in vivo*: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$

Para os estudos realizados na Suíça, o abrigo e a manutenção dos animais foi feito de acordo com as leis local de proteção aos animais. Estudos de biodistribuição e de imagem foram realizados em camundongos nude imunodeficientes atímicos fêmeas (CD1- foxn1^{nu}).

Células Ramos (5×10^7 células/100 μL) foram injetadas subcutaneamente em ambos os flancos no dorso de camundongos nude de cinco semanas de idade (fêmeas). Para os estudos de biodistribuição os camundongos foram divididos em 2 grupos. Um grupo foi injetado intravenosamente na veia caudal com 100 μL de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (100 μg de RTX_{red} , 30 MBq/0,8 mCi) enquanto que o segundo grupo foi injetado com 100 μL de $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (100 μg de RTX_{red} , 6 MBq/0,16 mCi). Os animais do grupo do ^{99m}Tc foram sacrificados por deslocamento cervical 4, 24 e 48 h após injeção (4 animais por tempo). Para o grupo do ^{188}Re foram usados os tempos de 4 h (3 animais), 24 h (6 animais), 48 e 72 h (4 animais cada) após injeção. Amostras de sangue e urina foram coletadas, e os tumores, órgãos normais (coração, pulmão, fígado, baço, estômago, intestino e rins), osso e músculo foram dissecados, colocados em tubos pré-pesados, pesados e contados em um contador gama automático Packard Cobra II. A porcentagem de captação da atividade administrada de $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ nos diferentes órgãos foi calculada em função da atividade administrada de acordo com as equações 4 e 5 descritas no item 4.9.4. A contagem por minuto (cpm) padrão foi determinada pela contagem de uma alíquota de 10 μL da solução injetada nos animais contendo a mesma concentração radioativa de ^{99m}Tc ou ^{188}Re .

Para imagem SPECT apenas um camundongo nude, inoculado com células Ramos para induzir o tumor, foi injetado com 200 μL de $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (250 μg de RTX_{red} , 80 MBq/2,2 mCi). O estudo foi realizado usando um pequeno dispositivo para animal de SPECT/CT combinado, com uma câmara SPECT de cabeça única e um detetor CT. O animal foi sacrificado 24 h após injeção do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e imediatamente adquirida a imagem. Os dados SPECT foram adquiridos por 30 min e reconstruídos usando o software LumaGEM (versão 5.407 lum 10). As imagens foram geradas usando o software Amira (versão 4.0).

4.10.9 Autoradiografia *ex vivo*

Para o estudo de autoradiografia *ex vivo*, um camundongo do tipo CD1-foxn1^{nu}, inoculado com células Ramos para induzir o tumor, foi injetado com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (8 MBq/0,2 mCi) e sacrificado 24h após injeção. Imediatamente após a eutanásia, o tumor (de células Ramos) foi coletado e congelado, embebido em TissueTek, e estocado a -80°C . O tecido congelado foi cortado em seções de 10 μm com um micrótomo e as seções montadas sobre os slides. Os slides foram expostos a um leitor de fósforo em um cassete de raios-X durante a noite. Os cassetes foram lidos pelo imageador de fósforo para revelar a distribuição da radioatividade nas seções.

4.10.10 Autoradiografia *in vitro*

Autoradiografia *in vitro* do tecido tumoral foi realizada sobre as seções adjacentes daquelas preparadas para autoradiografia *ex vivo* (após o decaimento radioativo), permitindo comparação entre a expressão do receptor CD20 e a distribuição da radioatividade nas seções *ex vivo*. Os slides com as seções dos tecidos foram pré-incubados em tampão Tris-HCl (170 mmol.L^{-1} , pH 7,6, com MgCl_2 5 mmol.L^{-1}) com soro albumina bovino (BSA) 0,25% (m/v) por 10 min a temperatura ambiente. Então, as seções foram incubadas com 100 μL de uma solução de $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (0,5 MBq/mL em tampão Tris-HCl contendo BSA 1%) por 60 min a temperatura ambiente. Após incubação, as seções foram rinsadas 2 vezes por 5 min em tampão Tris-HCl frio (com BSA 25%), lavadas por

5 min em tampão Tris-HCl puro, e por último rinsadas com água destilada fria. As seções com bloqueio da ligação foram realizadas adicionando-se 20 μL (\cong 94 μg) de RTX_{nat}. As seções foram secas e expostas ao leitor de fósforo durante a noite.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Redução do anticorpo Rituximab

O entendimento dos grupos funcionais disponíveis na molécula de anticorpo é a chave para a escolha do melhor método para marcação. Muitos dos métodos usam um dos três sítios disponíveis na molécula de anticorpo: aminas primárias (-NH₂), resíduos de carboidrato e grupos sulfidrilas (-SH). O sítio para marcação escolhido neste trabalho foi o grupo sulfidrilas. Os grupos sulfidrilas são formados pela redução das pontes dissulfídicas do anticorpo (Thermo Scientific Science, 2009).

As reduções do anticorpo RTX foram realizadas conforme a necessidade de uso e o procedimento adotado no Brasil foi o mesmo usado na Suíça. De 5 a 10 mg de RTX foram reduzidos por reação com o agente redutor 2-ME. A concentração protéica das 10 frações coletadas na redução foi determinada em um espectrofotômetro UV/VIS (Abs 280 nm) e como os valores obtidos, em mg, foram superiores ao valor de massa inicial reduzida, optou-se pela correção dos valores de cada fração usando a curva de calibração do RTX, obtida pelo ensaio de uma série de amostras do RTX com concentrações entre 2 e 10 mg/mL, como mostra a FIG. 11.

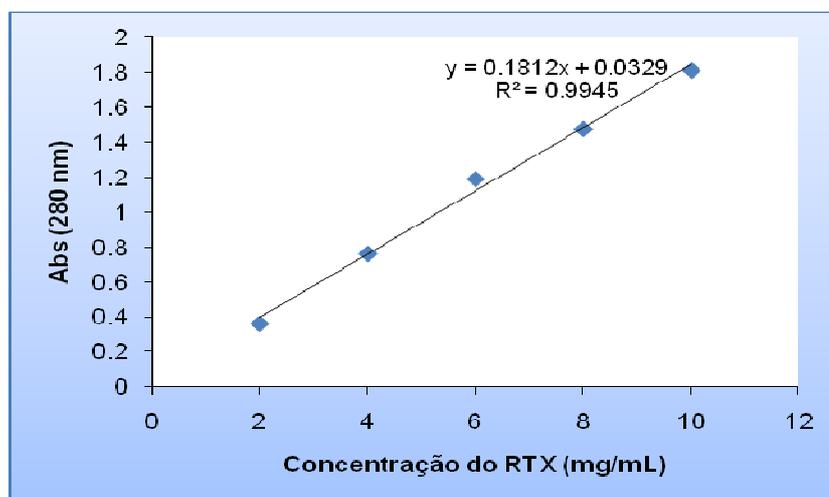


FIGURA 11. Curva de calibração obtida para o AcM quimérico RTX.

A curva de calibração do anticorpo (FIG. 11) foi obtida com uma excelente correlação linear entre os padrões de RTX e a absorbância ($r^2 = 0,9945$), mostrando a confiabilidade da mesma.

No protocolo da AIEA é citado que o anticorpo reduzido é eluído nas frações de 3 – 8 e que o “pool” do anticorpo reduzido deve ser composto apenas pelas frações que tiverem uma concentração protéica maior que 0,5 mg/mL. Usando a equação 1, descrita no item 4.6, o cálculo foi realizado para as 10 frações coletadas na redução do RTX, baseado na absorbância obtida para cada fração. Um exemplo da correlação entre a fração coletada e a concentração protéica (mg/mL) determinada para este estudo é mostrado na FIG. 12.

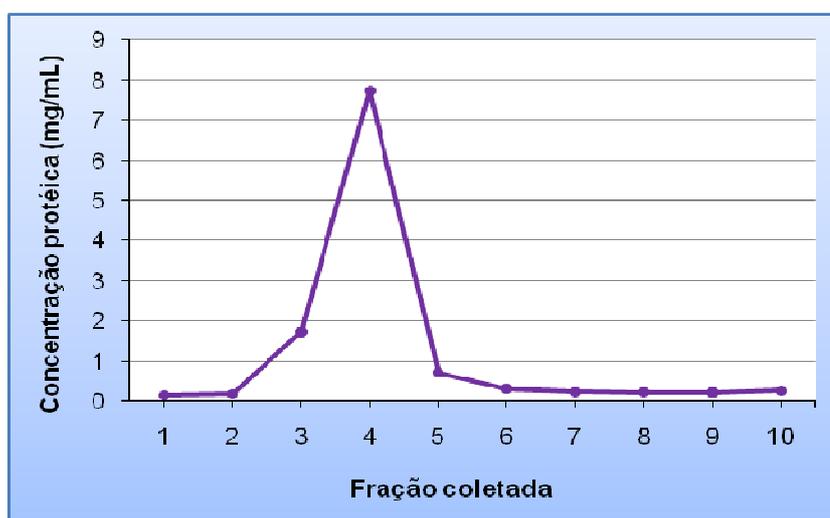


FIGURA 12. Concentração protéica (mg/mL) obtida para cada fração coletada (1 mL cada) na redução do anticorpo RTX. Este resultado representa a redução de 10 mg de RTX com o agente redutor 2-ME.

Como mencionado, o parâmetro utilizado para escolha das frações para formação do “pool” de anticorpo reduzido foi usar as frações que apresentassem uma concentração protéica maior que 0,5 mg/mL. Analisando todas as reduções realizadas durante o trabalho, percebeu-se que o anticorpo reduzido poderia ser coletado nas frações de 3 a 6. A FIG. 12 mostra um caso em que o RTX_{red} foi coletado nas frações 3, 4 e 5. Em seu trabalho, Dias (2005) analisou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as 10 frações de dois anticorpos (anti-CEA e anti-EGF/r3), reduzidos pelo mesmo método aqui apresentado, e constatou que o agente redutor 2-ME estava, muitas vezes, presente nas frações 5 e 6. Contudo, a partir da fração 7 apenas o 2-ME foi

coletado e foi mostrado também que ele absorve no mesmo comprimento de onda que o anticorpo, podendo assim mascarar o valor de concentração protéica. Esta análise foi aqui realizada e o mesmo resultado foi constatado. Com isso, para se conseguir um “pool” de anticorpo reduzido puro, sem a presença do agente redutor 2-ME (que pode sobreviver à etapa de filtração em gel), utilizaram-se apenas as frações 3 e 4 em todos os casos.

O processo de redução realizado foi eficiente, apresentando na maioria dos casos uma boa porcentagem de recuperação da proteína inicialmente reduzida, com uma recuperação média após a redução de $96 \pm 4\%$ (média \pm DP, $n = 10$).

5.2 Determinação do n° de grupos sulfidrilas (-SH)

O n° de grupos -SH foi obtido por comparação com uma curva padrão de cisteína, obtida pelo ensaio de uma série de padrões de cisteína com concentrações entre 0,25 e 1,0 mmol.L⁻¹, como mostra a FIG. 13.

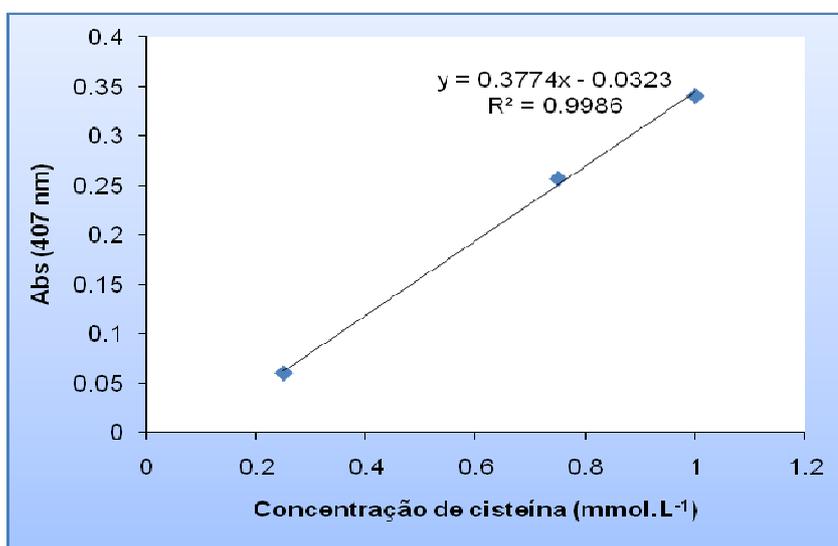


FIGURA 13. Curva padrão de cisteína construída para determinação dos grupos -SH.

Uma excelente correlação linear foi encontrada entre a concentração de cisteína e a absorbância ($r^2 = 0,9986$). Foi realizada uma varredura das amostras e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a densidade ótica de 407 nm (usada neste trabalho) e 412 nm (descrita na literatura).

Anticorpos do tipo IgG de camundongo contém de 4 a 6 pontes dissulfídricas intercadeias e 12 intracadeias oferecendo um máximo de 36 grupos -SH por molécula de anticorpo (Dias, 2005). A determinação dos grupos sulfidrilas obtidos por redução com 2-ME usando reagente de Ellman indicou a produção de $6,5 \pm 1,0$ grupos -SH por molécula de anticorpo (média \pm DP, $n = 10$), o que representa, aproximadamente, 18% do total de grupos -SH que podem ser gerados por molécula de anticorpo.

Leyva e colaboradores (Leyva et al., 2005) obtiveram de 4 a 5 grupos -SH na redução do RTX com 2-ME, enquanto que Ferro-Flores e colaboradores (Ferro-Flores et al., 2005) pelo mesmo método de redução produziram de 3 a 6 grupos -SH. Gmeiner Stopar e colaboradores usaram um método de fotoativação para a redução do anticorpo RTX e conseguiram uma média de 4,4 e 4,1 grupos -SH por molécula de anticorpo fotoreduzido (Gmeiner Stopar et al., 2006, 2008). Griffiths e colaboradores usando 2-ME para reduzir uma IgG obtiveram de 1 a 9 grupos -SH por molécula de IgG (Griffiths et al., 1991). Paik e colaboradores avaliaram grupos sulfidrilas em seu trabalho após a incubação de um anticorpo com cloreto estanoso por 30 min numa razão de 10:1 (SnCl_2 :anticorpo) e a porcentagem de redução foi de 15,3%, baseado nos 36 grupos -SH por molécula de anticorpo (Paik et al., 1985). Garron e colaboradores usaram 2-aminoetanétio (AET) por 30 minutos numa razão de 3000 a 9000:1 (AET:anticorpo) e observaram uma porcentagem de redução dos grupos -SH entre 11,9% e 22,2% e tiveram 98% de rendimento de radiomarcção com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Garron et al., 1991). Percebe-se que os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com os apresentados na literatura.

A importância dos grupos -SH da molécula de anticorpo, no caso de marcação direta com o radioisótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$, deve-se ao fato de que eles são a ligação para o íon tecnécio, sendo essenciais para a eficiência de marcação de anticorpos monoclonais. Reno & Bottino em 1987 (Reno & Bottino *apud* Eckelman & Steigman, 1991) mostraram que apenas 24% de um anticorpo não reduzido se ligou ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$, enquanto que 83% do mesmo anticorpo se ligou ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ quando reduzido com DTT (Eckelman & Steigman, 1991).

5.3 Método de marcação direta: $^{188}\text{Re(V)}$

5.3.1 Marcação direta: Variáveis e Análise radioquímica usando CP e CCD

Como mencionado na metodologia, as primeiras marcações foram realizadas com a formulação líquida proposta por Oliver e colaboradores (Oliver et al., 2005), com uma pequena modificação do agente redutor, como descrita a seguir: 1 mg de RTX_{red} ; 82,8 mg de tartarato; 1,67 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (que corresponde a 0,88 mg de íon estanho - Sn^{2+}); 0,25 mg de ácido gentísico; 1 mL de ^{188}Re (642,5 MBq / 17,4 mCi) e pH 5,5 (média \pm DP, $n = 2$). Nessas condições o rendimento de marcação obtido para esta formulação foi $67,0 \pm 0,2\%$ (média \pm DP, $n = 2$) sendo que Oliver e colaboradores conseguiram 95% de pureza radioquímica usando essa formulação mas com 1,67 mg de SnF_2 (que corresponde a 1,26 mg de Sn^{2+}) (Oliver et al., 2005). Pela diferença dos resultados, partindo dessa formulação, uma série de variações foram realizadas para encontrar a formulação otimizada para este trabalho. O primeiro teste foi a variação da massa de anticorpo como mostra a FIG. 14.

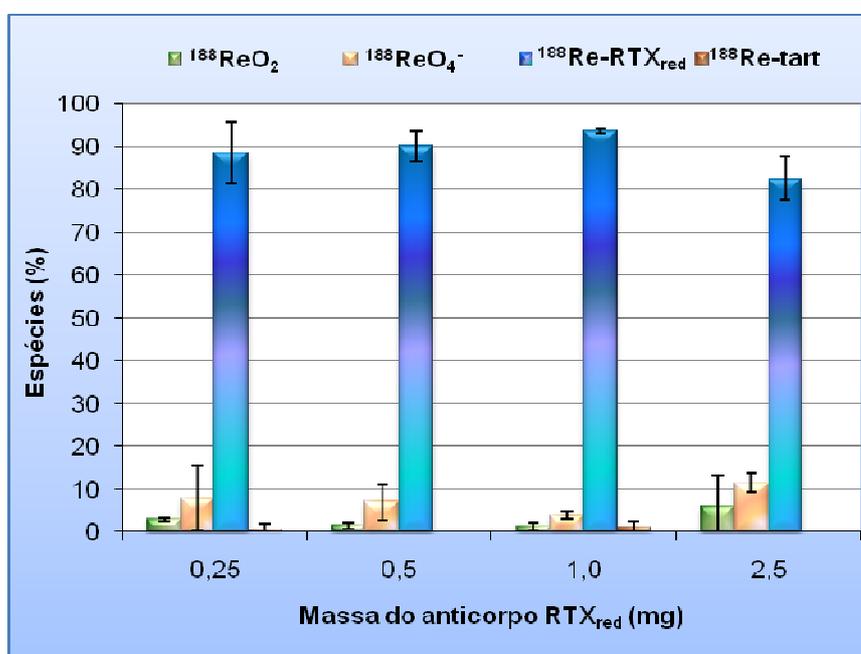


FIGURA 14. Pureza radioquímica (%) após a variação da massa do anticorpo RTX_{red} . Os parâmetros usados foram: 82,8 mg de tartarato; 1,67 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,25 mg de ácido gentísico, 1 mL de ^{188}Re (542,1 MBq / 14,7 mCi) e pH $5,8 \pm 0,6$ (média \pm DP, $n = 4$). Tempo de reação de 1 h em temperatura ambiente. Os resultados são expressos como média \pm DP: $n = 3$ para 0,25 e 1,0 mg de RTX_{red} e $n = 2$ para 0,5 e 2,5 mg.

A porcentagem de RTX_{red} marcado com $^{188}\text{Re}(\text{V})$ foi de $88 \pm 7\%$ para 0,25 mg; $90 \pm 4\%$ para 0,5 mg; $94 \pm 1\%$ para 1 mg e $83 \pm 5\%$ para 2,5 mg. O melhor resultado foi encontrado com a massa de 1 mg de anticorpo, em acordo com o trabalho de Oliver e colaboradores e Torres-García e colaboradores (Oliver et al., 2005; Torres-García et al., 2008). Para Ferro-Flores e colaboradores a massa de anticorpo otimizada para a formulação de um kit liofilizado foi 2 mg (Ferro-Flores et al., 2005). Gmeiner Stopar e colaboradores usaram 0,5 e 0,75 mg de RTX_{red} para marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Gmeiner Stopar et al., 2006 e 2008).

O íon estanho (Sn^{2+}) é o redutor mais usado para pertecnato na prática radiofarmacêutica, e portanto, é uma tentativa lógica usá-lo para redução do perrenato no preparo de radiofármacos de rênio. Duke & Peterson em 1959 notaram que sem a presença de qualquer nível de estanho, os rendimentos de marcação com ^{188}Re foram zero (Duke & Peterson *apud* Sailerova & Billinghamurst, 2003). Desde que a marcação é controlada pela redução e a redução é um resultado da adição do Sn^{2+} no sistema, é de se esperar que a eficiência de marcação poderia ser diretamente relatada à concentração de Sn^{2+} na preparação (Sailerova & Billinghamurst, 2003). Após confirmação da melhor massa de RTX_{red} , foi feita a variação da massa do agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sendo os resultados apresentados na FIG. 15. Para tanto foi usado: 1 mg de RTX_{red} ; 82,8 mg de tartarato; 0,25 mg de ácido gentísico, 1 mL de ^{188}Re (510,9 MBq / 13,8 mCi), pH $5,6 \pm 0,7$ (média \pm DP, $n = 13$) e tempo de reação de 1 h em temperatura ambiente.

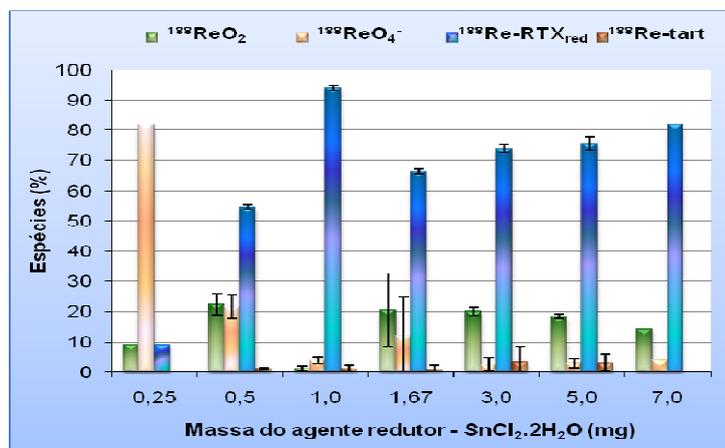


FIGURA 15. Pureza radioquímica (%) de acordo com a variação da massa do agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Os resultados são expressos como média \pm DP: $n = 1$ para 0,25 e 7,0 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $n = 3$ para 1,0 mg e $n = 2$ para as outras massas.

Para Ferro-Flores e colaboradores a formulação final do kit liofilizado foi preparada com alta concentração de cloreto estanoso anidro (2,3 mg que corresponde a 1,44 mg de Sn^{2+}) e por consequência, com uma maior massa do ligante (tartarato) para estabilizar o íon estanho e o perrenato reduzido na solução. Os autores reconstituíram o kit com 3 mL de ^{188}Re para a marcação, com uma atividade de aproximadamente $350 - 400 \text{ MBq.mL}^{-1}$ ($9,5 - 10,8 \text{ mCi.mL}^{-1}$) (Ferro-Flores et al., 2005). Torres-García e colaboradores usaram uma concentração similar do mesmo redutor, 2,4 mg de SnCl_2 (que corresponde a 1,5 mg de Sn^{2+}) e reconstituíram o kit com 3 mL de perrenato com uma atividade entre $74 - 110 \text{ MBq}$ ($2 - 3 \text{ mCi}$) (Torres-García et al., 2008). O fato dos autores usarem uma baixa atividade de ^{188}Re para marcação não justifica o uso de uma alta massa de cloreto estanoso. No kit liofilizado pode haver redução de massa de Sn^{2+} , devido a perda ocorrida no processo. Esta pode ser uma justificativa pela escolha de uma maior massa para a formulação do kit.

