INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DE MARCAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-
PBP2a COM ^{99m}Tc**

JANIO DA SILVA MORORÓ

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

Orientador:

Dr. João Alberto Osso Júnior

SÃO PAULO

2012

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESTUDO DE MARCAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-
PBP2a COM ^{99m}Tc

JANIO DA SILVA MORORÓ

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

Orientador:

Dr. João Alberto Osso Júnior

SÃO PAULO

2012

*Eu dedico este trabalho aos meus pais
Angélica Maria e José Alves, pela
formação, carinho e amor que me
entregaram, e a minha namorada Dianne
Ferreira, pelo companheirismo e apoio.*

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar à Deus, por me dar forças e me sustentar nos momentos difíceis.
- À meus pais Angélica Maria e José Alves, pela criação, ensinamentos, amor e carinho, junto com meu irmão James da Silva.
- À minha namorada Dianne Ferreira, e aos seus pais Gildo e Rose por todo apoio, amizade, amor e cumplicidade.
- Ao meu orientador Dr. João Alberto Osso Júnior, que me acompanhou durante todos os momentos deste trabalho, fornecendo muitos esclarecimentos científicos e conhecimentos profissionais. Além de ser um excelente amigo e auxiliador na minha vida