Oliver e colaboradores usaram 1,67 mg de SnF_2 (correspondente a 1,26 mg de Sn^{2+}) e obtiveram um bom rendimento de marcação com uma atividade de ^{188}Re de $1,5 - 1,9 \text{ GBq}$ ($40,5 - 51,3 \text{ mCi}$) (Oliver et al., 2005). Analisando a FIG. 15 verifica-se que neste trabalho o melhor rendimento de marcação foi obtido com 1 mg de $\text{SnCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$. Ao se fazer o cálculo estequiométrico, constatou-se que as massas de Sn^{2+} usadas pelos autores acima citados foram maiores do que as usadas neste trabalho. De acordo com a FIG. 15, altas concentrações de $\text{SnCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ não favoreceram a marcação, fornecendo um rendimento de marcação abaixo de 90%. Como é desejável usar uma massa mínima de agente redutor devido a sua toxicidade, a massa de 1 mg de $\text{SnCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ foi usada como padrão em todas as outras marcações.

O tartarato de sódio age como um ligante fraco na marcação com a função de estabilizar o perrenato reduzido (no estado intermediário pentavalente), que pode ser facilmente reoxidado para $^{188}\text{ReO}_4^-$ (por causa das suas propriedades de redução) como também ajuda na cinética de marcação do anticorpo através de um intercâmbio de ligantes fazendo com que os grupos $-\text{SH}$ do anticorpo liguem-se fortemente ao metal (Perera et al., 2003; Ferro-Flores & Hashimoto, 1997; Kodina et al., 2005). O efeito da massa de tartarato foi estudado e os resultados encontrados estão demonstrados na FIG. 16. Os seguintes parâmetros mantiveram-se fixos: 1 mg de RTX_{red} ; 1 mg de $\text{SnCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$; 0,25 mg

de ácido gentísico, 1 mL de ^{188}Re (508,3 MBq / 13,7 mCi), pH $6,0 \pm 0,7$ (média \pm DP, $n = 15$) e tempo de reação de 1 h em temperatura ambiente.

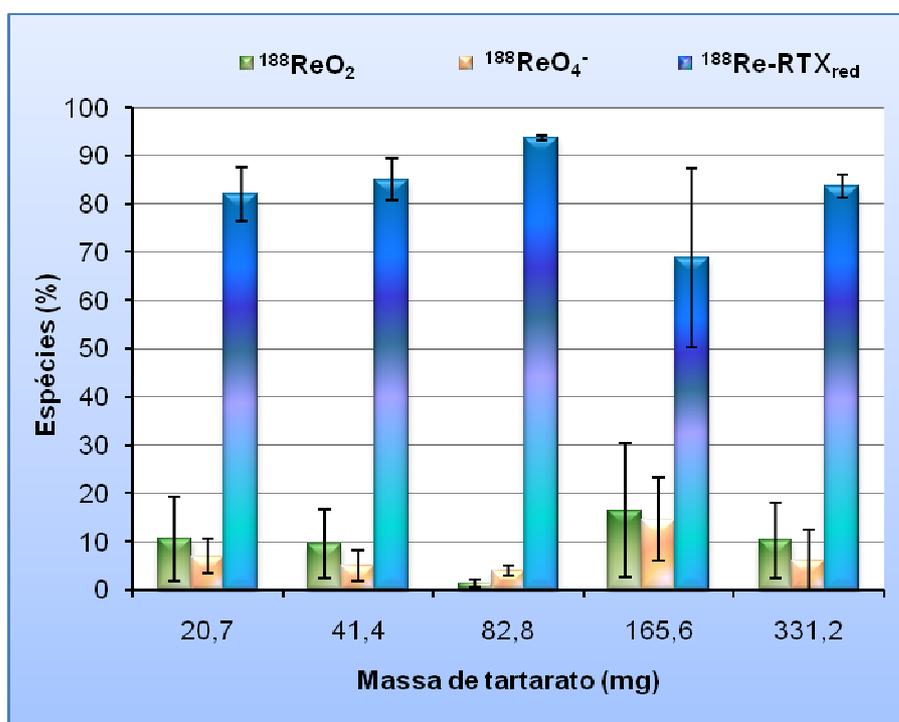


FIGURA 16. Pureza radioquímica (%) de acordo com a variação da massa do tartarato. Os resultados são expressos como média \pm DP: $n = 3$ para todas as massas de tartarato.

Nesta avaliação constatou-se uma pequena porcentagem de tartarato marcado com ^{188}Re para as massas de 82,8 mg de tartarato (0,3% de tartarato marcado) e 331,2 mg de tartarato (0,2% de tartarato marcado). Para as outras massas de tartarato estudadas a porcentagem de tartarato marcado foi zero.

Assim como para Oliver e colaboradores a massa de 82,8 mg de tartarato confirmou ser a melhor para a reação de marcação (Oliver et al., 2005). Ferro-Flores e colaboradores e Torres-García e colaboradores usaram 87 mg e 90 mg de tartarato, respectivamente (Ferro-Flores et al., 2005; Torres-García et al., 2008). Essas quantidades de massa foram necessárias devido a alta concentração de agente redutor (SnCl_2) usada.

O último parâmetro a ser estudado foi o tempo de reação e para esse estudo manteve-se fixa a seguinte formulação: 1 mg de RTX_{red} ; 82,8 mg de tartarato; 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,25 mg de ácido gentísico; 1 mL de ^{188}Re e reação a temperatura ambiente, como mostra a FIG. 17. É importante encontrar um tempo de reação mínimo que produza um bom rendimento de marcação para reduzir a perda do ^{188}Re devido ao seu decaimento.

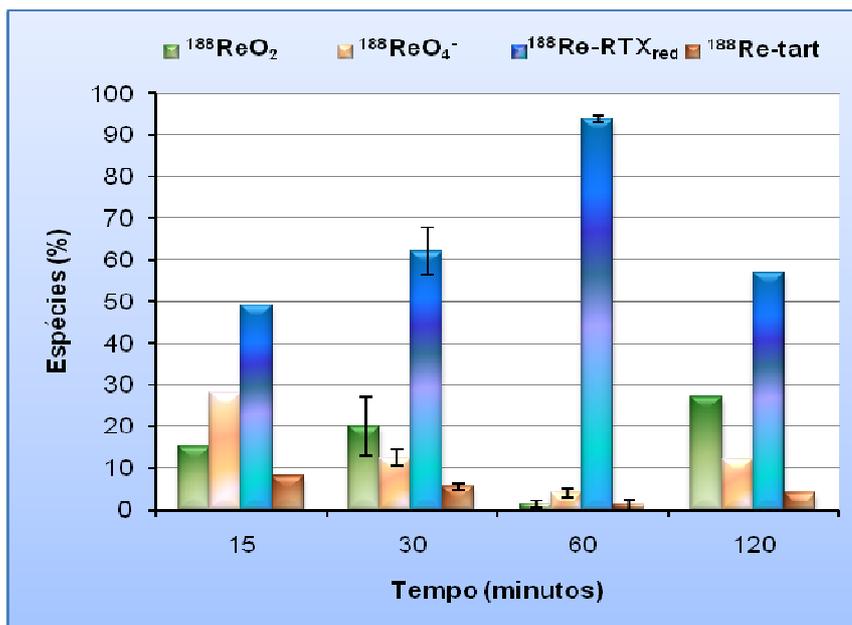


FIGURA 17. Pureza radioquímica (%) de acordo com a variação do tempo de reação. Os resultados são expressos como média \pm DP: $n = 1$ para 15 e 120 min; $n = 2$ para 30 min e $n = 3$ para 60 min. A atividade foi de 519,7 MBq / 14 mCi e pH $5,9 \pm 0,8$ (média \pm DP, $n = 7$).

O melhor tempo de reação foi 1 hora, o mesmo usado por outros autores (Oliver et al., 2005; Torres-García et al., 2008; Ferro-Flores et al., 2005). Gmeiner-Stopar e colaboradores também escolheram o tempo de 1 h de reação ao marcar o anticorpo RTX_{red} com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Gmeiner-Stopar et al., 2008). Ferro-Flores e colaboradores ao analisarem por CLAE o anticorpo RTX_{red} marcado com ^{188}Re após 15 min de reação, observaram um baixo rendimento de marcação com alta porcentagem de $^{188}\text{ReO}_4^-$, mesmo comportamento apresentado neste trabalho (FIG. 17). Para estes autores, o tempo de 30 min também forneceu um baixo rendimento de marcação, com a formação de 20 – 30% de agregados (Ferro-Flores et al., 2005). Na FIG. 17 pode-se verificar que a formação de $^{188}\text{ReO}_4^-$ e $^{188}\text{ReO}_2$ ficou entre 10 e 30%.

O ^{188}Re é um emissor β^- de alta energia, o que pode resultar em radiólise em soluções aquosas durante o preparo da radiomarcagem e estocagem, via reoxidação do rênio ligado à proteína para perrenato livre especialmente quando as atividades de rênio são aumentadas. Um dos produtos radiolíticos formados é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um poderoso oxidante (Sailerova & Billinghamurst, 2003). Várias combinações de agentes estabilizantes incluindo antioxidantes (ácidos ascórbico e gentísico), agente quelante DTPA e soro

albumina humano (SAH) podem ser usados para garantir a estabilização das preparações de ^{188}Re (Sailerova & Billingham, 2003). O ácido gentísico foi escolhido para a marcação baseado na literatura (Oliver et al., 2005), tendo como função proteger a proteína, agindo como um *scavenger* (sequestrante) para os radicais oxidativos presentes na solução, incluindo os produtos da radiólise produzida pela emissão β^- do ^{188}Re . A massa de ácido gentísico foi o único parâmetro que não foi variado neste trabalho, sendo sua massa fixada em 0,25 mg para todos os experimentos.

Após a otimização dos parâmetros de marcação, a formulação líquida determinada como padrão foi a seguinte: 1 mg de RTX_{red} ; 82,8 mg de tartarato; 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,25 mg de ácido gentísico. Para a reação de marcação escolhida como padrão, usou-se 1 mL de ^{188}Re , o tempo de 1 h em temperatura ambiente e pH variando entre 5 e 6.

Foi realizado um estudo desta formulação padrão nos tempos de 4, 6 e 24 h, após adição do perrenato, para conhecer o comportamento da marcação ao longo das horas, assim como a estabilidade foi determinada em três condições diferentes: em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e gelo seco (GS), como mostra a FIG. 18. A atividade usada na marcação foi 1537,2 MBq (41,5 mCi) e pH $6,0 \pm 0,6$ (média \pm DP, $n = 14$).

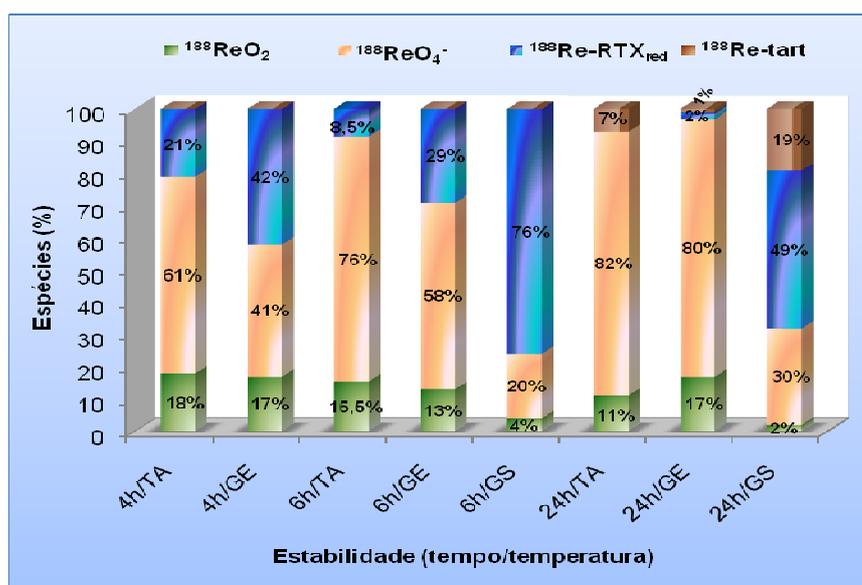


FIGURA 18. Estabilidade da marcação da formulação padrão em relação ao tempo e temperatura. No gráfico está expressa a média dos resultados, para 4 h, $n = 2$ (TA) e $n = 1$ (GE); para 6 h, $n = 2$ (TA e GE) e $n = 1$ (GS) e para 24 h, $n = 2$ (TA / GE / GS).

Analisando a FIG. 18 percebe-se que $^{188}\text{Re(V)}\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi instável e a pureza radioquímica decresceu com o passar das horas, mas observou-se uma ligeira melhora quando a solução foi estocada em baixa temperatura. Como o ^{188}Re apresenta uma grande tendência a reoxidação, a impureza gerada em maior proporção foi ^{188}Re na forma de perrenato livre [$^{188}\text{ReO}_4^-$]. A porcentagem de tartarato radiomarcado em alguns casos apresentados foi zero.

Embora as propriedades químicas do rênio e tecnécio sejam similares, elas não são idênticas. Em particular, o potencial de redução do rênio é mais baixo do que do tecnécio, como mostram as equações 6 e 7.



A diferença de cerca de 220 mV no potencial de redução mostra que os complexos de Re são termodinamicamente mais estáveis em seus estados de oxidação maiores do que os correspondentes análogos de tecnécio. Rênio também forma uma espécie aniônica estável, ReO_4^- (perrenato) e não se liga a nenhum ligante orgânico sem redução para um estado de oxidação menor. Perrenato também é mais difícil de reduzir do que tecnécio, e é mais facilmente reoxidado. O baixo poder de redução do perrenato como comparado com tecnécio pode tornar difícil a redução para estados de oxidação menores como Re(IV) e Re(V) (Iznaga-Escobar, 2001; Liu et al., 2006).

O perrenato (VII), o nível de oxidação mais estável, requer redução para estados de oxidação mais baixos Re(V) ou Re(IV) antes da radiomarcagem (Iznaga-Escobar, 2001). Ferro-Flores e colaboradores verificaram em seus estudos que um fator crítico que afetou a pureza radioquímica foi o pH e que por isso condições ácidas foram necessárias para permitir a reação de redução de Re(VII) para Re(V) (Ferro-Flores et al., 2005). Baseado nesta ocorrência foram feitas marcações nas quais a solução de ^{188}Re foi acidificada adicionando-se 3 gotas de HCl 12 mol.L⁻¹. Pode-se visualizar os resultados obtidos na TAB. 9.

TABELA 9. Influência da variação do pH no rendimento de marcação do $^{188}\text{Re(V)}$ -RTX_{red}

Experimento	pH	Rendimento de marcação (%)
1	1,0	34 ($n = 1$)
2	3,0	67 ($n = 1$)
3	4,0	67 ± 8 ($n = 2$)
4	5,0	76 ± 5 ($n = 2$)
5	6,0	85 ± 2 ($n = 4$)

A marcação em condições ácidas foi estudada numa faixa de pH de 1 a 6. Analisando a TAB. 9 pode-se notar que o pH 1,0 (experimento 1) não favoreceu o rendimento de marcação, aumentando a presença das impurezas perrenato livre e de radiocolóide. Ferro-Flores e colaboradores e Torres-García e colaboradores conseguiram um rendimento de marcação acima de 90% com um pH final 4,0 (Ferro-Flores et al., 2005; Torres-García et al., 2008). Como se pode notar nos experimentos 2 e 3, com pH 3,0 e 4,0 respectivamente, o rendimento de marcação ficou abaixo de 70%, não coincidindo com o apresentado na literatura. Sailerova e colaboradores ao estudarem o efeito de pH na marcação de soro albumina humano (SAH) com ^{188}Re por transquelação com tartarato, evitaram o uso de pH abaixo de 3,5 pela possibilidade de denaturação da proteína (Sailerova et al., 2003). Dewanjee em 1990 (Dewanjee *apud* Sailerova & Billinghamurst, 2003) recomendou que o pH deveria ser mantido abaixo de 6,5 para evitar precipitação do íon estanho (Sailerova & Billinghamurst, 2003). Para Schmidt e colaboradores o uso de pH abaixo de 4,0 foi inaceitável para a marcação do Fab' do anticorpo DD-3B6/22 com ^{188}Re por comprometer a imunorreatividade do anticorpo (Schmidt et al., 1998). No presente trabalho, em concordância com os dados apresentados na TAB. 9, a marcação com pH 6,0 mostrou-se melhor em relação aos outros valores de pH estudados.

Aproximadamente após 11 meses da utilização do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, o sistema de concentração da atividade de ^{188}Re foi importante para continuidade dos experimentos de radiomarkação, com atividades e volumes necessários para as reações (> 37 MBq/mL), até a chegada de um novo gerador. Para a concentração da solução de ^{188}Re foram utilizados cartuchos de troca iônica, um de troca catiônica à base de prata (IC-Ag) e um de troca aniônica (QMA Light). As mesmas condições de reação foram usadas para comparação: 1 mg de RTX_{red}, 82,8 mg de tartarato, 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg de ácido

gentísico, 1 mL de ^{188}Re e reação de 1 h em temperatura ambiente. A comparação do resultado de rendimento de marcação usando o ^{188}Re eluído do gerador novo ou passado pelo sistema de concentração pode ser vista na TAB. 10.

TABELA 10. Comparação do rendimento de marcação do RTX_{red} marcado com ^{188}Re , eluído de um gerador novo ou passado pelo sistema de concentração.

Rênio-188	Atividade (MBq/mCi)	Rendimento de marcação (%)
Sistema de concentração	64,9 / 1,8	47 ± 5 (n = 4)
Gerador novo	542,4 / 14,7	93 ± 1 (n = 4)

Os resultados mostraram que o rendimento de marcação do RTX_{red} , com o ^{188}Re proveniente do sistema de concentração, diminuiu quando comparado ao rendimento de marcação obtido com o ^{188}Re eluído do gerador novo. A vantagem do uso do método de concentração sem dúvida é a obtenção de uma maior atividade num volume reduzido de eluição. Marczewski (2006) estudou a marcação do etidronato com ^{188}Re , usando um sistema *tandem* de concentração com os mesmos cartuchos supracitados, e não verificou nenhuma influência na eficiência de marcação. Uma hipótese para essa queda do rendimento, como o ^{188}Re não foi passado por nenhum filtro de purificação após a concentração, pode ser a presença de alguma impureza oriunda dos cartuchos, como por exemplo a prata, o que provavelmente causaria alguma interferência na marcação do anticorpo, visto que estas biomoléculas são extremamente sensíveis à presença de metais. A análise da presença de impurezas na solução de ^{188}Re pós sistema de concentração não foi realizada. Uma outra hipótese pode ser a influência de entrada de ar no sistema sendo prejudicial ao ^{188}Re .

5.3.2 Marcação direta: Análise radioquímica usando CGF em coluna PD-10

Os experimentos com a coluna comercial PD-10 analisaram inicialmente o comportamento do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$, do $^{188}\text{ReO}_2$ e do $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$. Os perfis de eluição dos respectivos compostos podem ser vistos na FIG. 19.

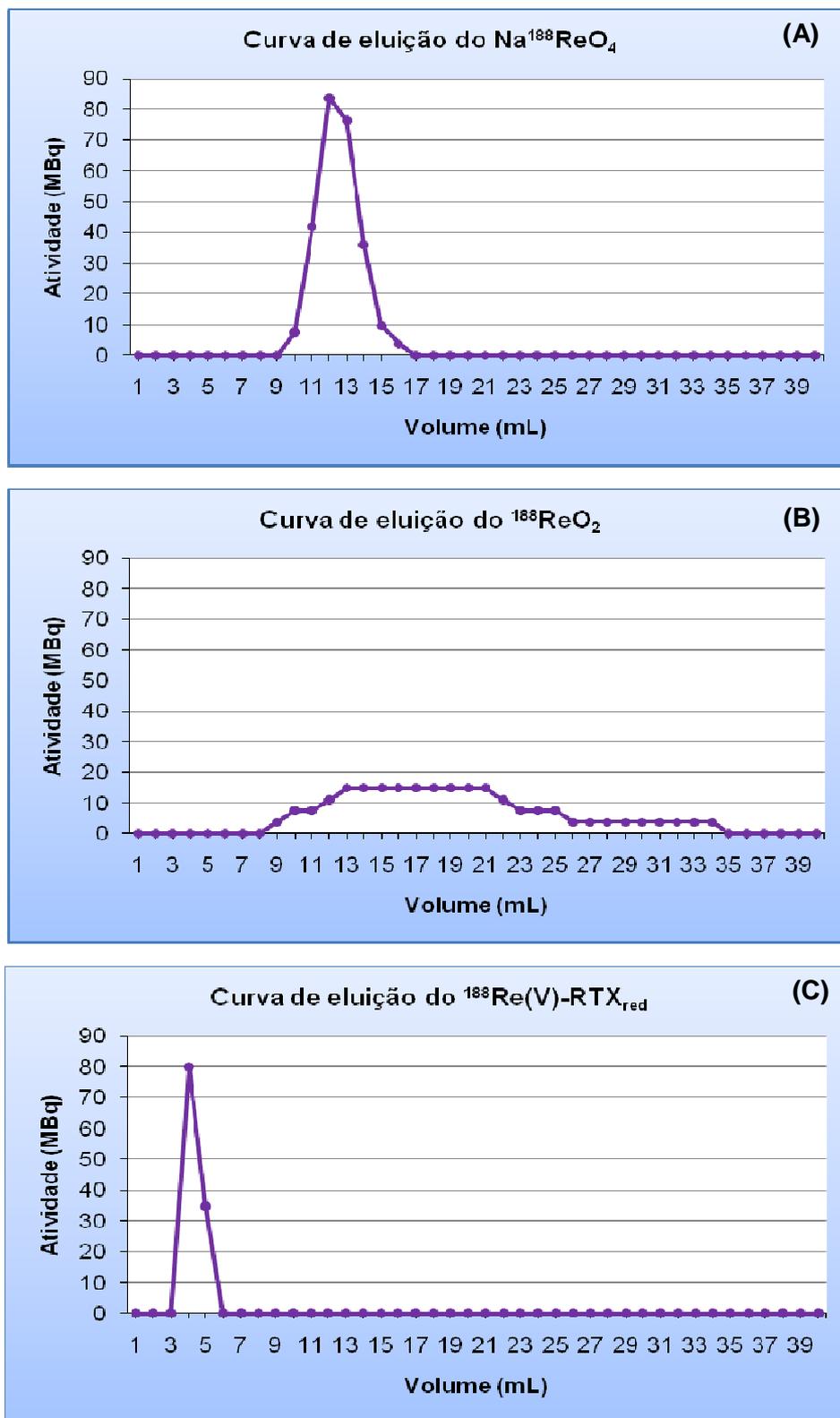


FIGURA 19. Curva de eluição do (A) $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$, (B) $^{188}\text{ReO}_2$ e (C) $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$ em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

As curvas de eluição foram obtidas com 40 mL de PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, o volume coletado foi de 1 mL, com uma vazão de $0,9 \pm 0,1 \text{ mL/min}$ e as amostras

contadas no calibrador de dose. Na eluição do $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$, a atividade se concentrou entre o 10° até o 16° mL, enquanto que para o $^{188}\text{ReO}_2$ houve um “arraste” da atividade começando a eluição no 9° mL e permanecendo até o 34° mL. Para o RTX marcado com ^{188}Re , reação com 1 mg de anticorpo (formulação padrão), a atividade saiu no 4° e 5° mL.

Analisando o perfil das curvas de eluição da FIG.19, verifica-se que a coluna PD-10 é adequada para o controle de qualidade da marcação, uma vez que o anticorpo marcado pode ser separado das impurezas $^{188}\text{ReO}_4^-$ e $^{188}\text{ReO}_2$ por serem eluídos em volumes distintos. Por este método não foi possível a distinção do $^{188}\text{ReO}_4^-$ e $^{188}\text{ReO}_2$, que apresentaram volumes iniciais de eluição iguais.

Após verificar que é possível a separação do RTX_{red} marcado, do perrenato livre e do perrenato reduzido com a coluna PD-10 (Sephadex G-25M), este método foi usado como controle de qualidade de duas marcações: a marcação com a formulação padrão (1 mg de RTX_{red}) e a marcação com a menor massa de RTX_{red} estudada na variação dos parâmetros, 0,25 mg.

A FIG. 20 mostra a curva de eluição da marcação com a formulação padrão, 1 mg de RTX_{red} ; 82,8 mg de tartarato; 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,25 mg de ácido gentísico e 1 mL de ^{188}Re após o tempo de reação de 1 h, como também as curvas de eluição da estabilidade do marcado após 1 e 4 h de incubação à 37°C. E a FIG. 21 mostra a curva de eluição da marcação com 0,25 mg de RTX; 82,8 mg de tartarato; 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,25 mg de ácido gentísico e 1 mL de ^{188}Re após o tempo de reação de 1 h, como também as curvas de eluição da estabilidade do marcado após 1 h de incubação à 37°C e após 6 h de estocagem em gelo seco.

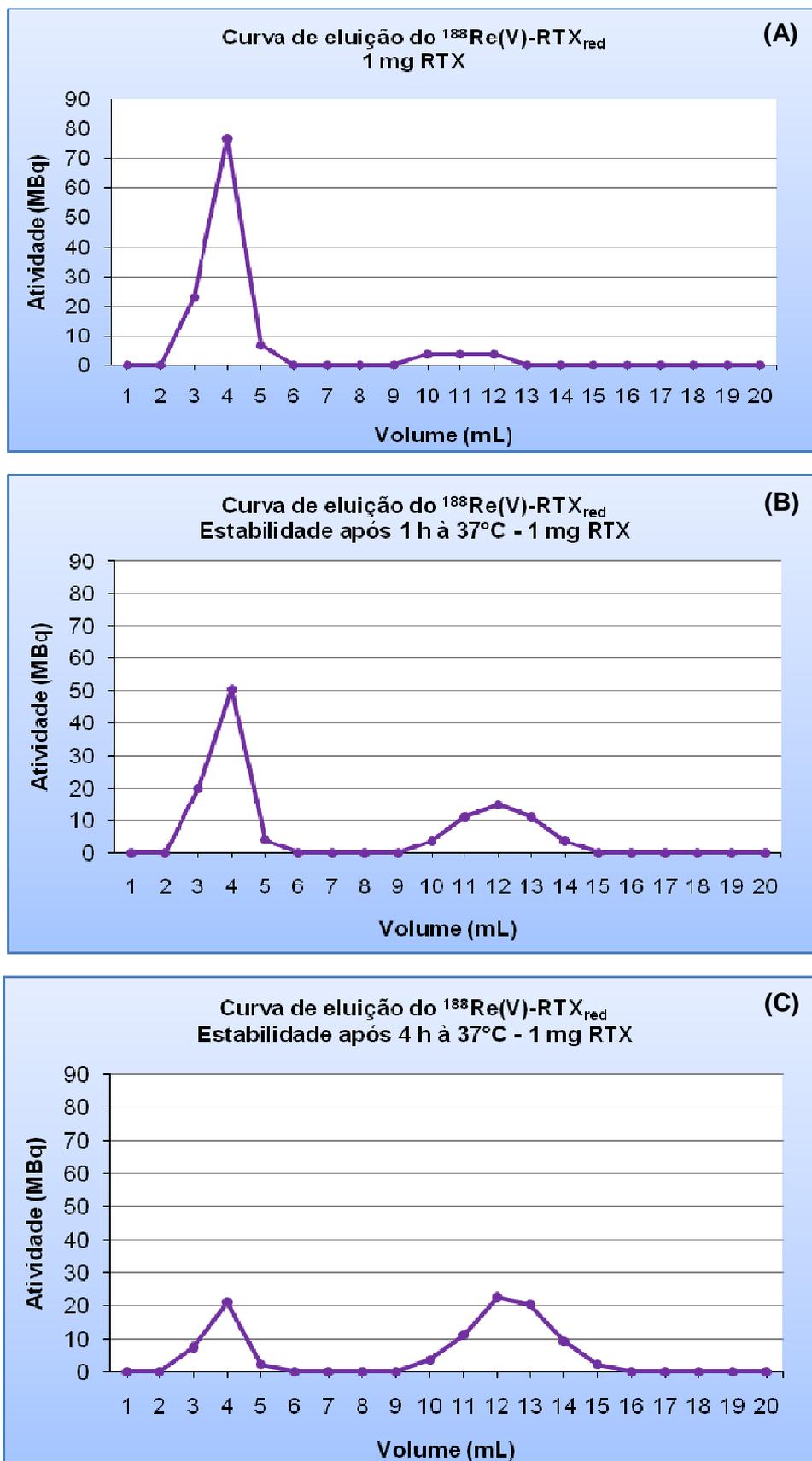


FIGURA 20. Controle de qualidade do RTX_{red} (1 mg) marcado com $^{188}\text{Re(V)}$. Curvas de eluição após o tempo de reação de 1 h (A) e estabilidade após 1 h (B) e 4 h (C) de incubação a 37 °C.

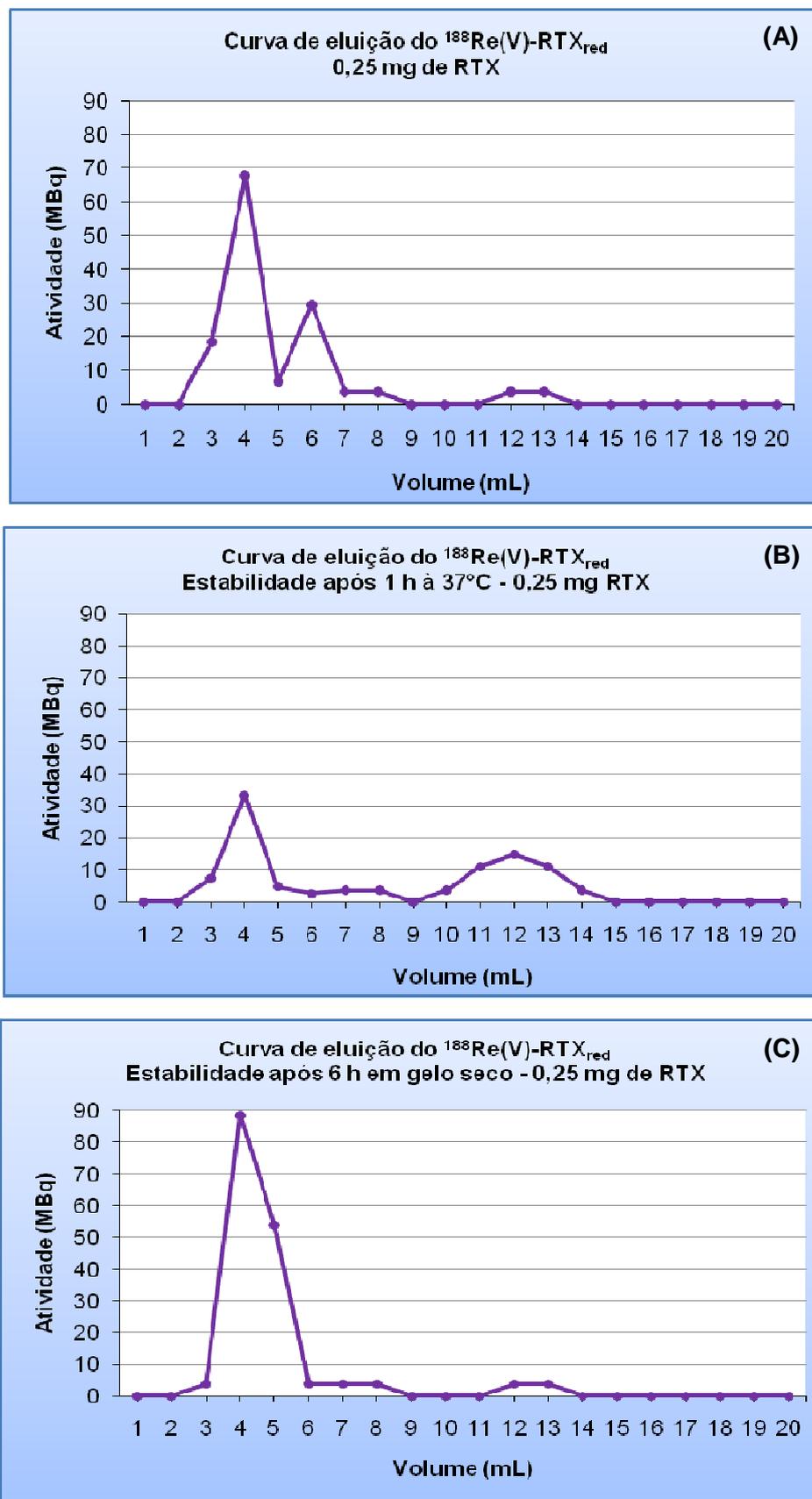


FIGURA 21. Controle de qualidade do RTX_{red} (0,25 mg) marcado com $^{188}\text{Re(V)}$. Curvas de eluição após o tempo de reação de 1 h (A) e estabilidade após 1 h de incubação a 37 °C (B) e após 6 h em gelo seco (C).

A TAB. 11 compara o rendimento de marcação obtido com a coluna PD-10, usada como controle de qualidade, para as duas preparações apresentadas acima.

TABELA 11. Comparação do rendimento de marcação de duas preparações do $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$ obtido com a coluna PD-10 usada como controle de qualidade

Massa de RTX_{red}	Rendimento de marcação (%)			
	Após reação	Estabilidade tempo / temperatura		
		1 h / 37°C	4 h / 37°C	6 h / gelo seco
0,25 mg	77 %	42 %	-	82 %
1 mg	84 %	61 %	28 %	-

Como era de se esperar, a massa de 1 mg de RTX_{red} , escolhida para a formulação padrão, apresentou melhor resultado do que a massa de 0,25 mg de RTX_{red} , bem como uma melhor estabilidade após 1 h de incubação a 37 °C. A formulação padrão não foi estável no decorrer de 4 h após adição do ^{188}Re , havendo uma diminuição de anticorpo marcado, decréscimo de 84% para 28% e independentemente da massa de anticorpo utilizada, a estocagem em gelo seco após adição do ^{188}Re melhora o rendimento de marcação, como foi observado na TAB. 11 para a marcação com 0,25 mg de RTX_{red} e já havia sido constatado para a marcação da formulação padrão, resultados apresentados na FIG. 18.

Como conclusão parcial tem-se que a formulação líquida determinada como padrão foi composta por 1 mg de RTX_{red} ; 82,8 mg de tartarato; 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,25 mg de ácido genticóico. Para a reação de marcação escolhida como padrão, usou-se 1 mL de ^{188}Re , o tempo de 1 h em temperatura ambiente e pH variando entre 5 e 6. Nestas condições, o rendimento de marcação foi de 93% e decresceu com o passar das horas, sendo melhorado apenas quando a solução foi estocada em gelo seco. Os autores referenciados da literatura conseguiram rendimentos de marcação acima de 95% e ao trabalharem com kits liofilizados estocados a 4°C a estabilidade do kit foi de 6 meses (Oliver et al., 2005; Ferro-Flores et al., 2005; Torres-García et al., 2008). A comparação entre o presente trabalho e os referenciados não pode ser feita em termos de estabilidade porque aqui trabalhou-se com uma formulação líquida que por sua vez apresenta dinâmica diferente da formulação liofilizada.

5.3.3 Desafio a cisteína: $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$

Estudos de transquelação avaliam a resistência da ligação dos anticorpos marcados sobre a presença de cisteína no corpo. Diferentes investigações têm mostrado que cisteína é um agente desafiador efetivo para anticorpos marcados com tecnécio(V)/rênio(V) e a transquelação para cisteína é o principal modo de prever a instabilidade *in vivo* desses compostos (Stalteri & Mather, 1996). Para a realização do desafio a cisteína a marcação foi purificada em coluna PD-10 após o tempo de reação de 1h e então 50 μL da solução purificada foi incubada com 50 μL de cisteína e após os tempos de 1, 4 e 24 h, alíquotas foram removidas e analisadas por CP. A FIG. 22 exemplifica o perfil cromatográfico em papel Whatman 3MM (usando NaCl 0,9% como solvente) do controle da marcação após a reação de 1h, após a purificação em coluna PD-10 e do controle das alíquotas do desafio a cisteína dos tempos de 1, 4 e 24 h.

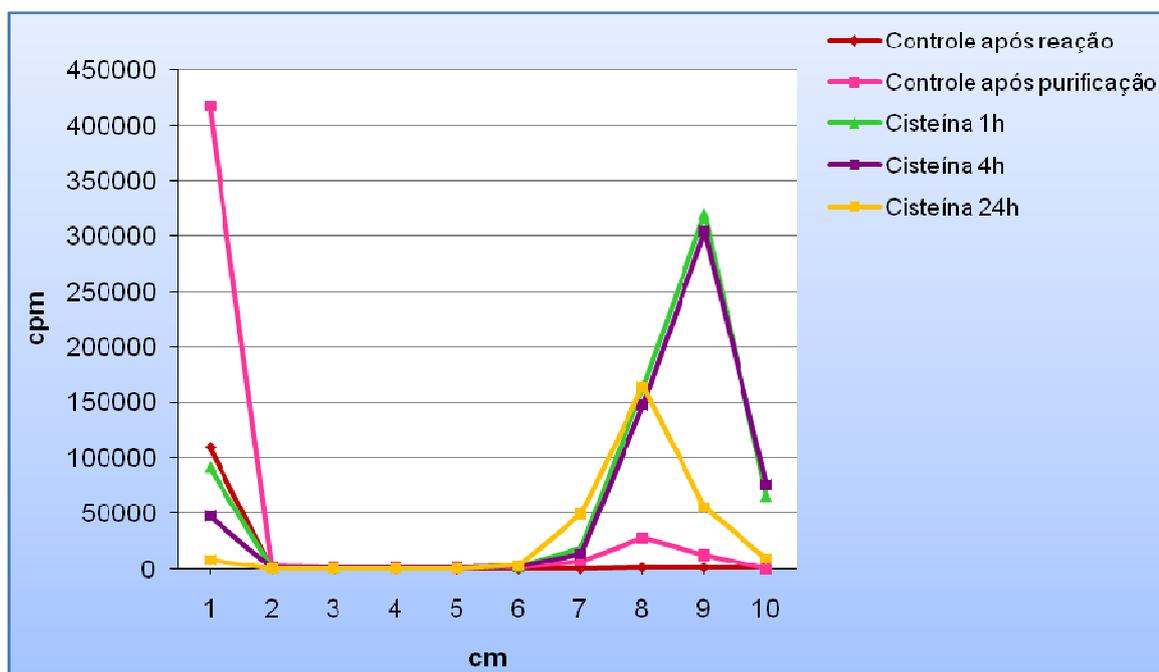


FIGURA 22. Perfil cromatográfico nos 10 cm do papel Whatman 3MM da marcação após 1h de reação (\blacktriangle); marcação após purificação (\blacksquare); reação com cisteína após 1h (\blacktriangle), reação com cisteína após 4h (\blacksquare) e reação com cisteína após 24h (\blacksquare).

No sistema usado para análise, sabe-se que o R_f da cisteína marcada com ^{188}Re é entre 0,67 – 0,83 (entre o 6° e 8° cm da fita) . Analisando a FIG. 22 pode-se notar que após a purificação existe um pequeno pico de atividade no 8° cm da fita mas esse pico é extremamente acentuado na presença de cisteína, comprovando assim a dissociação da marcação para este aminoácido.

Para se ter certeza de que o pico encontrado nessa faixa representava a cisteína marcada, foi realizado um controle da marcação purificada e mantida em estufa a 37°C por 1 e 4 h, simulando as condições do desafio a cisteína. Fazendo o cálculo baseado na atividade obtida entre o 6° e 8° cm da fita, pode-se verificar, na TAB. 12, a porcentagem de dissociação nas diferentes situações.

TABELA 12. Porcentagem de dissociação da marcação do $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$ na ausência e na presença de cisteína.

Amostra	% Dissociação
Pós-reação	3,3 ± 0,4 (n = 2)
Pós-purificação	8 ± 2 (n = 4)
Pós-purificação / 1h a 37°C	33 ± 11 (n = 2)
Pós-purificação / 4h a 37°C	46 ± 4 (n = 2)
Incubação com cisteína – 1h	88 ± 4 (n = 4)
Incubação com cisteína – 4h	92 ± 2 (n = 4)
Incubação com cisteína – 24h	97 ± 1 (n = 4)

Os resultados obtidos e apresentados na TAB. 12 comprovam que na presença da cisteína a porcentagem de dissociação da marcação do RTX_{red} aumentou significativamente, mostrando que esse aminoácido é um grande desafiador à marcação, fazendo com que o ^{188}Re sofra um alto deslocamento da ligação com o anticorpo para a cisteína.

Por outro lado, a transquelação para cisteína foi estudada numa alta concentração, 80 mmol.L⁻¹ e nessa condição observou-se que o $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$ foi bastante suscetível ao ensaio. A concentração máxima esperada de exposição do anticorpo *in vivo* é descrita na literatura como sendo 1 mmol.L⁻¹ (Faintuch et al., 2004).

Para o caso de anticorpos marcados diretamente com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Hnatowich e colaboradores reportaram que após 3 horas de incubação mais de 40% da

atividade transquelou a cisteína com um excesso de 1:300 (Hnatowich et al., 1993).

Stalteri & Mather (1996) relataram valores aproximados de 10% e 50% de dissociação após 3 e 24 h de incubação com excesso molar de 1:333 (cisteína:anticorpo) do anticorpo PR1A3 marcado de forma direta com ^{99m}Tc .

5.3.4 Estudos *in vivo*: $^{188}\text{Re(V)}$ -RTX_{red}

A biodistribuição do $^{188}\text{Re(V)}$ -RTX_{red} foi estudada em camundongos fêmeas CD1-foxn1^{nu} com linfoma. Os animais foram sacrificados e dissecados 24, 48 e 72 h após injeção intravenosa do $^{188}\text{Re(V)}$ -RTX_{red}. A TAB. 13 mostra a porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g) nos órgãos e tecidos analisados.

TABELA 13. Biodistribuição do $^{188}\text{Re(V)}$ -RTX_{red} em camundongo nude contendo linfoma de células Raji expresso como porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g).

Órgão	%AI/g		
	24 h	48 h	72 h
Sangue	5,4 ± 0,6	2,2 ± 0,6	1,5 ± 0,2
Pulmão	4,6 ± 2,3	1,7 ± 0,5	1,2 ± 0,2
Coração	2,0 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,5 ± 0,1
Baço	3,6 ± 0,9	2,0 ± 1,0	0,9 ± 0,1
Fígado	2,1 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Intestino	0,9 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,22 ± 0,01
Estômago	2,0 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0,27 ± 0,03
Rins	5,9 ± 0,8	2,2 ± 0,4	1,3 ± 0,1
Bexiga	1,5 ± 1,0	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,3
Fêmur	1,2 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
Músculo	0,6 ± 0,2	0,23 ± 0,05	0,19 ± 0,02
Tumor	3,8 ± 0,9	2,0 ± 0,8	1,2 ± 0,3

Os valores representam a média ± DP ($n = 5$) da porcentagem de atividade injetada por grama.

Se comparados com os resultados de biodistribuição em camundongos sadios obtidos por Ferro-Flores e colaboradores para o RTX_{red} marcado com $^{188}\text{Re(V)}$, pode-se afirmar que o mesmo perfil de uma biodistribuição normal de proteína foi obtido (Ferro-Flores et al., 2005).

A captação no tumor decresceu de 3,8 %AI/g no tempo de 24 h após injeção para 1,2 %AI/g após 72 h. As razões do clareamento sanguíneo e renal

foram parecidas, após 24 h, o sangue apresentou 5,4 %AI/g e os rins 5,9 %AI/g e após 72 h esses valores decresceram para 1,5 %AI/g no sangue e 1,3 %AI/g nos rins. Os resultados da biodistribuição na TAB. 13 não exibem evidência de $^{188}\text{ReO}_4^-$ *in vivo*, o que levaria a uma alta acumulação da radioatividade no estômago.

Após 24 h da injeção, acumulação significativa da radioatividade foi encontrada no baço ($3,6 \pm 0,9$ %AI/g), rins ($5,9 \pm 0,8$ %AI/g), fígado ($2,1 \pm 0,5$ %AI/g), pulmão ($4,6 \pm 2,3$ %AI/g) e estômago ($2,0 \pm 0,4$ %AI/g).

Os dados de biodistribuição aqui encontrados também mostram que o músculo, fêmur, intestino e bexiga tiveram baixa captação. Com o passar das horas esses e os demais órgãos apresentaram um bom clareamento, notando-se que não houve retenção da atividade injetada.

A FIG. 23 mostra os resultados da razão tumor:não-tumor para o sangue, rins, fígado e músculo, nos três tempos estudados após injeção do $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$.

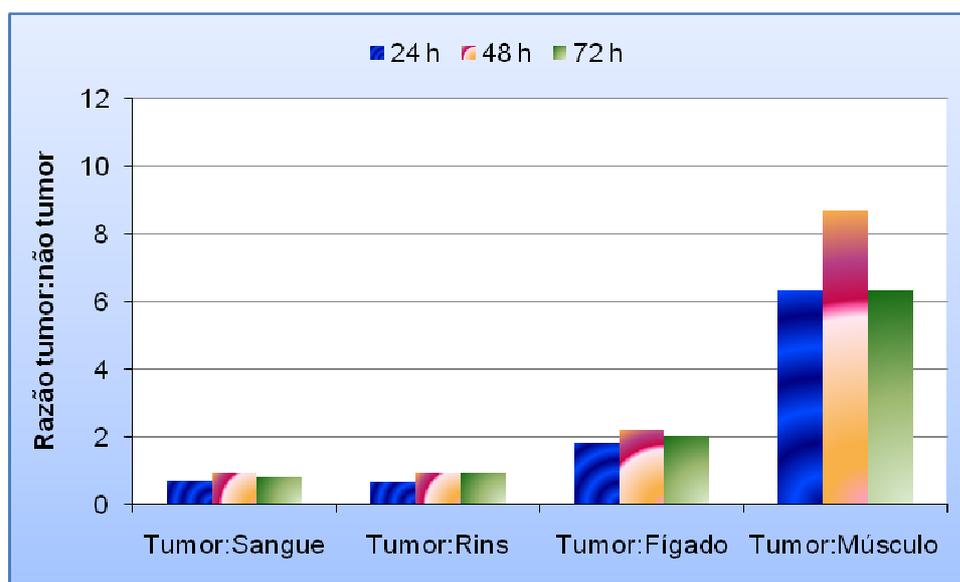


FIGURA 23. Razão tumor:não-tumor calculada para os camundongos nude com tumor de células Raji injetados com $^{188}\text{Re(V)-RTX}_{\text{red}}$. As razões foram calculadas para os tempos de 24, 48 e 72 h após injeção.

O clareamento da corrente sanguínea levou a uma razão tumor:sangue praticamente constante, $0,7 \pm 0,2$ após 24 h de injeção, $0,9 \pm 0,2$ após 48 h de injeção e $0,8 \pm 0,2$ após 72 h de injeção. A relação tumor:músculo foi a mais

expressiva sendo $6,4 \pm 1,2$ após 24 h de injeção; $9,0 \pm 3,0$ após 48 h de injeção e $6,4 \pm 1,2$ após 72 h de injeção. A vantagem dessa relação tumor:músculo expressiva é o favorecimento do contraste na obtenção das imagens.

Para aquisição da imagem cintilográfica foi usado um camundongo CD1-foxn1^{nu} de cada grupo de tempo previamente injetado com a solução de $^{188}\text{Re}(\text{V})\text{-RTX}_{\text{red}}$. Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 h após injeção e imediatamente as imagens planares estáticas foram adquiridas. Como a atividade injetada nos animais foi menor do que 37 MBq (1 mCi) e levando em consideração a $T_{1/2}$ física do ^{188}Re de 16,9 h, as imagens de 48 h e 72 h após injeção não foram produzidas com uma boa resolução por insuficiência no número de contagens necessárias e por este motivo elas não serão apresentadas. A imagem obtida no tempo de 24 h após injeção pode ser vista na FIG. 24.

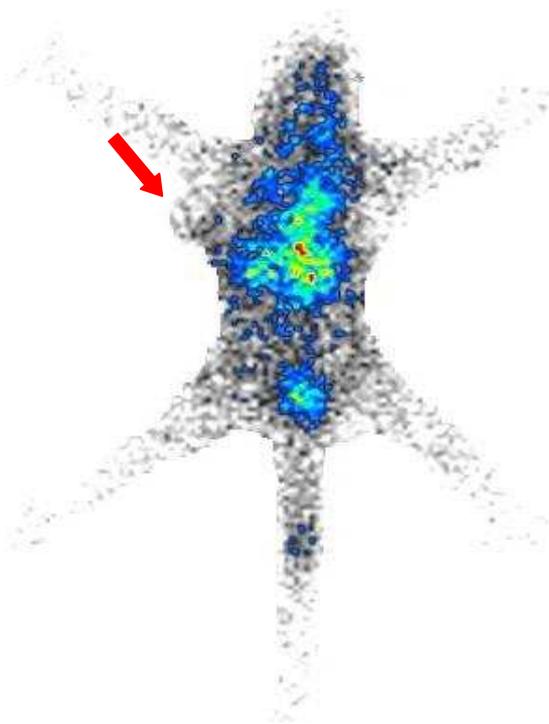


FIGURA 24. Imagem cintilográfica obtida em um camundongo CD1-foxn1^{nu}, portador de tumor (seta vermelha) induzido com células Raji, injetado i.v. com $^{188}\text{Re}(\text{V})\text{-RTX}_{\text{red}}$.

O resultado obtido com a imagem cintilográfica está em concordância com os dados de biodistribuição. Houve captação tumoral, como indicado pela seta vermelha na FIG. 24, mas essa captação foi discreta. Pode-se visualizar também a captação na região abdominal, correspondente a captação de órgãos como fígado, baço e rins, como mostrado nos dados da biodistribuição. A

resolução espacial das imagens não foi adequada devido a baixa atividade de ^{188}Re injetada.

5.4 Método de marcação via carbonila: $\text{M}(\text{CO})_3$ ($\text{M} = ^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re)

Waibel e colaboradores mostraram uma tecnologia de marcação com tecnécio baseada na química organometálica, envolvendo a simples mistura de um composto carbonila $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ com uma proteína recombinante de alvo Histidina (Waibel et al., 1999). Outros sítios funcionais da cadeia protéica (por exemplo, grupo tioéter na metionina) podem ser coordenados ao núcleo $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]$. Todavia, se imidazóis estão disponíveis, a marcação ocorre por razões de cinética com alta preferência na posição respectiva da histidina que está de acordo com investigações dos modelos dos compostos.

Visto que histidina é um sítio de ligação útil para a marcação de anticorpos monoclonais e peptídeos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -carbonila e sabendo que os anticorpos possuem algumas histidinas disponíveis em sua estrutura, optou-se primeiramente em iniciar os estudos de marcação com o anticorpo Rituximab nativo (RTX_{nat}) e $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$.

O preparo do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -carbonila a partir de um kit liofilizado, apresentado por Alberto e colaboradores, é um procedimento conveniente de apenas uma etapa, usando o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ eluído em salina, e que forma o precursor $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ com rendimentos acima de 95% (Alberto et al., 1998, 1999). O controle de qualidade do precursor pode ser feito com fita TLC-SG alumínio usando $\text{MeOH}:\text{HCl}$ 6 mol.L^{-1} ($v:v = 95:5$) como solvente ou CLAE usando uma coluna C18-RP e um fluxo gradiente com os solventes TEAP $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 2,5 e metanol. Muitos outros autores comprovaram a eficiência da produção do precursor $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -carbonila (Egli et al., 1999; Schibli et al., 2000; Amann et al., 2001; Saidi et al., 2004, Kothari et al., 2007; Chen et al., 2008a, 2008b).

Como a produção da carbonila já é bem estabelecida em literatura e no próprio laboratório do PSI, o controle de qualidade pós produção do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ não foi realizado com os sistemas acima citados. O $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ para a marcação do anticorpo RTX foi preparado a partir de um kit liofilizado, como citado no item 4.10.1 e o cromatograma após seu preparo, obtido num sistema *FPLC* (que foi utilizado para controle de qualidade da marcação), é mostrado na FIG. 25. O

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ eluído também foi analisado usando o *FPLC* mas como resultado dessa análise, nenhum pico foi detectável para determinação do tempo de retenção (R_t – *retention time*) e a análise não foi repetida. Portanto, como não foi possível a distinção entre o precursor livre ($^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$) e o pertecnetato livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) usando este sistema, o pico correspondente ao $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ mais a possível presença do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ será relatado neste trabalho como “impurezas”.

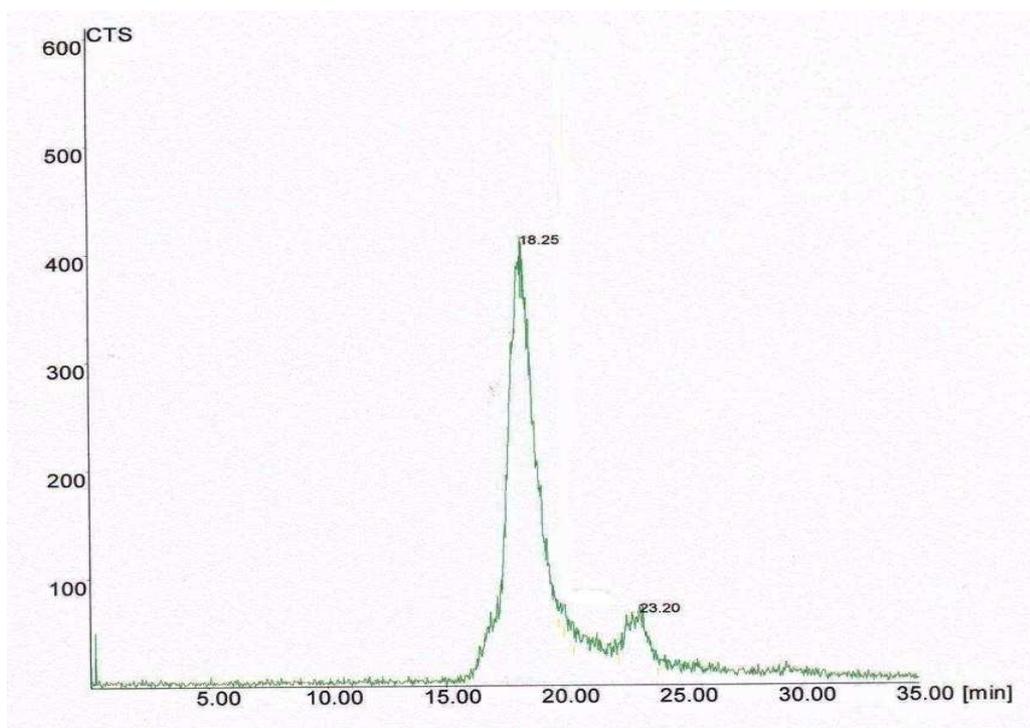


FIGURA 25. Cromatograma do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$, após o preparo, obtido em uma coluna de *FPLC* Superdex 75. O pico relativo as impurezas ficou entre 18 – 24 min.

Ao analisar a FIG. 25 percebe-se que o maior pico teve um $R_t = 18,25$ min e representa mais de 90% das contagens enquanto que o menor pico teve um $R_t = 23,20$ min e representa menos de 10% das contagens. Foi assumido então que o maior pico representa o precursor de ^{99m}Tc -carbonila e foi formado com rendimentos compatíveis com os apresentados na literatura.

O primeiro parâmetro analisado na marcação do RTX_{nat} com $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ foi a variação da massa de anticorpo: 100 e 250 μg de RTX_{nat} . Neste experimento, o volume de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ usado foi 100 μL (50 MBq / 1,4 mCi) e o tempo de reação foi de 3 h a 37°C. Os resultados obtidos são mostrados na TAB. 14.

A escolha do volume de carbonila e do tempo de reação usado foi baseada em experimentos prévios realizados com o AcM chCE7, produzido pelo Centro de Radiofarmácia do PSI. Este anticorpo serviu como treinamento para o aprendizado da técnica da carbonila.

TABELA 14. Efeito da variação da massa de RTX_{nat} no rendimento de marcação

%	Massa de RTX _{nat}	
	100 µg (n = 2)	250 µg (n = 3)
^{99m} Tc(CO) ₃ -RTX _{nat}	35 ± 9 %	28 ± 3 %
Impurezas	66 ± 9 %	72 ± 3 %

Os valores são expressados como média ± desvio padrão.

Observa-se na TAB. 14 que a massa de RTX_{nat} não teve um efeito significativo sobre o rendimento de marcação. Com 100 µg de RTX_{nat} o rendimento de marcação foi de 35% enquanto que com 250 µg de RTX_{nat} o rendimento de marcação foi de 28%, portanto a massa de 250 µg de RTX_{nat} foi escolhida para o acompanhamento da marcação em função do tempo de incubação.

A influência do tempo de incubação foi determinada para a reação usando 250 µg de RTX_{nat}, volume de ^{99m}Tc(CO)₃ de 100 µL, com atividade aproximada de 50 MBq (1,4 mCi) e incubação a 37°C. A FIG. 26 exemplifica os cromatogramas obtidos após 3 e 24 h de incubação e a TAB. 15 sumariza os resultados obtidos em relação a porcentagem de RTX_{nat} marcado e de impurezas formadas.

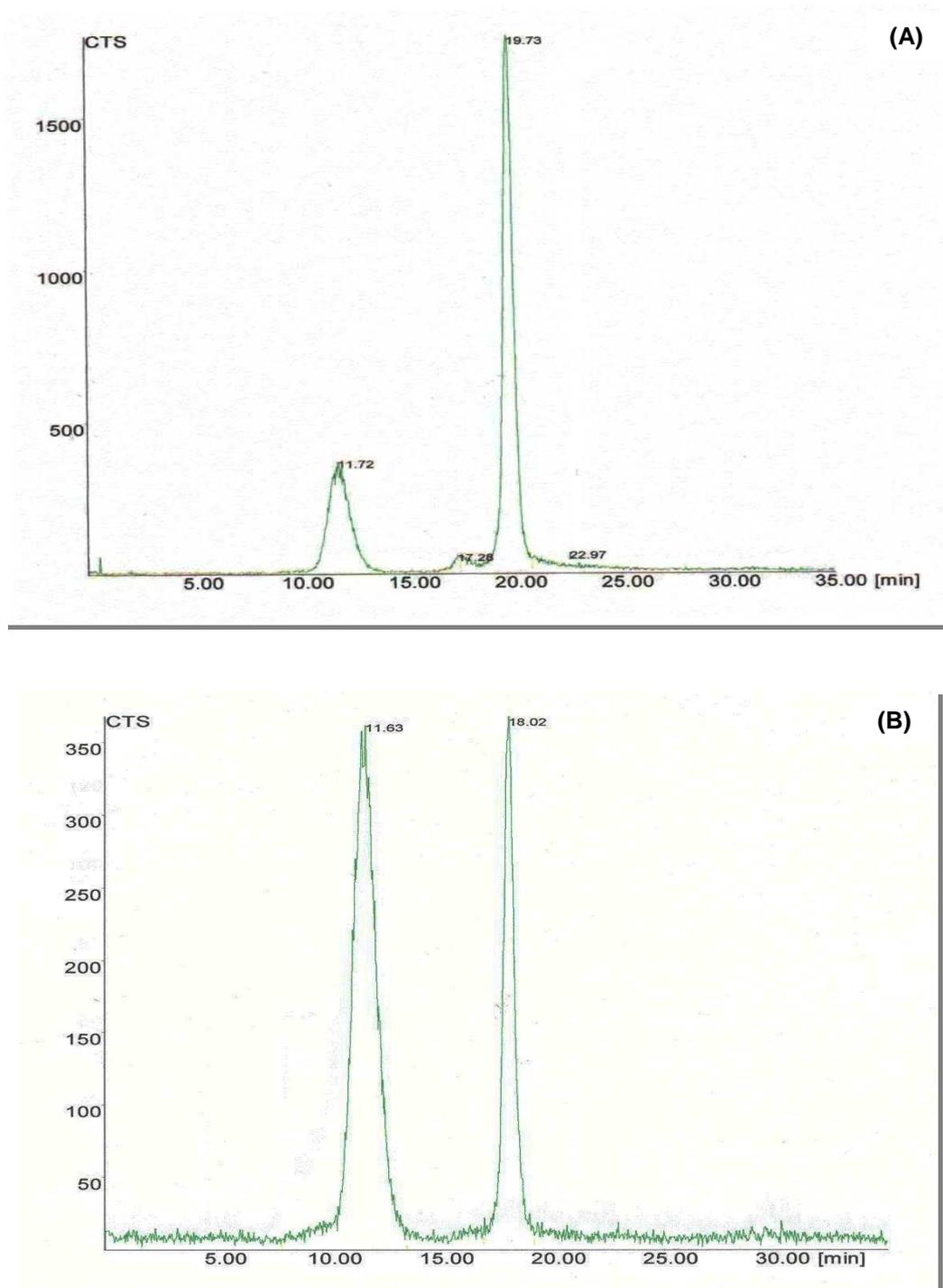


FIGURA 26. Cromatogramas do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{nat}}$ usando o sistema *FPLC* com uma coluna Superose 12 após 3 h (A) e 24 h (B) de incubação a 37°C. Neste sistema, o R_t correspondente ao RTX_{nat} é de $11,68 \pm 0,06$ min e os picos entre 17 – 23 min correspondem as impurezas.

TABELA 15. Efeito do tempo de incubação no rendimento de marcação do RTX_{nat}.

%	Tempo de incubação	
	3 h (n = 3)	24 h (n = 2)
^{99m} Tc(CO) ₃ -RTX _{nat}	28 ± 3 %	69 ± 1 %
Impurezas	72 ± 3 %	31 ± 1 %

Os valores são expressos como média ± desvio padrão.

O efeito da variação da massa de RTX_{nat} não afetou significativamente o rendimento de marcação. Por outro lado, percebeu-se que o tempo de incubação (TAB. 15) ocasionou uma grande diferença no rendimento, sendo que após 3 h de incubação somente 28% da carbonila marcou o RTX_{nat} enquanto que após 24 h de incubação esse valor subiu para 69%, o que sugere que o ^{99m}Tc(CO)₃ reage com as histidinas disponíveis na estrutura do anticorpo mas a cinética de reação é lenta. Mesmo assim, a perda por decaimento do ^{99m}Tc reduz em muito o rendimento do processo.

Como os resultados usando o RTX_{nat} não foram satisfatórios, optou-se pela marcação com carbonila via grupos sulfidrilas livres (-SH). Os grupos -SH foram obtidos pela redução do anticorpo com 2-ME, utilizando o mesmo método de redução para marcação direta com ¹⁸⁸Re(V).

Para otimizar as condições de marcação usando o RTX_{red} e ^{99m}Tc(CO)₃, experimentos variando a massa de anticorpo reduzido e o volume de carbonila foram realizados. Um acompanhamento da marcação em relação ao tempo também foi realizado.

A TAB. 16 apresenta os resultados da marcação com ^{99m}Tc(CO)₃ usando 100 e 250 µg de RTX_{red}. A reação ocorreu com 100 µL de ^{99m}Tc(CO)₃ (65 MBq / 1,8 mCi) e tempo de reação de 3 h a 37°C. Os cromatogramas destas reações podem ser visualizados na FIG. 27.

TABELA 16. Efeito da massa de RTX_{red} no rendimento de marcação com ^{99m}Tc(CO)₃.

%	Massa de RTX _{red}	
	100 µg	250 µg
^{99m} Tc(CO) ₃ -RTX _{red}	88%	97%
Impurezas	12%	3%

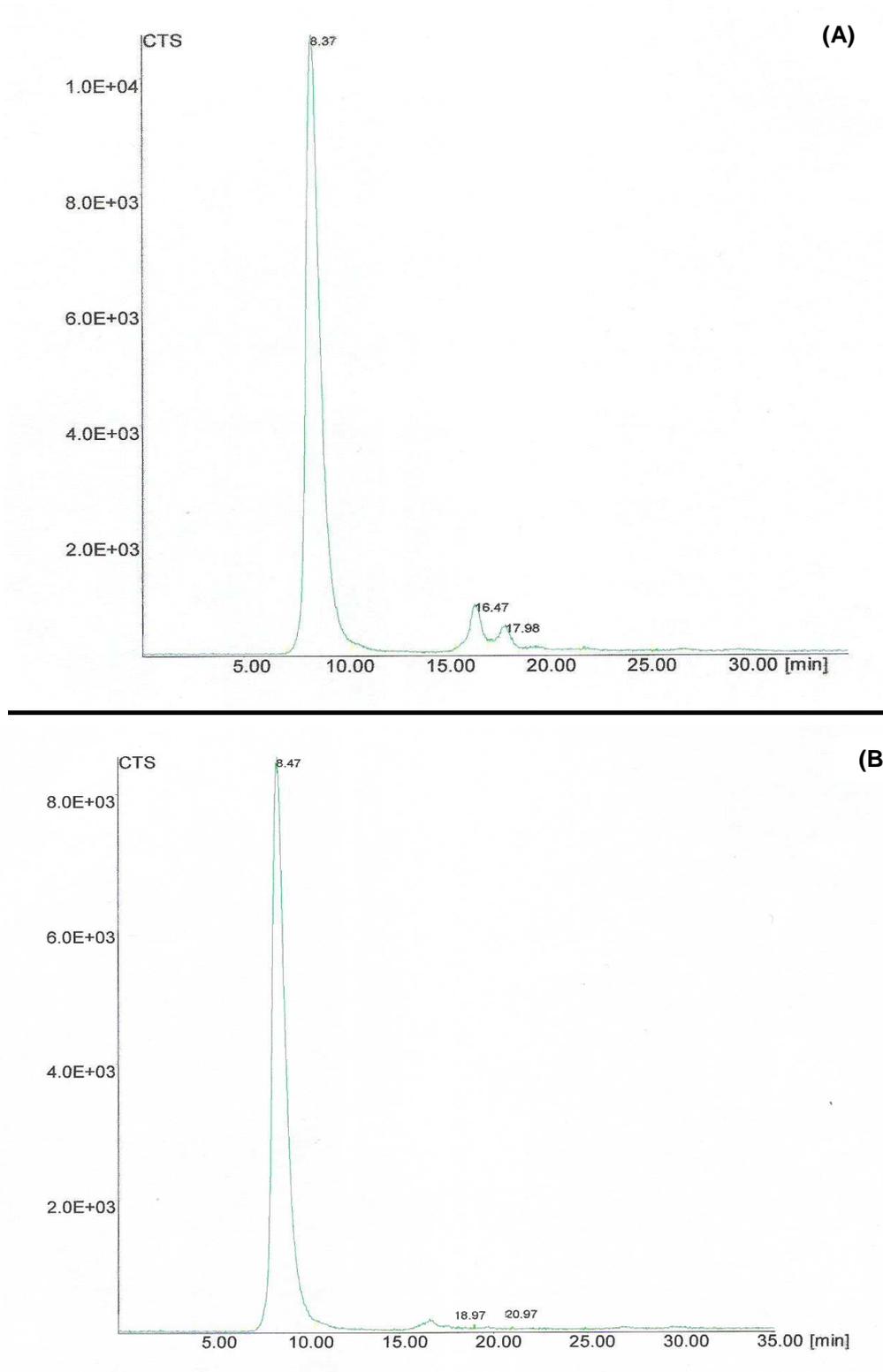


FIGURA 27. Cromatogramas do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ usando o sistema *FPLC* com uma coluna Superose 12 após 3 h de incubação a 37°C. Reação com 100 μg de RTX_{red} (A) e reação com 250 μg de RTX_{red} (B). O R_t de 8,37 e 8,47 min corresponde ao RTX_{red} marcado e os picos entre 16,47 – 25,48 min correspondem as impurezas.

No caso do RTX_{red}, a massa de anticorpo usada foi um parâmetro levado em conta para obtenção de rendimentos de marcação acima de 95%. Com 100 µg de RTX_{red} o rendimento foi de 88%, enquanto que com 250 µg esse rendimento aumentou para 97% (TAB. 16).

Os ligantes contendo N (histidina, histamina ou base Schiff) são os quelantes mais potentes para o precursor ^{99m}Tc-carbonila, mas Egli e colaboradores demonstraram que a fixação do núcleo ^{99m}Tc-carbonila também foi possível com a cisteína (Egli et al., 1999). A relevância dos métodos de conjugação descrita para o núcleo [M(CO)₃]⁺ (M = ^{99m}Tc e Re) foi reforçada pelo trabalho de Lazarova e colaboradores que mostrou que ligantes baseados em enxofre são capazes de ligar o tecnécio e rênio eficientemente (Lazarova et al., 2005; Biechlin et al., 2008). Os resultados comparando a marcação com o RTX_{nat} e RTX_{red} aqui apresentados também comprovam essa teoria.

Para o estudo de variação do volume de ^{99m}Tc(CO)₃ foi usado 250 µg de RTX_{red} e tempo de reação de 3 h a 37°C. A atividade variou de 10 a 60 MBq (0,3 a 1,6 mCi). Os resultados podem ser conferidos na TAB. 17.

TABELA 17. Efeito do volume de ^{99m}Tc(CO)₃ no rendimento de marcação do RTX_{red}.

%	Volume de ^{99m} Tc(CO) ₃					
	10 µL	20 µL	30 µL	40 µL	50 µL	100 µL
^{99m} Tc(CO) ₃ -RTX _{red}	86 %	85 %	83 %	80 %	93 %	97 %
Impurezas	14 %	15 %	17 %	20 %	7 %	3 %

Como se pode observar na TAB. 17, os melhores rendimentos de marcação foram encontrados com volumes de 50 e 100 µL de ^{99m}Tc(CO)₃. Para obtenção de uma atividade maior de ^{99m}Tc(CO)₃ nas marcações, o volume de 100 µL foi escolhido para os experimentos subsequentes com ^{99m}Tc-carbonila.

Os experimentos iniciais realizados com o ^{99m}Tc(CO)₃ serviram de modelo para a marcação com ¹⁸⁸Re(CO)₃, por isso a formulação denominada otimizada para o ^{99m}Tc(CO)₃ foi o ponto de partida para o ¹⁸⁸Re(CO)₃.

Schibli e colaboradores primeiramente reportaram a síntese do precursor ¹⁸⁸Re-carbonila com um rendimento maior que 80% (Schibli et al., 2002). Posteriormente, em 2007, Müller e colaboradores conseguiram obter o

mesmo precursor com um rendimento acima de 90%, comparado com o rendimento do precursor de ^{99m}Tc -carbonila de 98% (Müller et al., 2007). Assim como para o ^{99m}Tc , o controle de qualidade para o núcleo $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ não foi realizado, ele apenas foi analisado usando o sistema *FPLC* para saber seu comportamento neste sistema e posteriormente poder identificá-lo no controle de qualidade do RTX marcado.

O cromatograma típico para o núcleo $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ após seu preparo é visto na FIG. 28. Neste sistema também não foi possível a distinção entre $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$, perrenato livre ou outras espécies formadas, sendo a somatória destas espécies chamada de “impurezas”.

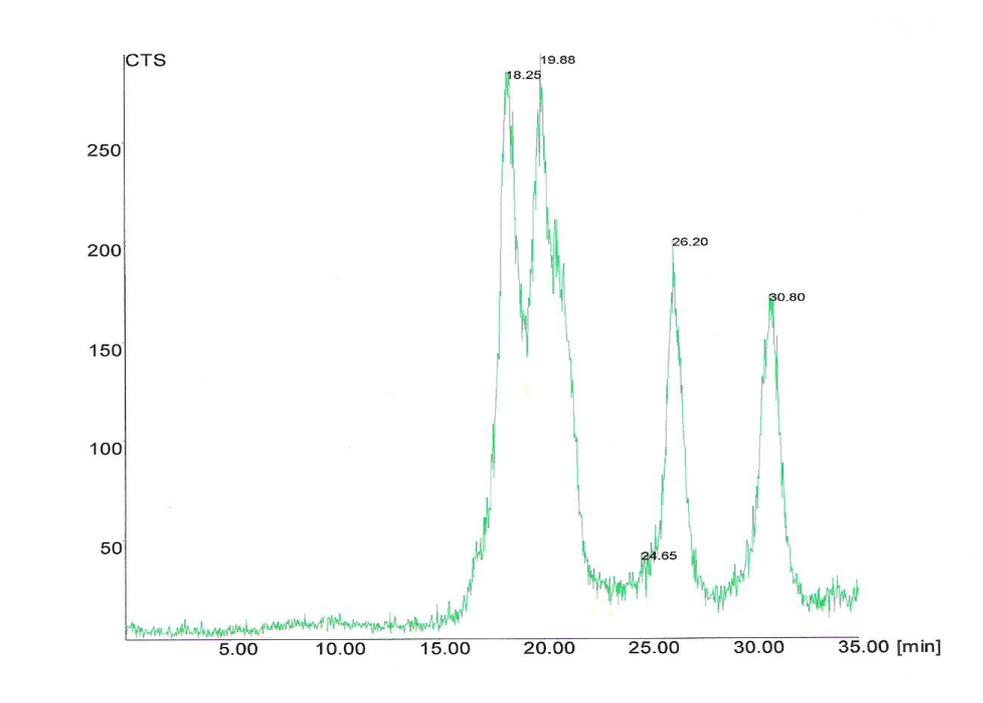


FIGURA 28. Cromatograma do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$, após o preparo, obtido em uma coluna de *FPLC* Superose 12. Os picos apareceram entre 18,25 e 30,80 min.

Yu e colaboradores analisaram a formação do núcleo $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ por meio de CCD (fita ITLC) e CLAE. O rendimento obtido em CLAE correspondente ao $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ foi de 80% e o rendimento correspondente ao $^{188}\text{ReO}_4^-$ foi de 20% (Yu et al., 2005). Eles compararam seus resultados com os apresentados por Schibli e colaboradores (Schibli et al., 2002). O perfil cromatográfico encontrado com a análise feita por CCD (fita ITLC) no trabalho de Yu e colaboradores demonstrou a presença de quatro picos, sendo que um foi relacionado ao $^{188}\text{ReO}_2$, dois relacionados ao $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ e um relacionado ao $^{188}\text{ReO}_4^-$ (Yu et al.,

2005). Após purificação usando uma coluna Sep-Pak, as impurezas $^{188}\text{ReO}_2$ e $^{188}\text{ReO}_4^-$ foram removidas e o perfil cromatográfico obtido pelos autores apenas para o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ (purificado) teve o mesmo formato dos picos com $R_t = 18,25$ e $19,88$ min (que representam 70%) apresentados na FIG. 28.

A FIG. 29 mostra a influência do tempo de incubação (1, 3, 6, 24 e 48 horas) na marcação do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. A reação foi realizada com $250\ \mu\text{g}$ de RTX_{red} , $100\ \mu\text{L}$ de $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ e incubação a 37°C . Os cromatogramas do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ para os tempos de 3 e 24 h podem ser vistos na FIG. 30.

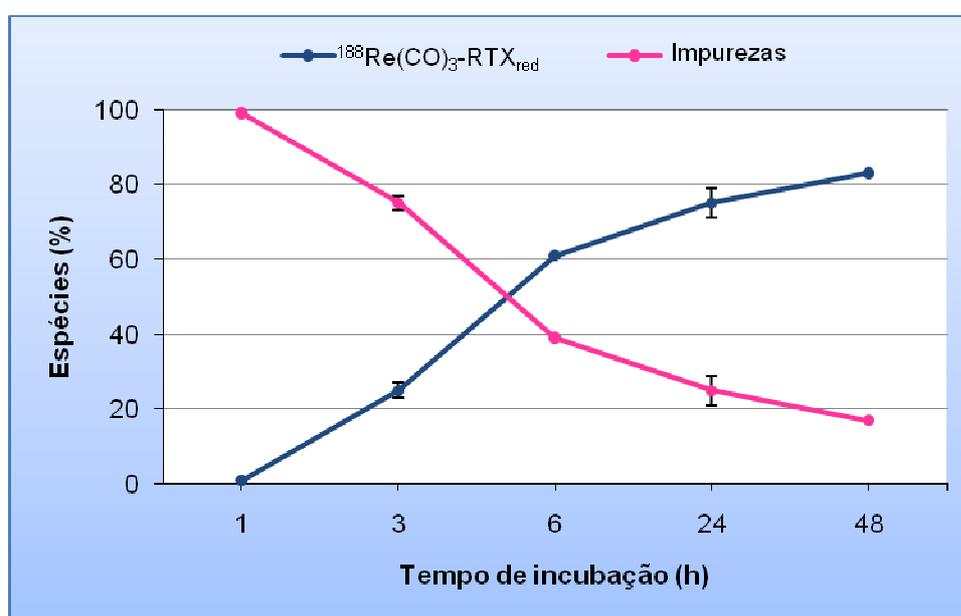


FIGURA 29. Efeito do tempo de incubação no rendimento de marcação do RTX_{red} usando $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$.

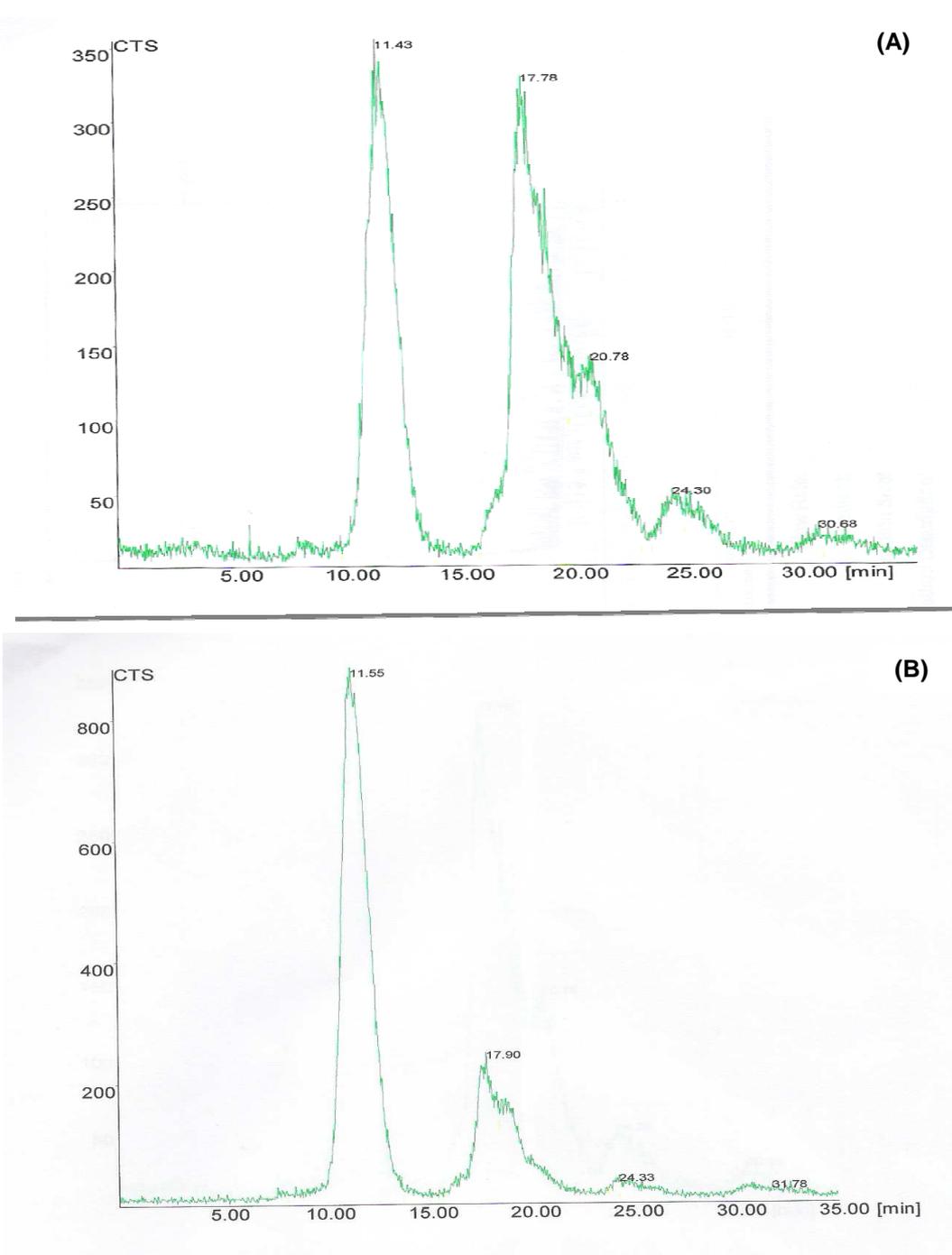


FIGURA 30. Cromatogramas do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ usando o sistema *FPLC* com uma coluna Superose 12 após 3 h (A) e 24 h (B) de incubação a 37°C. O $R_t = 11,49 \pm 0,08$ min corresponde ao RTX_{red} marcado e os picos entre 17,78 – 30,68 min correspondem as impurezas.

Em se tratando da marcação do RTX_{red} com o núcleo $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ é nítida a influência do tempo de incubação no rendimento de marcação. Com o passar das horas há um crescimento de RTX_{red} marcado e um decréscimo na

formação das impurezas. Para se conseguir mais de 70% de RTX_{red} marcado foram necessárias 24 h de incubação.

A fim de elucidar se a massa de RTX_{red} causaria alguma modificação no rendimento de marcação com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ para o tempo de incubação de 24 h a 37°C , um experimento comparando as massas de 100 e 250 μg foi realizado (TAB. 18).

TABELA 18. Efeito da massa de RTX_{red} no rendimento de marcação com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ para o tempo de incubação de 24 h a 37°C .

%	Massa de RTX_{red}	
	100 μg	250 μg
$^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$	57 %	75 %
Impurezas	43 %	25 %

Assim como constatado para o $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$, a massa de 250 μg de RTX_{red} foi necessária para se conseguir um maior rendimento de marcação.

Uma comparação do rendimento de marcação do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi realizada levando-se em consideração o tempo de incubação. Padronizou-se para as reações 250 μg de RTX_{red} , 100 μL de carbonila e incubação a 37°C (FIG. 31).

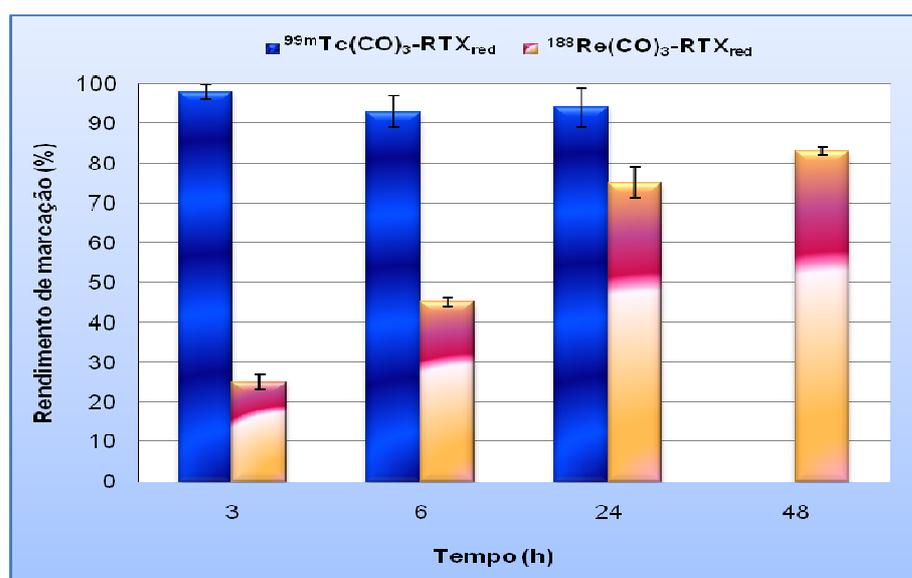


FIGURA 31. Efeito do tempo de incubação no rendimento de marcação do $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. Os valores representam a média \pm DP. Para $^{99\text{m}}\text{Tc}$: $n = 2$ (3 h) e $n = 7$ (6 e 24 h) e para ^{188}Re : $n = 2$ (6 e 48 h) e $n = 3$ (3 e 24 h).

Cerca de 98% de rendimento foi obtido quando $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ foi incubado com RTX_{red} a 37°C por 3 h, como determinado por *FPLC*, todavia menos de 30% de RTX_{red} foi marcado com o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ para este tempo. Para o $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ - RTX_{red} houve um ligeiro decréscimo de anticorpo marcado com o passar das horas, mas a marcação foi estável até 24 h, ficando o rendimento de marcação acima de 90%. No entanto, para o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ - RTX_{red} houve um crescimento de anticorpo marcado com o passar das horas mostrando um comportamento contrário ao $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$. As curvas claramente indicam que a cinética da radiomarkação do RTX_{red} foi mais rápida usando $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ do que $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$, conseguindo-se assim maiores rendimentos de marcação no menor tempo de incubação do anticorpo com a carbonila.

O rendimento da marcação do anticorpo trastuzumab com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ também foi dependente do tempo de reação no trabalho de Chen e colaboradores. Cerca de 70% de rendimento foi obtido quando o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ foi incubado com o trastuzumab a 37°C por 24 h. Esses rendimentos decresceram para cerca de 50% e 20%, respectivamente, quando incubado por 4 h e 1h. Purificação foi necessária para obtenção de uma pureza radioquímica acima de 95% (Chen et al., 2009).

De acordo com os resultados do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ - RTX_{red} apresentados na FIG. 31, o tempo de incubação de 48 h não foi suficiente para se obter mais de 90% de anticorpo marcado. Como não era de interesse estender esse tempo de incubação por mais de 48 h e evitar assim a perda de atividade do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ decorrente do decaimento radioativo do ^{188}Re devido a sua $T_{1/2}$ física de 16,9 h, optou-se por realizar a incubação do RTX_{red} com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ usando um tempo aproximado de 17 h. O intuito era obter mais de 90% de anticorpo marcado equiparando-se com o resultado obtido com o $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$, portanto, após esse tempo de 17 h realizou-se uma purificação pós-marcação usando uma coluna Bio-Spin 6. O cromatograma comparativo do perfil da marcação antes (~ 17 h de incubação) e pós-purificação é mostrado na FIG. 32.

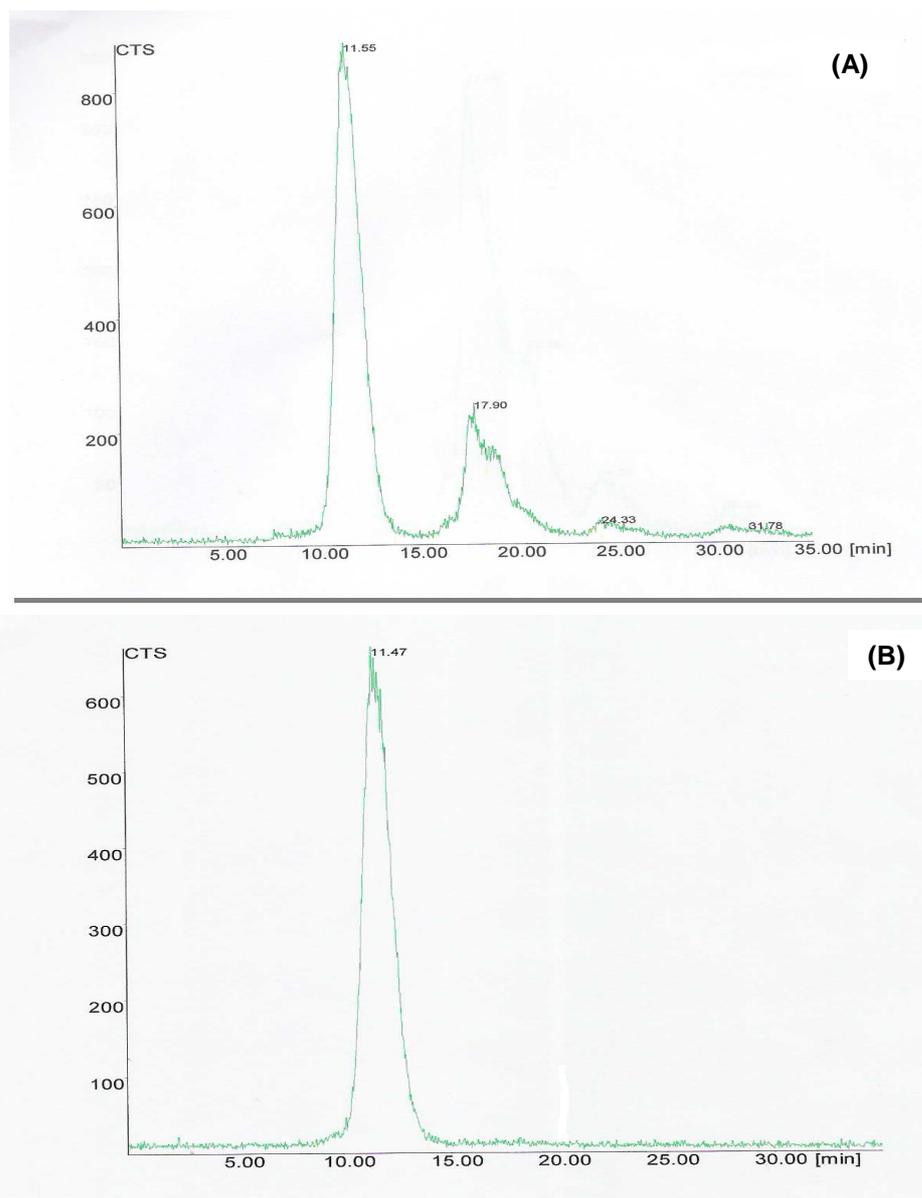


FIGURA 32. Cromatogramas do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ usando o sistema *FPLC*, com uma coluna Superose 12, antes da purificação (A) (~ 17 h de incubação) e após purificação (B) em uma coluna Bio-Spin 6. Na figura (A) o $R_t = 11,43$ min corresponde ao RTX_{red} marcado e os picos entre 15 e 35 min correspondem as impurezas. Na figura (B) o $R_t = 11,47$ min corresponde ao RTX_{red} marcado.

Como conclusão parcial tem-se que a condição de marcação otimizada para o $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi 250 μg de RTX_{red} , 100 μL de $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ e 3 h de incubação a 37°C, com um rendimento de marcação acima de 95%. A marcação foi estável até 24 h ficando o rendimento acima de 90%. A condição de marcação otimizada para o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi 250 μg de RTX_{red} , 100 μL de $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$, incubação por volta de 17 h a 37°C e purificação pós-marcação. O tempo foi um fator que influenciou o rendimento de marcação, sendo que este foi crescente

com o passar das horas. Todavia, o rendimento de marcação do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi menor do que para o $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$, 80% comparado com 97%. Contudo, o processo de purificação do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ em coluna Bio-Spin 6 foi eficiente e rápido, removendo as impurezas, obtendo uma pureza radioquímica de 100%. As condições otimizadas para o anticorpo marcado com os dois radioisótopos foram usadas para os experimentos posteriores.

5.4.1 Desafio a histidina e cisteína: $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$

Diferentes investigações têm mostrado que cisteína é um agente desafiador efetivo para anticorpos marcados com tecnécio(V)/rênio(V) e a transquelação para a cisteína é o principal modo de predizer a instabilidade *in vivo* desses compostos (Stalteri & Mather, 1996). Com a mesma finalidade, o desafio a histidina é um teste criado para determinar a estabilidade dos compostos marcados com o núcleo carbonila contra transquelação e/ou decomposição pelo fato deste aminoácido ser um ligante forte para este núcleo. Uma comparação destes desafios para o $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ pode ser vista na FIG. 33.

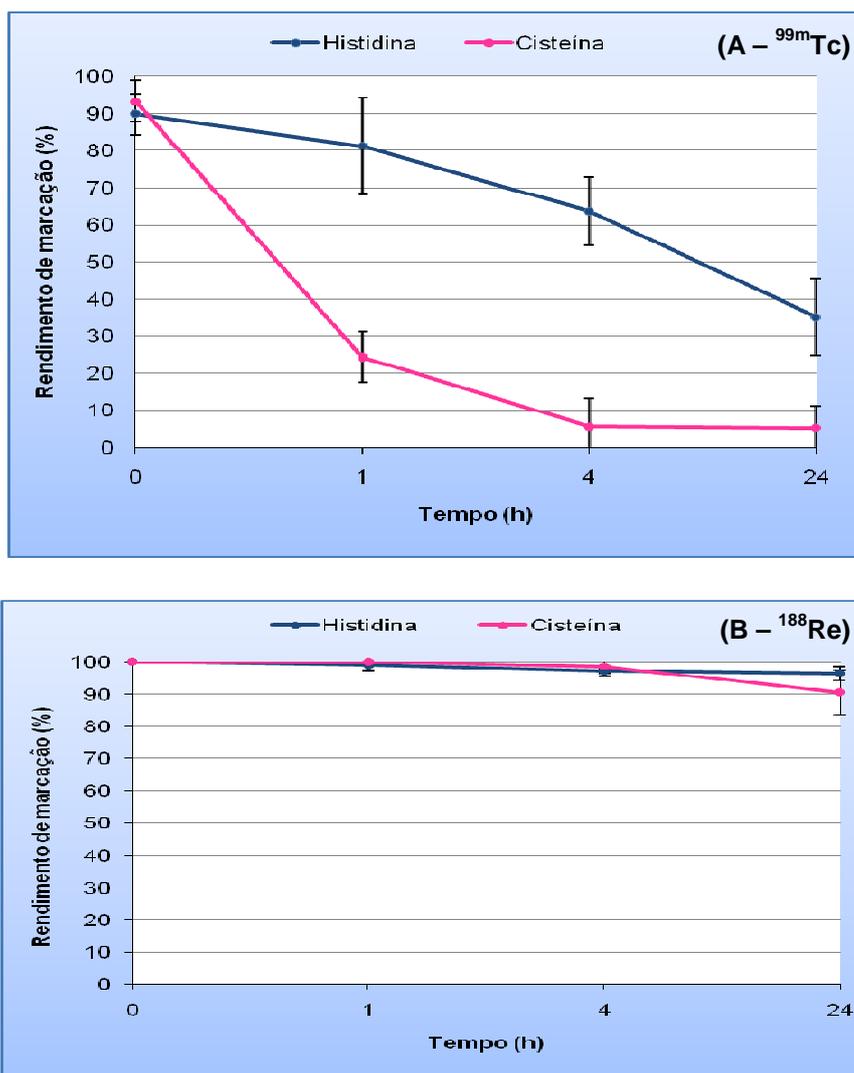


FIGURA 33. Deslocamento do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (A) e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (B) na presença de histidina ($n = 5$ e $n = 4$ para ^{99m}Tc e ^{188}Re , respectivamente) e cisteína ($n = 3$ e $n = 4$ para ^{99m}Tc e ^{188}Re , respectivamente). Os valores do gráfico representam a média \pm DP.

O $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi mais suscetível a transquelação na presença de cisteína, sendo que após 1 h somente 24% de RTX_{red} permaneceu ligado ao $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$, enquanto que para o mesmo tempo, em comparação com histidina, 81% de RTX_{red} permaneceu ligado ao $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$. Chen e colaboradores ao marcarem o anticorpo trastuzumab com $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ após 3 h de incubação a 37°C conseguiram um rendimento acima de 90% e esse rendimento foi influenciado pela ligação competitiva do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ com histidina (Chen et al., 2008). Como a marcação do RTX_{red} com o $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ mostrou-se estável com o passar das horas, como mostrado anteriormente, conclui-se então que a histidina e cisteína foram realmente ligantes competidores na reação.

Como mencionado, a purificação pela coluna Bio-Spin 6 foi conduzida somente para $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ porque a pureza radioquímica conseguida com $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi suficientemente alta para os estudos *in vitro* e *in vivo*. A pureza radioquímica do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ após purificação foi sempre 100% e este valor não foi significativamente modificado na presença de cisteína ou histidina, mostrando que após 24 h uma alta porcentagem da radioatividade permaneceu ligada ao anticorpo. Esta estabilidade frente a histidina e cisteína pode ser explicada pela própria estabilidade do RTX_{red} marcado com o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$, que foi favorecida com o passar das horas, assim como a cinética lenta de ligação do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ ao RTX_{red} , que pode interferir na transquelação a histidina ou cisteína, fazendo com que essa transquelação demore a ocorrer. No trabalho de Chen e colaboradores as porcentagens de trastuzumab marcado com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ no desafio a histidina nos tempos de 24, 48 e 144 h foram 89,9%, 85,4% e 74,4%, menores do que no presente trabalho (Chen et al., 2009).

5.4.2 Estabilidade do $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ no plasma humano

Os dois compostos, $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$, foram incubados com plasma humano a 37°C e alíquotas de 10 μL foram removidas em diferentes tempos e analisadas por *FPLC*. Menos de 10% da radioatividade ligou-se às proteínas do plasma. O $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ não revelou reoxidação significativa para as impurezas quando incubados em plasma humano a 37°C por 24 h (FIG. 34).

O $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ permaneceu estável em plasma humano até 24 h e a formação da espécie $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-plasma}$ foi menor que 2%. Após 24 h, a porcentagem da radioatividade associada com o RTX_{red} diminuiu de 100% para 98%. Para $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$, a estocagem em plasma humano por até 24 h causou menos de 10% de formação do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-plasma}$ e neste tempo a porcentagem da radioatividade associada com o RTX_{red} diminuiu de 90,5% para 81%.

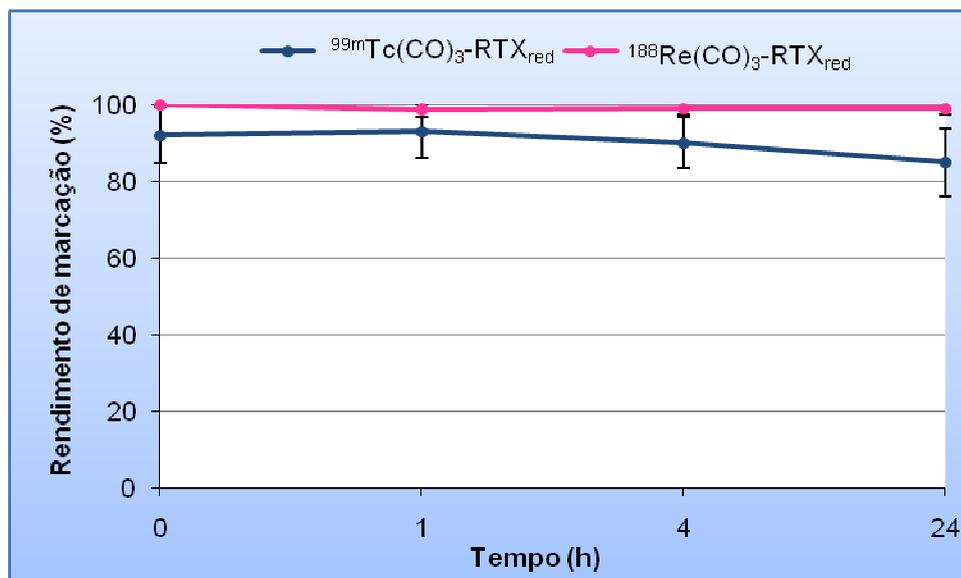


FIGURA 34. Estabilidade do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ no plasma humano. Os valores representam a média \pm DP: $n = 4$ para ^{99m}Tc e $n = 3$ para ^{188}Re .

Os resultados de estabilidade do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-trastuzumab}$ mostraram que a estocagem em soro por até 24 h causou menos de 2% de soro marcado (Chen et al., 2008). O teste de estabilidade do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-trastuzumab}$ mostrou que 94,4%, 92,7% e 92,4% de anticorpo permaneceu ligado ao $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ após 24, 48 e 144 h de estocagem em soro albumina humano a 5% (Chen et al., 2009). Os resultados para o trastuzumab marcado com $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ (Chen et al., 2008) foram melhores do que para o RTX_{red} marcado com $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ no presente trabalho, ao passo que os resultados do RTX_{red} marcado com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ foram superiores ao do trastuzumab marcado com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ (Chen et al., 2009).

5.4.3 Imunorreatividade e afinidade de ligação do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$

Imunorreatividade significa a porcentagem do anticorpo radiomarcado capaz de se ligar ao antígeno. A fração imunorreativa do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi determinada usando o método de Lindmo (Lindmo et al., 1984). O ensaio foi realizado usando células Ramos e Raji que são tipos de células de linfoma que expressam o antígeno CD20. Um baixo valor de imunorreatividade foi obtido, menos de 50% para ambos os compostos, $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$, e menos de 60% para $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{nat}}$. Mattes (1995) descreveu 3 tipos de resultados experimentais, os quais indicaram que os cálculos baseados no teste de Lindmo não são sempre confiáveis. O autor fez um

questionamento sobre a manipulação de dados que pode ser feita para melhorar o valor da fração imunorreativa obtida. De fato, muitos autores reportam uma alta fração imunorreativa para anticorpos marcados, o que não se sabe ao certo se o valor é correto ou não. Não foi encontrado nenhum relato de valor de fração imunorreativa para o RTX_{red} marcado com $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ para fins comparativos.

A capacidade de ligação ($B_{m\acute{a}x}$) do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{red}$ e a constante de dissociação (K_d) foi estimada para células Ramos e Raji pelo ensaio de saturação usando análise Scatchard. A FIG. 35 mostra um exemplo de uma curva de saturação do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{red}$ e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{red}$ determinada com células Raji.

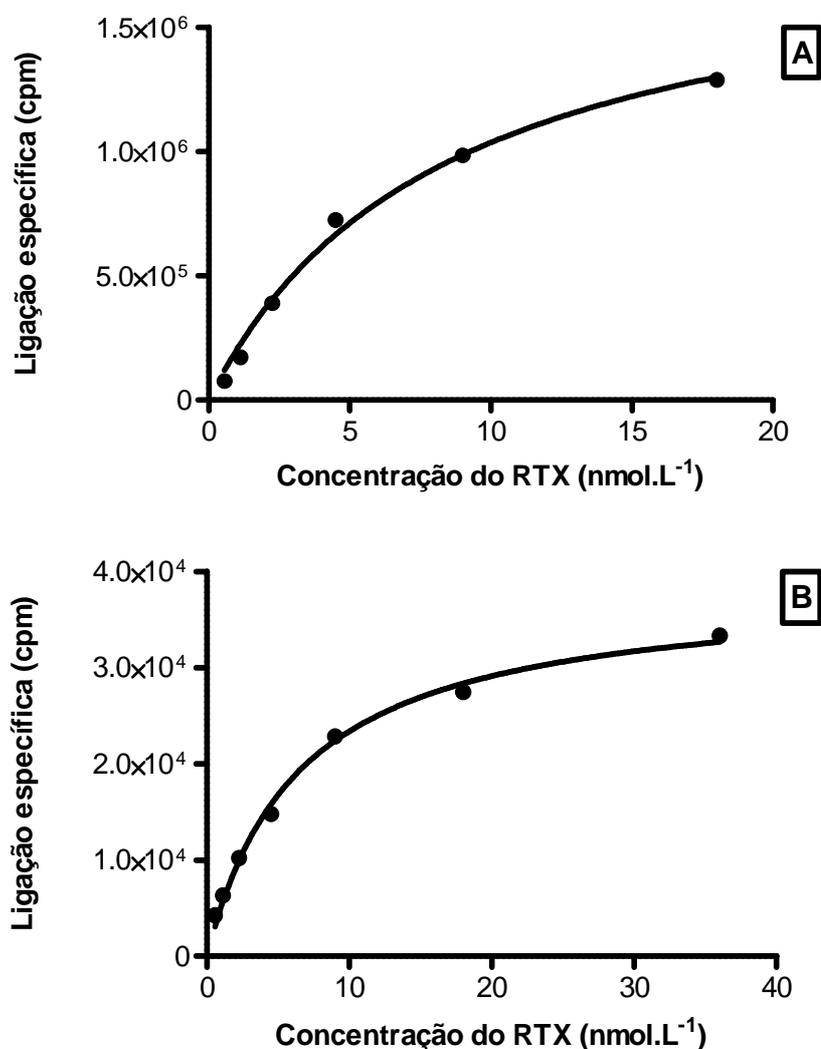


FIGURA 35. Curva de saturação do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{red}$ (A) ($K_d = 8,0 \text{ nmol.L}^{-1}$) e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{red}$ (B) ($K_d = 6,5 \text{ nmol.L}^{-1}$) para células Raji.

O resultado apresentado na FIG. 35 determinou para o $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ um K_d de 8 nmol.L^{-1} e $B_{\text{máx}}$ de $1,3 \text{ pmol.L}^{-1}$ (188 ng) e para o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ um K_d de $6,5 \text{ nmol.L}^{-1}$ e $B_{\text{máx}}$ de $0,73 \text{ pmol.L}^{-1}$ (109 ng). Esses $B_{\text{máx}}$ obtidos significam que aproximadamente uma média de $1,5 \times 10^6$ moléculas de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e $8,7 \times 10^5$ moléculas de $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ podem ser ligadas por células na condição de saturação.

Usando células Raji o K_d do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi $5 \pm 5 \text{ nmol.L}^{-1}$ (média \pm DP, $n = 2$) e para o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi $6 \pm 3 \text{ nmol.L}^{-1}$ (média \pm DP, $n = 4$). Usando células Ramos o K_d do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi $5 \pm 3 \text{ nmol.L}^{-1}$ (média \pm DP, $n = 3$).

$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ mostraram excelente ligação ao receptor, com valores iguais ou próximos ao valor publicado na literatura de 8 nmol.L^{-1} para o Rituximab nativo (Pescovitz, 2006). As curvas de saturação de ligação obtidas foram características de ligação específica de alta afinidade de um ligante ao seu receptor.

5.4.4 Estudos *in vivo*: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$

A biodistribuição do $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi estudada em camundongos fêmeas CD1-foxn1^{nu} com linfoma. Os animais foram sacrificados e dissecados nos tempos de 4, 24 e 48 h após injeção intravenosa do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e nos tempos de 4, 24, 48 e 72 h após injeção intravenosa do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. As TAB. 19 e 20 mostram a porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g) nos órgãos e tecidos analisados. Se comparados com os resultados descritos na literatura para o RTX_{red} marcado com $^{188}\text{Re}(\text{V})$, pode-se afirmar que uma biodistribuição normal de proteína foi observada (Ferro-Flores et al., 2005).

TABELA 19. Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ em camundongo nude contendo linfoma de células Ramos expresso como porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g).

Órgão	%AI/g		
	4 h	24 h	48 h
Sangue	11,0 ± 1,0	2,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
Coração	5,0 ± 1,0	0,9 ± 0,1	0,56 ± 0,04
Pulmão	7,0 ± 1,0	2,0 ± 1,0	0,84 ± 0,04
Baço	3,4 ± 0,3	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,1
Rins	8,0 ± 1,0	3,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4
Estômago	1,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1
Intestino	1,7 ± 0,2	0,53 ± 0,04	0,3 ± 0,1
Fígado	6,0 ± 1,0	2,5 ± 0,2	2,2 ± 0,3
Músculo	0,6 ± 0,1	0,24 ± 0,03	0,16 ± 0,02
Osso	1,4 ± 0,2	0,42 ± 0,03	0,25 ± 0,04
Tumor direito	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,5	0,7 ± 0,2
Tumor esquerdo	1,0 ± 0,2	1,0 ± 1,0	0,8 ± 0,3
Urina	141,0 ± 78,0	10,0 ± 1,0	4,0 ± 2,0

Os valores representam a média ± DP ($n = 4$) da porcentagem de atividade injetada por grama.

TABELA 20. Biodistribuição do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ em camundongo nude contendo linfoma de células Ramos expresso como porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g).

Órgão	%AI/g			
	4 h*	24 h	48 h	72 h
Sangue	15,0 ± 3,0	6,0 ± 0,4	3,5 ± 0,5	3,0 ± 1,0
Coração	6,0 ± 1,0	2,8 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,3
Pulmão	8,0 ± 2,0	4,0 ± 0,5	2,3 ± 0,3	2,0 ± 1,0
Baço	4,0 ± 1,0	3,0 ± 1,0	2,6 ± 0,3	3,0 ± 1,0
Rins	6,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0	4,7 ± 0,5	6,0 ± 1,0
Estômago	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Intestino	1,5 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Fígado	7,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0	2,7 ± 0,5	3,0 ± 1,0
Músculo	0,7 ± 0,1	0,67 ± 0,05	0,42 ± 0,04	0,4 ± 0,1
Osso	1,7 ± 0,3	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2
Tumor direito	1,2 ± 0,3	3,0 ± 1,0	3,0 ± 1,0	2,5 ± 0,4
Tumor esquerdo	1,3 ± 0,4	3,0 ± 1,0	2,2 ± 0,3	3,0 ± 1,0
Urina	5,0 ± 6,0	11,0 ± 8,0	12,0 ± 1,0	8,0 ± 3,0

Os valores representam a média ± DP ($n = 4$ e $n = 3^*$) da porcentagem de atividade injetada por grama.

Algumas diferenças foram observadas entre $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. Em particular, a captação média no tumor (média do tumor de ambos os lados) do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ decresceu de 1,0 %AI/g após 4 h de injeção para 0,7 %AI/g após 48 h, enquanto que para o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ cresceu de 1,2 %AI/g após 4 h para 2,6 %AI/g após 48 h e isso continuou até 72h

(2,7 %Al/g). Uma diferença foi observada nas razões do clareamento das preparações, com o $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ sendo clareado mais rapidamente do que o $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. Os resultados da biodistribuição nas TAB. 19 e 20 não exibem evidência de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ou $^{188}\text{ReO}_4^-$ *in vivo*, o que levaria a uma alta acumulação da radioatividade no estômago.

A máxima acumulação no tumor foi após 4 h ($1,0 \pm 0,2$ %Al/g no tumor direito e $1,0 \pm 0,2$ %Al/g no tumor esquerdo) para ^{99m}Tc e após 24 h ($3,0 \pm 1,0$ %Al/g no tumor direito e $3,0 \pm 1,0$ %Al/g no tumor esquerdo) para ^{188}Re . Acumulação significativa da radioatividade foi encontrada no baço ($3,4 \pm 0,3$ %Al/g e $4,0 \pm 1,0$ %Al/g para ^{99m}Tc e ^{188}Re , 4 h após injeção, respectivamente), rins ($8,0 \pm 1,0$ %Al/g e $6,0 \pm 1,0$ %Al/g para ^{99m}Tc e ^{188}Re , 4 h após injeção, respectivamente) e fígado ($6,0 \pm 1,0$ %Al/g e $7,0 \pm 1,0$ %Al/g para ^{99m}Tc e ^{188}Re , 4h após injeção, respectivamente).

Anticorpos são proteínas relativamente grandes (aproximadamente 150 kDa) com uma longa $T_{1/2}$ circulatória (Boerman & Koppe, 2007). De acordo com os dados apresentados nas TAB. 19 e 20, após 4 h da injeção do anticorpo marcado, a atividade estava principalmente na corrente sanguínea, comportamento correlacionado com o lento clareamento sanguíneo de anticorpos. Jalilian e colaboradores marcaram o anticorpo RTX com o radioisótopo ^{67}Ga e verificaram que nas primeiras 2 horas pós-injeção a atividade também estava localizada principalmente no sangue (Jalilian et al., 2008). Scheidhauer e colaboradores ao injetarem o RTX marcado com ^{131}I em pacientes perceberam que 1 h após injeção, a maior parte da atividade foi vista na corrente sanguínea, delineando o coração, grandes vasos, fígado, baço e rins (Scheidhauer et al., 2002).

Os dados de biodistribuição aqui encontrados também mostram que o estômago, músculo, osso e intestino tiveram baixa captação para os dois compostos, $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. Alta captação no baço foi encontrada e como explicado na literatura é devido a acumulação final dos linfócitos B carregando o radioimunoconjugado até a superfície (Jalilian et al., 2007). Em ambos os casos a radioatividade no fígado decresceu com o passar do tempo mas após 24 h permaneceu retida no mesmo órgão. A radioatividade retida nesses órgãos (fígado e baço, por exemplo) pode ser explicada por dois motivos:

(1) Esses órgãos expressam o antígeno CD20 e (2) Anticorpos são catabolizados vagarosamente por estes órgãos (Boerman & Koppe, 2007). Em tratamento de humanos com ^{131}I -tositumomab ou ^{90}Y -ibritumomab uma dose inicial de anticorpo frio é dada para limpar os linfócitos B CD20⁺ circulantes que estão presentes na circulação sanguínea, otimizando então a biodistribuição e a captação tumoral do anticorpo radiomarcado. Na ausência da limpeza dessas células contendo antígeno, os anticorpos radiomarcados poderiam primeiramente ser localizados em órgãos como pulmão, fígado e baço após se ligarem as células CD20⁺ (Dillman, 2002).

A FIG. 36 mostra os resultados da razão tumor:não-tumor para o sangue, rins, fígado e músculo, nos tempos de 4, 24 e 48 h após injeção do $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. Os valores do tumor do lado esquerdo foram usados para o cálculo.

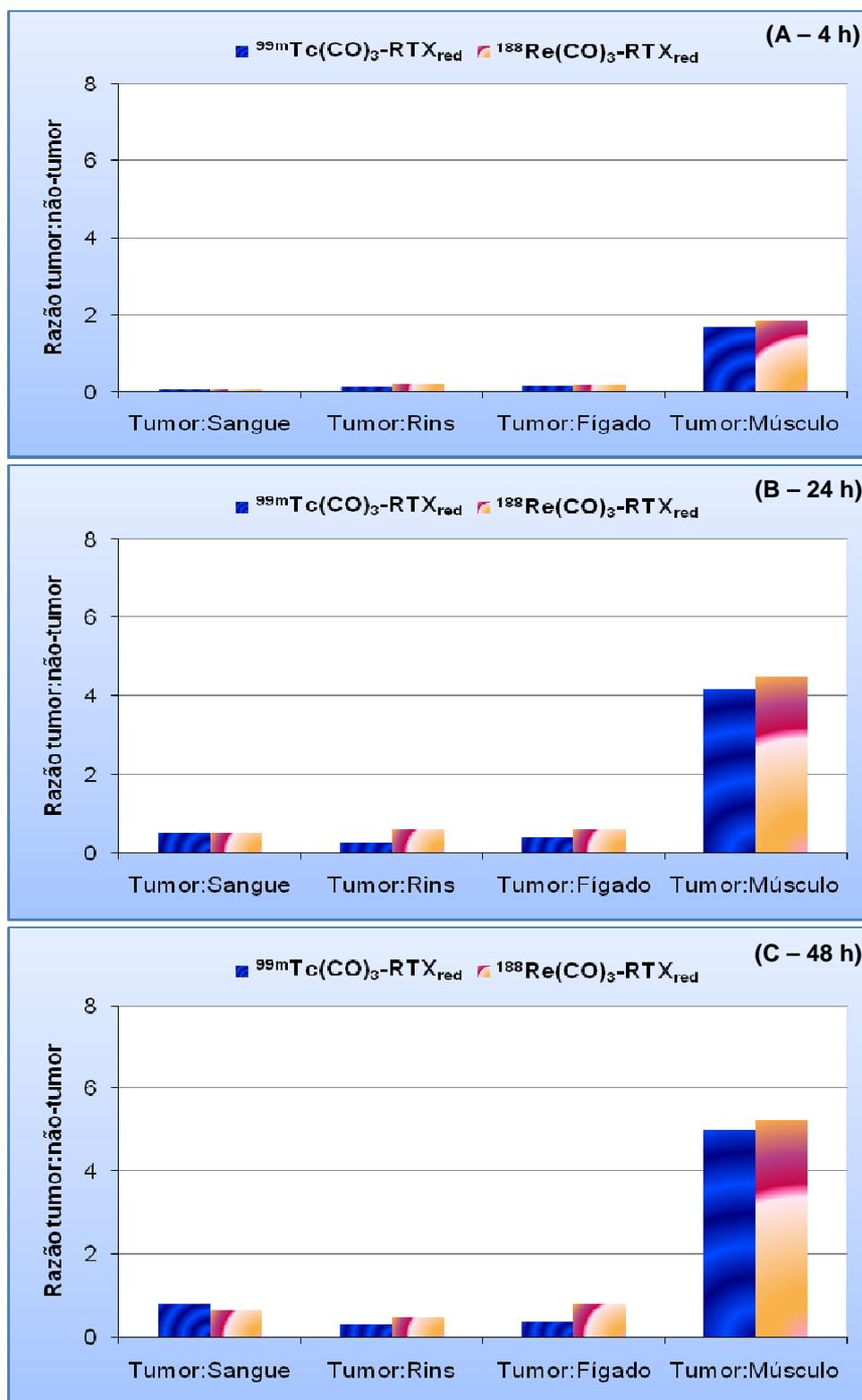


FIGURA 36. Razão tumor:não-tumor calculada para os camundongos nude, com tumor de células Ramos, injetados com $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. As razões foram calculadas para os tempos de 4 h (A), 24 h (B) e 48 h (C) após injeção. Os valores do tumor do lado esquerdo foram usados para o cálculo.

O clareamento da corrente sanguínea levou a uma razão tumor:sangue crescente de 0,1 após 4 h de injeção, para 0,8 após 48 h de injeção, para ^{99m}Tc e de 0,1 após 4 h de injeção, para 1,0 após 72 h de injeção, para ^{188}Re . A relação tumor:músculo foi alta para o RTX_{red} marcado tanto com $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ quanto com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$, sendo que essa alta relação favorece o contraste na obtenção das imagens.

Para aquisição da imagem SPECT, 200 μL da solução de anticorpo marcado da formulação otimizada de $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi injetado em um camundongo $\text{CD1-foxn1}^{\text{nu}}$ previamente inoculado com células Ramos para indução do tumor. O animal foi sacrificado 24 h após injeção do radiofármaco e imediatamente as imagens SPECT/CT foram adquiridas e a reconstrução pode ser vista na FIG. 37.

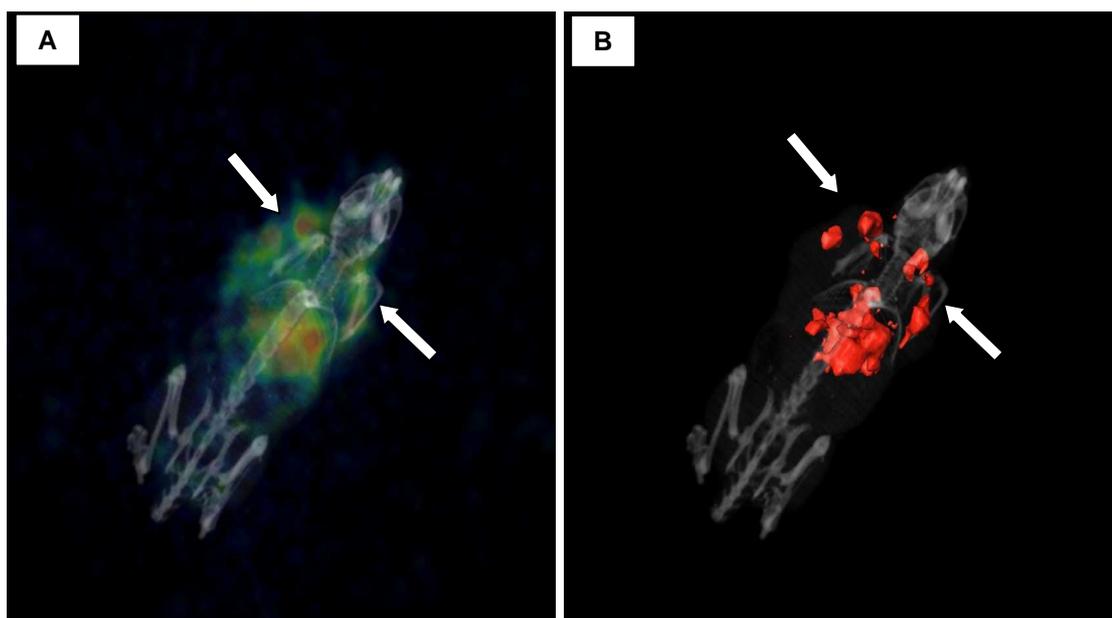


FIGURA 37. Imagem SPECT/CT obtida de um camundongo $\text{CD1-foxn1}^{\text{nu}}$ portador de tumor induzido com células Ramos injetado i.v. com $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. As imagens (A) e (B) correspondem a duas reconstruções diferentes do mesmo animal. As setas brancas indicam a localização do tumor no flanco direito e esquerdo do animal.

O resultado obtido com a imagem SPECT está em concordância com os dados de biodistribuição. Houve captação tumoral, como indicado pelas setas brancas na FIG. 37, mas essa captação não foi homogênea no tecido tumoral. Pode-se visualizar também a captação na região abdominal, correspondente a captação de órgãos como fígado, baço e rins, como mostrado nos dados da

biodistribuição. A resolução espacial das imagens não foi adequada devido a baixa atividade de ^{188}Re injetada.

A medida que foi encontrado sucesso no uso clínico de anticorpos radiomarcados para tratar linfomas de células-B, existem relativamente poucos dados de modelos animais para apoiar este desenvolvimento, especialmente dados da captação específica dos anticorpos nos tumores. Dentre os vários motivos para tal fato, pode ser relatado o crescimento inconsistente de alguns tipos de tumores, tornando difícil a obtenção de um grupo de animais com tumores de tamanho similar. Michel e colaboradores em seus estudos prévios com camundongos nude injetados subcutaneamente com células Ramos mostraram como desvantagem a inconsistência do crescimento deste tipo de tumor, sendo que este modelo tumoral apresentou um crescimento tumoral extremamente rápido bem como uma variação considerável no tamanho do tumor entre os animais. Os autores encontraram uma baixa captação tumoral para o anticorpo 1F5 (que tem uma captação tumoral bem estabelecida) (Michel et al., 2002). Este crescimento rápido também foi observado no presente trabalho, obtendo-se tumores com massas de até 3 g, podendo ser uma possível explicação para a baixa captação tumoral aqui encontrada.

5.4.5 Autoradiografia *ex vivo* e *in vitro*: $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$

Autoradiogramas *ex vivo* das seções tumorais obtidas do animal sacrificado após a injeção do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ mostraram que a radioatividade acumulou-se primariamente na superfície do tumor, todavia alguns pontos de radioatividade foram detectados dentro do tecido tumoral (FIG. 38). Em contraste, quando seções tumorais adjacentes (após o decaimento da radioatividade injetada do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$) foram analisadas *in vitro* pela adição do $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$, foi encontrada uma distribuição homogênea do antígeno CD20 ligado a radioatividade dentro do tecido tumoral e os experimentos de bloqueio com RTX_{nat} frio mostraram um bloqueio completo da ligação do radiomarcado indicando a especificidade do ligante (FIG. 38). Estes achados indicam a acumulação específica da radioatividade-antígeno CD20 no tumor.

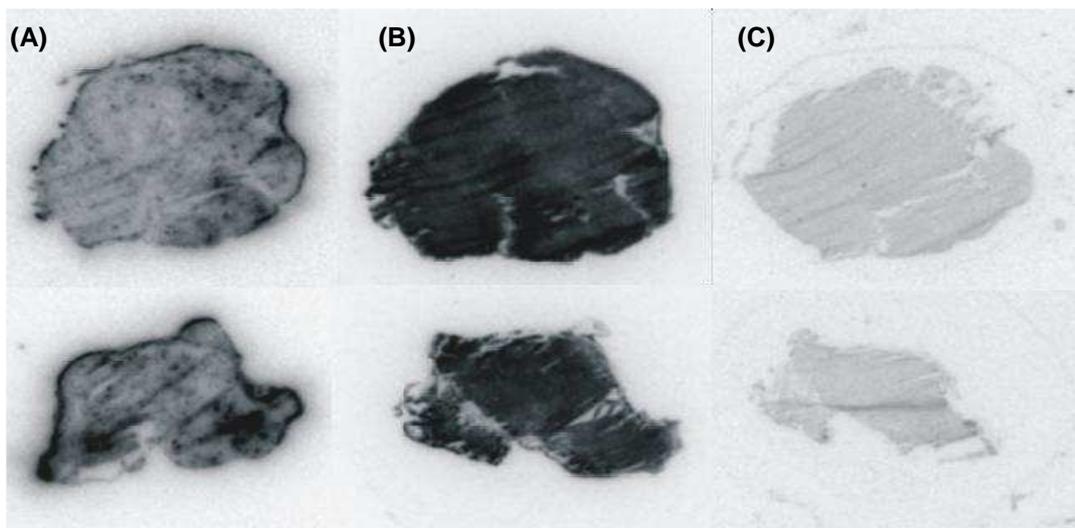


FIGURA 38. Autoradiograma *ex vivo* (A): seção representativa do tumor após injeção do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$. *In vitro*: seções do tumor incubado somente com $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ (B) ou incubado com $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ e excesso de RTX_{nat} para bloqueio do receptor CD20 (C).

5.5 Análise comparativa dos resultados das marcações do anticorpo RTX_{red} com ^{188}Re pelos dois métodos estudados: método direto e via carbonila

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo da marcação do anticorpo Rituximab com ^{188}Re por dois métodos distintos: o método direto e o método via núcleo carbonila. O anticorpo foi usado na sua forma reduzida para os dois casos.

O método direto necessitou do uso de agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), agente transquelante (tartarato) e estabilizante (ácido gentísico), já o método via carbonila requereu apenas a formação do núcleo carbonila para ligação ao anticorpo.

A formulação denominada padrão para o método direto conteve 1 mg de RTX_{red} ; 82,8 mg de tartarato; 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mL de ácido gentísico e 1 mL de ^{188}Re enquanto que para o método via carbonila, conseguiu-se trabalhar com quantidades muito menores, ficando a formulação padrão composta por 250 μg de RTX_{red} e 100 μL de ^{188}Re -carbonila. A diferença no volume de ^{188}Re , seja na forma de perrenato ou na forma de núcleo carbonila acarretou na atividade usada na reação de marcação, sendo as atividades do método direto maiores do que no método via carbonila.

Duas diferenças que influenciaram a reação de marcação foram: temperatura e tempo. Para o método direto, a reação foi de 1 hora em temperatura ambiente, obtendo-se um rendimento de aproximadamente 90%; para o método via carbonila a reação teve que ser de aproximadamente 17 horas a 37°C, obtendo-se um rendimento de aproximadamente 80%, então neste caso foi necessário o uso de purificação pós-marcação. Por essa diferença no tempo, percebeu-se que a reação de complexação do $^{188}\text{Re(V)}$ com o RTX_{red} foi mais rápida do que a do ^{188}Re -carbonila; no entanto de acordo com os resultados de estabilidade da marcação mostrados na FIG. 18 e resultados do tempo de incubação mostrados na FIG. 31 pode-se perceber que esse processo lento de complexação do ^{188}Re -carbonila com o anticorpo favoreceu a estabilidade da marcação em relação ao tempo, comparado à instabilidade da marcação pelo método direto, sendo o principal problema dessa instabilidade, a reoxidação do ^{188}Re e formação da impureza de ^{188}Re livre.

Os dois métodos tiveram comportamentos distintos no desafio a cisteína, sendo que para a mesma concentração de cisteína usada no experimento, 80 mmol.L^{-1} , o RTX_{red} marcado pelo método direto apresentou uma alta porcentagem de dissociação, mais de 80%; enquanto que o RTX_{red} marcado pelo método via carbonila apresentou uma baixa porcentagem de dissociação, menos de 10%, sendo mais estável ao desafio, como pode-se constatar na TAB. 12 e FIG. 33.

De acordo com os resultados dos estudos *in vivo* apresentados como %AI/órgão nas TAB. 13 e 20, observa-se que os órgãos como sangue, baço, fígado e rins tiveram uma maior retenção, em relação ao tempo, do RTX_{red} marcado via carbonila. Órgãos como intestino, estômago, pulmão e coração tiveram captações semelhantes para os dois métodos e a captação no osso e músculo foi baixa nos dois casos. Analisando a captação dos radiofármacos pelo tumor, nota-se que com o passar do tempo a captação do RTX_{red} marcado pelo método direto decresceu; já a captação do RTX_{red} marcado via carbonila manteve-se constante, o que é favorável por proporcionar uma melhor ação do radiofármaco no foco tumoral.

A razão tumor:não-tumor nos dois casos foi expressiva em relação ao músculo e o perfil das imagens foi semelhante, podendo-se visualizar o tumor

com uma discreta captação e observando-se uma alta atividade localizada na região abdominal, como demonstrado nas FIG. 24 e 37.

Comparando a marcação do RTX_{red} observa-se que os resultados obtidos foram satisfatórios e encorajadores para futuras aplicações dos dois métodos usados: método direto e via carbonila. Se forem levadas em conta a estabilidade do radiofármaco e a manutenção da captação no tumor, o método da carbonila parece ser mais adequado produzindo um radiofármaco com melhor comportamento biológico.

6. CONCLUSÕES

A marcação do AcM quimérico Rituximab com o radioisótopo ^{188}Re foi estudada com êxito usando duas técnicas: o bem estabelecido método direto de marcação e o inédito método via carbonila.

O objetivo de se obter as formulações otimizadas para os dois métodos foi alcançado, sendo elas:

- ◆ Método direto [$^{188}\text{Re(V)}$]: 1 mg de RTX_{red} ; 82,8 mg de tartarato; 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,25 mg de ácido gentísico, 1 mL de ^{188}Re e 1 h de reação a temperatura ambiente.
- ◆ Método via carbonila [$^{188}\text{Re(I)}$]: 250 μg de RTX_{red} ; 100 μL de $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$, 17h de incubação, reação a 37 $^\circ\text{C}$ e purificação pós- marcação.

Um rendimento de marcação acima de 90% foi obtido para o método direto ao passo que para o método via carbonila, a purificação pós-marcação foi eficiente, obtendo uma pureza radioquímica de 100%.

Especificamente do lado experimental destacam-se:

1. A redução do anticorpo foi eficiente, com uma boa porcentagem de recuperação da proteína reduzida.
2. O número de grupos $-\text{SH}$ após a redução foi satisfatório, comprovando sua importância no processo de marcação não só para o método direto como também no método via carbonila, mostrando ser uma possível via para realizar a marcação usando o núcleo $\text{M}(\text{CO})_3$ ($\text{M} = {}^{99\text{m}}\text{Tc}, {}^{188}\text{Re}$).
3. A marcação do RTX (nativo e reduzido) via carbonila com o radioisótopo ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi de suma importância como modelo para o radioisótopo ^{188}Re .
4. A formação do composto ${}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$ foi mais rápida do que o ${}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-RTX}_{\text{red}}$, que por sua vez mostrou melhor estabilidade em plasma humano e nenhuma transquelação no desafio a histidina ou cisteína.
5. Os dois compostos mostraram boa afinidade de ligação e uma biodistribuição em camundongos portadores de tumor coerente com a biodistribuição normal do

anticorpo e razoável captação no tumor provando a eficiência do método de marcação e potencial uso clínico.

6. Os modelos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* utilizados neste trabalho foram importantes para a avaliação do comportamento biológico e bioquímico do AcM radiomarcado.

7. Um aprimoramento necessário em futuros trabalhos é a escolha do modelo tumoral com células que promovam um crescimento mais controlado do tumor.

Este trabalho foi o primeiro passo para a disponibilização de um radiofármaco para terapia de LNH utilizando um radioisótopo, o ^{188}Re , de grande potencial para uso em oncologia. Os próximos passos serão os estudos pré-clínicos com este radiofármaco, já de interesse da classe médica brasileira.

ANEXO - Cromatografia: análise radioquímica do RTX radiomarcado

A ineficiência nos processos de marcação pode dar origem a impurezas radioquímicas. A pureza radioquímica pode ser definida como a fração da radioatividade total na forma química desejada presente no radiofármaco. Estas impurezas podem ser causadas por decomposição do radiofármaco por ação do solvente utilizado, temperatura, luz, radiólise ou marcação de uma impureza com o mesmo radionuclídeo (Oliveira et al., 2006). A presença deste tipo de impureza (radioquímica) pode ocasionar padrões de biodistribuição diferentes ao esperado, produzindo em consequência: diminuição da qualidade da imagem, aumento da dose absorvida pelo paciente e dificuldades na interpretação diagnóstica, por isso sua determinação é de suma importância. Além disso, a radiomarcagem pode causar alterações significativas nas propriedades biológicas e imunológicas na molécula do anticorpo (Dias, 2005).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Degani et al., 1998).

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios, sendo alguns deles listados abaixo (Degani et al., 1998):

1. Classificação pela forma física do sistema cromatográfico

Em relação à forma física do sistema, a cromatografia pode ser subdividida em *cromatografia em coluna* e *cromatografia planar*. A cromatografia planar resume-se à cromatografia em papel (CP), à cromatografia por centrifugação (Chromatotron) e à cromatografia em camada delgada (CCD). A cromatografia em coluna pode ser classificada como cromatografia líquida, gasosa ou supercrítica.

2. Classificação pela fase móvel empregada

Em se tratando da fase móvel, são três os tipos de cromatografia: a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida e a cromatografia supercrítica (CSC), usando-se na última um vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica. A cromatografia líquida apresenta uma importante subdivisão: a cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. A CLAE foi inicialmente denominada cromatografia líquida de alta pressão, mas sua atual designação mostra-se mais adequada. No caso de fases móveis gasosas, separações podem ser obtidas por cromatografia gasosa (CG) e por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). A diferença entre os dois tipos está na coluna. Enquanto na CGAR são utilizadas colunas capilares, nas quais a fase estacionária é um filme depositado na mesma, a CG utiliza colunas de maior diâmetro empacotadas com a fase estacionária.

3. Classificação pela fase estacionária utilizada

Quanto à fase estacionária, distingue-se entre fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar simplesmente adsorvido sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre ele. Suportes modificados são considerados separadamente, como fases quimicamente ligadas, por normalmente diferirem dos outros dois em seus mecanismos de separação.

4. Classificação pelo modo de separação

Por este critério, separações cromatográficas se devem à adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou misturas desses mecanismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAM, U.; ALBERTO, R. Technetium and rhenium – coordination chemistry and nuclear medical applications. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 8, p. 1486 – 1500, 2006.

ALBERTO, R. $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ chemistry: a promising new concept for SPET?. **Eur. J. Nucl. Med. Imaging**, v. 30, p. 1299 – 1302, 2003.

ALBERTO, R. The particular role of radiopharmacy within bioorganometallic chemistry. **J. Organometallic Chem.**, v. 692, p. 1179 – 1186, 2007.

ALBERTO, R.; ORTNER, K.; WHEATLEY, N.; SCHIBLI, R.; SCHUBIGER, A.P. Synthesis and properties of boranocarbonate: A convenient in situ CO source for the aqueous preparation of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 123, p. 3135 – 3136, 2001.

ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, A.P. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 7987 – 7988, 1998.

ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; SCHUBIGER, A.P. First application of *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ in bioorganometallic chemistry: design, structure, and in vitro affinity of a 5-HT_{1A} receptor ligand labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, p. 6076 – 6077, 1999.

ALLEN, T. M. Ligand-Targeted therapeutics in anticancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 750 – 763, 2002.

ÁLVAREZ, M.G.; FERNÁNDEZ, M.C.S.; MESEGUER, M.R.N.; PÉREZ, B.S.; FRANCO, R.C.; BLÁZQUEZ, B.S.; GIL, E.C.; GARCÍA, J.M.H. Linfomas primarios de mama. Presentación de nuestra casuística y revisión de la literatura científica. **Prog. Obste. Ginecol.**, v. 51, p. 47 – 52, 2008.

AMANN, A.; DECRISTOFORO, C.; OTT, I.; WENGER, M.; BADER, D.; ALBERTO, R.; PUTZ, G. Surfactant protein B labelled with $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ retains biological activity *in vitro*. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28, p. 243 – 250, 2001.

ANTIBODY PRODUCTION TECHNICAL HANDBOOK. JUNE 2009. Produced by Thermo Fisher Scientific. Disponível em: <http://www.piercenet.com/files/1601671_AntibodyHB_intl.pdf>. Acesso em: 06 Nov. 2008.

BANERJEE, S.; PILLAI, M.R.A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceutical. **Semin. Nucl. Med.**, v. 31, n. 4, p. 266 – 277, 2001.

BIECHLIN, M.L.; BONMARTIN, A.; GILLY, F.N.; FRAYSSE, M.; D'HARDEMARE, A.M. Radiolabeling of annexin A5 with ^{99m}Tc : comparison of HYNIC-Tc vs. iminothiolane-Tc-tricarbonyl conjugates. **Nucl. Med. Biol.**, v. 35, p. 679 – 687, 2008.

BIENERT, M.; REISINGER, I.; SROCK, S.; HUMPLIK, B.I.; REIM, C.; KROESSIN, T.; AVRIL, N.; PEZZUTTO, A.; MUNZ, D.L. Radioimmunotherapy using ^{131}I -rituximab in patients with advanced stage B-cell non-Hodgkin's lymphoma: initial experience. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v. 32, p. 1225 – 1233, 2005.

BOERMAN, O.C.; KOPPE, M. J.; POSTERNA, E.J.; CORSTENS, F.H.; OYEN, W.J. Radionuclide therapy of cancer with radiolabeled antibodies. **Anti-Cancer Agents in Med. Chem.**, v. 7, p. 335 – 343, 2007.

BOSCHI, A.; BOLZATI, C.; UCCELLI, L.; DUATTI, A. High-yield synthesis of the terminal $^{188}\text{Re}\equiv\text{N}$ multiple bond from generator-produced $[\text{}^{188}\text{ReO}_4]^-$. **Nucl. Med. Biol.**, v. 30, p. 381-387, 2003.

BOSWELL, C.A.; BRECHBIEL, M.W. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. **Nucl. Med. Biol.**, v. 34, p. 757-778, 2007.

BRITTON, K.E. Nuclear Medicine, state of the art and science. **Radiography**, v. 1, p. 13 - 27, 1995.

CARTER, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, p. 118 – 129, 2001.

CARTER, P. J. Potent antibody therapeutics by design. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 343 – 357, 2006.

CARTRON, G.; WATIER, H.; GOLAY, J.; SOLAL-CELIGNY, P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. **Blood**, v. 104, p. 2635 – 2642, 2004.

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

CHATAL, J.F.; HOEFNAGEL, C.A. Radionuclide Therapy. **Lancet**, v. 354, p. 931 – 935, 1999.

CHEN, K.T.; LEE, T.W.; LO, J.M. In vivo examination of $^{188}\text{Re}(\text{I})$ -tricarbonyl-labeled trastuzumab to target HER2-overexpressing breast cancer. **Nucl. Med. Biol.**, v. 36, p. 355 – 361, 2009.

CHEN, L.C.; CHANG, C.H.; Yu, C.Y.; CHANG, Y.J.; WU, Y.H.; LEE, W.C.; YEH, C.H.; LEE, T.W.; TING, G. Pharmacokinetics, micro-SPECT/CT imaging and therapeutic efficacy of ^{188}Re -DXR-liposome in C26 colon carcinoma ascites mice model. **Nucl. Med. Biol.**, v. 35, p. 883 – 893, 2008.

CHEN, W.J.; YEN, C.L.; LO, S.T.; CHEN, K.T.; LO, J.M. Direct $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labeling of Herceptin (trastuzumab) by $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ tricarbonyl ion. **Appl. Rad. Isot.**, v. 66, p. 340 – 345, 2008.

CHINN, P.; BRASLAWSKY, G.; WHITE, C.; HANNA, N. Antibody therapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 52, p. 257 – 280, 2003.

CRUDO, J.L.; EDREIRA, M.M.; OBENAU, E.R.; CHINOL, M.; PAGANELLI, G.; de CASTIGLIA, S.G. Optimization of antibody labeling with rhenium-188 using a pre-labeled MAG3 chelate. **Int. J. Pharm.**, v. 248, p. 173 - 182, 2002.

DADACHOVA, E.; MIRZADEH, S. The role of tin in the direct labelling of proteins with rhenium-188. **Nucl. Med. Biol.**, v. 24, n. 6, p. 605 – 608, 1997.

DE DECKER, M.; BACHER, K.; THIERENS, H.; SLEGGERS, G.; DIERCKX, R.A.; DE VOS, F. In vitro and in vivo evaluation of direct rhenium-188-labeled anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab for radioimmunotherapy of B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Nucl. Med. Biol.**, v. 35, p. 599 – 604, 2008.

DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. Química Nova na Escola. **Cromatografia**, v. 7, p. 21 – 25, 1998.

DENARDO, G.L. Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) with radiolabeled antibodies (mAbs). **Semin. Nucl. Med.**, v. 35, p. 202 – 211, 2005.

DEUPREE, J.D.; BYLUND, D.B. Basic principles and techniques for receptor binding, 2002. Disponível em <www.tocris.com/pdfs/radiochemrev.pdf> Acesso em: 16 out. 2008.

DIAS, C.R.B.R. **Estudo de marcação dos anticorpos monoclonais IOR-CEA-1 e IOR-EGF/R3 com $^{99\text{m}}\text{Tc}$** . 2005. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

DILLMAN, R.O. Radiolabeled Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for the Treatment of B-Cell Lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 16, p. 3545 – 3557, 2002.

DJAVANMARDI, L.; OPREAN, N.; ALANTAR, A.; BOUSETTA, K.; PRINC, G. Malignant non-Hodgkin's lymphoma (NHL) of the jaws: A review of 16 cases. **J. Cranio-Maxillofacial Surg.**, v. 36, p. 410 – 414, 2008.

ECKELMAN, W.C.; PAIK, C.H.; STEIGMAN, J. Three approaches to radiolabeling antibodies with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. **Nucl. Med. Biol.**, v. 16, n. 2, p. 171 – 176, 1989.

ECKELMAN, W.C.; STEIGMAN, J. Direct labeling with ^{99m}Tc . *Nucl. Med. Biol.*, v. 18, p. 3 – 7, 1991.

EGLI, A.; ALBERTO, R.; TANNATOLI, L.; SCHIBLI, R.; ABRAM, U.; SCHAFFLAND, A.; WAIBEL, R.; TOURWÉ, D.; JEANNIN, L.; ITERBEKE, K.; SCHUBIGER, P.A. Organometallic ^{99m}Tc -Aquaion Labels Peptide to an Unprecedented High Specific Activity. *J. Nuc. Med.*, v. 40, p. 1913 – 1917, 1999.

EISENBERG, R.; LOONEY, R.J. The therapeutic potential of anti-CD20. What do B-cells do?. *Clinical Immunol.*, 117: 207 – 213, 2005.

EL-MABHOUH, A.A.; MERCER, J.R. ^{188}Re -labelled gemcitabine/bisphosphonate (Gem/BP): a multi-functional, bone-specific agent as a potential treatment for bone metastases. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 35, p. 1240 – 1248, 2008.

FAINTUCH, B.L.; FAINTUCH, S.; MURAMOTO, E. Preparation and evaluation of two ^{188}Re -radiopharmaceuticals for endovascular irradiation. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 260, n. 2, p. 363 – 368, 2004.

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

FERRO-FLORES, G.; ARTEAGA DE MURPHY, C. Pharmacokinetics and dosimetry of ^{188}Re -pharmaceuticals. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 60, p. 1389 – 1401, 2008.

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

FERRO-FLORES, G.; TORRES-GARCÍA, E.; GARCÍA-PEDROZA, L.; MURPHY, C.A.; PEDRAZA-LÓPEZ, M.; GARNICA-GARZA, H. An efficient, reproducible and fast preparation of ^{188}Re -anti-CD20 for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Nucl. Med. Comm.*, v. 26, p. 793 – 799, 2005.

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

GARCÍA-GARAYOVA, E.; SCHIBLI, R.; SCHUBIGUER, P.A. Peptides radiolabeled with Re-186/188 and Tc-99m as potential diagnostic and therapeutic agents. *Nucl. Sci. Techniq.*, v. 18, n. 2, p. 88 – 100, 2007.

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

GMEINER STOPAR, T.; FETTICH, J.; ZVER, S.; MLINARIC-RASCAN, I.; HOJKER, S.; SOCAN, A.; PEITL, P.K.; MATHER, S. ^{99m}Tc-labelled rituximab, a new non-Hodkin's lymphoma imaging agent: first clinical experience. **Nucl. Med. Comm.**, v. 29, p. 1059 – 1065, 2008.

GMEINER STOPAR, T.; MLINARIC-RASCAN, I.; FETTICH, J.; HOJKER, S.; MATHER, S.J. ^{99m}Tc-rituximab radiolabelled by photo-activation: a new non-Hodgkin's lymphoma imaging agent. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v. 33, p. 53 – 59, 2006.

GODING, J.W. **Monoclonal antibodies: Principle and Practice**. San Diego, C.A.: Academic, 1986.

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

GÜRCAN, H.M.; KESKIN, D.B.; STERN, J.N.H.; NITZBERG, M.A.; SHEKHANI, H.; AHMED, A.R. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. **Int. Immunopharm.**, v. 9, p. 10 – 25, 2009.

HAMOUDEH, M.; KAMLEH, M.A.; DIAB, R.; FESSI, H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 1329 – 1346, 2008.

HERNANDEZ, M.C.; KNOX, S.J. Radiobiology of Radioimmunotherapy: Targeting CD20 B-cell antigen in Non-Hodgkin's Lymphoma. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 59, n. 5, p. 1274–1287, 2004.

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

IMAI, K.; TAKAOKA, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 714 – 727, 2006.

IZNAGA-ESCOBAR, N. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with rhenium-188 for radioimmunotherapy of solid tumors – a review of radiolabeling characteristics, quality control and in vitro stability studies. **Appl. Rad. Isot.**, v. 54, p. 399 – 406, 2001.

JALILIAN, A.R.; MIRSADEGHI, L.; HAJI-HOSSEINI, R.; KHORRAMI, A. Preparation, quality control and biodistribution studies of [⁶⁷Ga]-DOTA-anti-CD20. **Radiochim. Acta**, v. 96, p. 167 – 174, 2008.

JALILIAN, A.R.; MIRSADEGHI, L.; YARI-KAMRANI, Y.; ROWSHANFARZAD, P.; KAMALI-DEHGHAN, M.; SABET, M. Development of [^{64}Cu]-DOTA-anti-CD20 for targeted therapy. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 274, n. 3, p. 563 – 568, 2007.

JEONG, J.M.; KNAPP, R. F.F. Jr. Use of the Oak Ridge National Laboratory Tungsten-188/Rhenium-188 generator for preparation of the Rhenium-188 HDD/Lipiodol complex for trans-arterial liver cancer therapy. *Sem. Nucl. Med.*, v. 38, p. S19 – S29, 2008.

JEONG, J.M.; LEE, J.; PAIK, C.H.; KIM, D.K.; LEE, D.S.; CHUNG, J.K.; LEE, M.C. Site-specific $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeling of antibody using dihydrazinophthalazine (DHZ) conjugation to Fc region of heavy chain. *Arch. Pharm. Res.*, v. 27, n. 9, p. 961 – 967, 2004.

JUNNOTULA, S. *Rhenium complexes with O, N, S ligands*. 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculty of the Graduate School University of Missouri-Columbia.

KEENAN, A.M.; HARBET, J.C.; LARSON, S.M. Monoclonal antibodies in Nuclear Medicine. *J. Nucl. Med.*, v. 26, p. 531 - 537, 1985.

KENAKIN, T.P. *A pharmacology primer: theory, applications and methods*. San Diego, C.A.: Academic, 2006.

KODINA, G.E.; MALYSHEVA, A.O.; KLEMENT'EVA, O.E.; INKIN, A.A.; GORSHKOV, N.I.; LUMPOV, A.A.; SUGLOBOV, D.N. Mechanism of carbonylation reactions of technetium-99m. *J. Nucl. Radioch. Sciences*, v. 6, n. 3, p. 183 – 185, 2005.

KOTHARI, K.; PRASAD, S.; KORDE, A.; MUKHERJEE, A.; MATHUR, A.; JAGGI, M.; VENKATESH, M.; PILLAI, A.M.R.; MUKHERJEE, R.; RAMAMOORTHY, N. $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-VIP}$ analogues: Preparation and evaluation as tumor imaging agent. *Appl. Rad. Isot.*, v. 65, p. 382 – 386, 2007.

KYPRIANIDOU, P.; TSOUKALAS, C.; PATSIS, G.; PAPAGIANNPOULOU, D.; NIKOLIĆ, N.; JANKOVIĆ, D.; DJOKIĆ, D.; RAPTOPOULOU, C.P.; PELECANOU, M.; PAPADOPOULOS, M.; PIRMETTIS, I. Rhenium(I) and technetium-99m(I) *fac*-tricarbonyl complexes with 4-(imidazolin-2-yl)-3-thiabutanoic acid derivatives as tridentate ligands: Synthesis and structural characterization. *Polyhedron*, v. 28, n. 15, p. 3171 – 3176, 2009.

LAZAROVA N.; BABICH J.; VALLIANT J.; SCHAFFER P.; JAMES S.; ZUBIETA J. Thioland thioether-based bifunctional chelates for the $\{\text{M}(\text{CO})_3\}^+$ core (M=Tc, Re). *Inorg. Chem.*, v. 44, p. 6763 – 6770, 2005.

LEYVA, R.; HERNÁNDEZ GONAZÁLEZ, I.; ZAMORA BARRABÍ, M.; BECKFORD VERA, D. ^{188}Re -labelled anti-CD20 monoclonal antibody: Labelling and quality control studies. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRENDS IN RADIOPHARMACEUTICALS, November 14 – 18, 2005, Vienna. **Proceedings**...Vienna: IAEA, 2005. p. 311 – 312.

LINDMO, T.; BOVEN, E.; CUTTITA, F.; FEDORKO, J.; BUNN, P.A. Jr. Determination of the Immunoreactive Fraction of Radiolabeled Monoclonal Antibodies by Linear Extrapolation to Binding at Infinite Antigen Excess. **J. Immunol. Methods**, v. 72, p. 77 – 89, 1984.

LIU, G.; DUO, S.; HE, J.; YIN, D.; GUOTA, S.; ZHANG, S.; WANG, Y.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D.J. Radiolabeling of MAG_3 -morpholino oligomers with ^{188}Re at high labeling efficiency and specific radioactivity for tumor pretargeting. **Appl. Rad. Isot.**, v. 64, p. 971 – 978, 2006.

LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 1347-1370, 2008.

LIU, S.; Edwards, D.S. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2235 – 2268, 1999.

LUO, T.Y.; TANG, I.C.; WU, Y.L.; HSU, K.L.; LIU, S.W.; KUNG, H.C.; LAI, P.S.; LIN, W.J. Evaluating the potential of ^{188}Re -SOCTA–trastuzumab as a new radioimmunoagent for breast cancer treatment. **Nucl. Med. Biol.**, v. 36, p. 81 – 88, 2009.

MACKLIS, R.M. Radioimmunotherapy as a Therapeutic Option for Non-Hodgkin's Lymphoma. **Semin. Radiat. Oncol.**, v. 17, p. 176 - 183, 2007.

MALIK, V.S.; LILLEHOJ, E.P. **Antibody techniques**. San Diego, C.A.: Academic, 1994.

MARCZEWSKI, B.S. **Estudos de marcação do etidronato com ^{188}Re proveniente de diferentes geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$** . 2006. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MARQUES, A.J.L. **Estudo da Incorporação de Subunidades Durante a Montagem do Proteossoma 20S**. 2001. Monografia (TCC). Universidade do Algarve, Faro.

MARQUES, C.H. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MATTES, M.J. Limitations of the Lindmo method in determining antibody immunoreactivity. **Int. J. Cancer**, v. 61, p. 286 – 288, 1995.

MEASE, R.C.; LAMBERT, C. Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m. **Semin. Nucl. Med.**, v. 34, n. 4, p. 278 – 285, 2001.

MICHEL, R.B.; MATTES, M.J. Intracellular Accumulation of the Anti-CD20 Antibody 1F5 in B-Lymphoma Cells. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, p. 2701 – 2713, 2002.

MIEDERER, M.; SCHEINBERG, D.A.; MCDEVITT, M.R. Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 1371–1382, 2008.

MILENIC, D.E.; BRADY, E.D.; BRECHBIEL, M.W. Antibody-targeted radiation cancer therapy. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 488 – 498, 2004.

MOUSTAPHA, M.E.; EHRHARDT, G.J.; SMITH, C.J.; SZAJEK, L.P.; ECKELMAN, W.C.; JURISSON, S.S. Preparation of cyclotron-produced ^{186}Re and comparison with reactor-produced ^{186}Re and generator-produced ^{188}Re for the labeling of bombesin. **Nucl. Med. Biol.**, v. 33, p. 81 - 89, 2006.

MÜLLER, C.; SCHUBIGER, P.A.; SCHIBLI, R. Isostructural folate conjugates radiolabeled with the matched pair $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$: a potential strategy for diagnosis and therapy of folate receptor-positive tumors. **Nucl. Med. Biol.**, v. 34, p. 595 – 601, 2007.

MURRAY, A.; SIMMS, M.S.; SCHOLFIELD, D.P.; VINCENT, R.M.; DENTON, G.; BISHOP, M.C.; PRICE, M.R.; PERKINS, A.C. Production and Characterization of ^{188}Re -C595 Antibody for Radioimmunotherapy of Transitional Cell Bladder Cancer. **J. Nucl. Med.**, v. 42, p. 726 – 732, 2001.

MUSHTAQ, A. Preparation of high specific-volume solutions of technetium-99m and rhenium-188. **Appl. Rad. Isot.**, v. 58, p. 309 – 314, 2003.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Braz. J. Pharm. Sciences**, v. 42, n. 2, p. 151 – 165, 2006.

OLIVER, Y.P.; ROBLES, A.M.; TRINIDADE, V.; CABRAL, G.P.; TORTAROLO, V.; NAPPA, A.; RODRIGUEZ, G.; BALTER, H.S. Labelling and biological valuation of anti-CD-20 for treatment of non-Hodgkin's lymphoma. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRENDS IN RADIOPHARMACEUTICALS, November 14 – 18, 2005, Vienna. **Proceedings**...Vienna: IAEA, 2005. p. 78 – 79.

OLIVIER, P. Nuclear oncology, a fast growing field of nuclear medicine. **Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A**, v. 527, p. 4 – 8, 2004.

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

PAPATHANASSIOU, D.; LIEHN, J.C. The growing development of multimodality imaging in oncology. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v. 68, p. 60 – 65, 2008.

PARK, S.H.; SEIFERT, S.; PIETZSCH, H.J. Novel and efficient preparation of precursor $[^{188}\text{Re}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ for the labeling of biomolecules. *Bioconjugate Chem.*, v. 17, p. 223 – 225, 2006.

PERERA, A.; LEYVA, R.; GAMBOA, R.; ALBERDI, L.; CASTILLO, A.X. Marcaje del anticuerpo monoclonal humanizado H-R3 con ^{188}Re . *Nucleus*, n.3, p. 64 – 68, 2003.

PESCOVITZ, M.D. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am. J. Transpl.*, v. 6, p. 859 – 866, 2006.

PONSARD, B.; HILTUNEN, J.; PENTILLA, P.; VERA RUIZ, H.; BEETS, A.L.; MIRZADEH, S.; KNAPP Jr., F.F.R. The tungsten-188/rhenium-188 generator: Effective coordination of tungsten-188 production between the HFIR and BR2 reactors. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 257, p. 169-174, 2003.

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

ROBINSON, M.K.; WEINER, L.M.; ADAMS, G.P. Improving monoclonal antibodies for cancer therapy. *Drug Development Res.*, v. 61, p. 172 – 187, 2004.

SAIDI, M.; SEIFERT, S.; KRETZSCHMAR, M.; BERGMANN, R.; PIETZSCH, H.J. Cyclopentadienyl tricarbonyl complexes of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ for the in vivo imaging of the serotonin 5-HT_{1A} receptor in the brain. *J. Organometallic Chem.*, v. 689, p. 4739 – 4744, 2004.

SAILEROVA, E.; BILLINGHURST, M.W. A study of factors affecting the labeling of tartrate with ^{188}Re and the transchelation of the ^{188}Re from the tartrate to a protein. *Appl. Rad. Isot.*, v. 59, p. 311 – 319, 2003.

SASAKI, Y. Recent progress in the chemistry of rhenium cluster complexes and its relevance to the prospect of corresponding technetium chemistry. *J. Nucl. Radioch. Sciences*, v. 6, n. 3, p. 145 - 148, 2005.

SCHEIDHAUER, K.; WOLF, I.; BAUMGARTI, H.J.; VON SCHILLING, C.; SCHMIDT, B.; REIDEL, G.; PESCHEL, C.; SCHWAIGER, M. Biodistribution and kinetics of ^{131}I -labeled anti-CD20 MAB IDEC-C2B8 (rituximab) in relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 1276 – 1282, 2002.

SCHEINFELD, N. A Review of Rituximab in Cutaneous Medicine. *Dermatol Online J*, Califórnia, v. 12, 2006. Disponível em: <<http://dermatology-s10.cdlib.org/121/reviews/rituxab/scheinfeld.html>>. Acesso em: 03 fev. 2009.

SCHIBLI, R.; LA BELLA, R.; ALBERTO, R.; GARCÍA-GARAYOVA, E.; ORTNER, K.; ABRAM, U.; SCHUBIGER, P.A. Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbonyl complexes: A hint for the future functionalization of biomolecules. *Bioconjugate Chem.*, v. 11, n. 3, p. 345 – 351, 2000.

SCHIBLI, R.; SCHAWARZBACH, R.; ALBERTO, R.; ORTNER, K.; SCHMALLE, H.; DUMAS, C.; EGLI, A.; SCHUBIGER, P.A. Steps toward high specific activity labeling of biomolecules for therapeutic application: preparation of precursor $[\text{}^{188}\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ and synthesis of tailor-made bifunctional ligand systems. *Bioconjugate Chem.*, v. 13, p. 750 – 756, 2002.

SCHMIDT, P.F.; SMITH, S.V.; BUNDESEN, P.G. ^{188}Re DD-3B6/22 Fab' for use in therapy of ovarian cancer: labeling and animal studies. *Nucl. Med. Biol.*, v. 25, p. 639 – 649, 1998.

SHARKEY, R.M.; GOLDENBERG, D.M. Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 60, p. 1407–1420, 2008.

Site 1 <www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=458>. Acesso em : 08 jul. 2009.

Site 2 <www.linfoma.com.pt>. Acesso em : 15 jul. 2009.

Site 3 <http://pt.wikipedia.org/wiki/C%C3%a9lula_exterminadora_natural>. Acesso em : 22 jul. 2009.

Site 4
<<http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=comentarios.asp&ID=8>>. Acesso em : 16 set. 2009.

Site 5
<www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/linfoma_ao_hodgkin>. Acesso em: 23 set. 2009.

Site 6 <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Imunoglobulina>>. Acesso em: 12 set. 2009.

Site 7 <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cromatografia>>. Acesso em: 21 out. 2009.

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

STEIGMAN, J.; WILLIAMS, H.P.; SOLOMON, N.A. The importance of the protein sulphhydryl group in HSA labeling with ^{99m}Tc . *J. Nucl. Med.*, v. 16, p. 573, 1975.

STERN, M.; HERRMANN, R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 54, p. 11 - 29, 2005.

TORRES-GARCÍA, E.; FERRO-FLORES, G.; ARTEAGA DE MURPHY, C.; CORREA-GONZÁLEZ, L.; PICHARDO-ROMERO, P.A. Biokinetics and Dosimetry of ^{188}Re -anti-CD20 in Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma: Preliminary Experience. **Arch. Med. Res.**, v. 39, p. 100 – 109, 2008.

ULRICH, H.; COLLI, W.; HO, P.L.; FARIA, M.; TRUJILLO, C.A. **Bases moleculares da biotecnologia**. São Paulo, S.P.: Roca, 2008.

VAN DER VAART, M.G.; MEERWALDT, R.; SLART, R.H.J.A.; VAN DAM, G.M.; TIO, R.A.; ZEEBREGTS, C.J. Application of PET/SPECT Imaging in Vascular Disease. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 35, p. 507 – 513, 2008.

VOLKERT, W.A.; HOFFMAN, T.J. Therapeutic radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2269 – 2292, 1999.

VUČINA, J.; LUKIĆ, D. Radionuclidic generators for the production of technetium-99m and rhenium-188. **Phys., Chem. and Technol.**, v. 2, n. 4, p. 235 – 243, 2002.

WAIBEL, R.; ALBERTO, R.; WILLUDA, J.; FINNERN, R.; SCHIBLI, R.; STICHELBERG, A.; EGLI, A.; ABRAM, U.; MACH, J.P.; PLÜCKTHUN, A.; SCHUBIGER, P.A. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. **Nature Biotechnol.**, v. 17, p. 897 – 901, 1999.

WOOD, A.M. Rituximab: An innovative therapy for Non-Hodgkin's Lymphoma. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v. 58, n.3, p. 215 – 232, 2001.

WUNDERLICH, G.; HARTMANN, H.; ANDREEFF, M.; KOTZERKE, J. A semi-automated system for concentration of rhenium-188 for radiopharmaceutical applications. **Appl. Rad. Isot.**, v. 66, p. 1876 – 1880, 2008.

XIANGYUN, W.; YONGHUI, W.; YUANFANG, L. Radiopharmaceutical chemistry in Peking University (PKU). **J. Nucl. Radiochem. Sciences**, v. 1, p. 15 – 18, 2000.

YU, J.; HÄFELI, U.O.; XIA, J.; LI, S.; DONG, M.; YIN, D.; WANG, Y. Radiolabeling of poly(histidine) derivatized biodegradable microspheres with the ^{188}Re tricarbonyl complex $[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. **Nucl. Med. Comm.**, v. 26, p. 453 – 458, 2005.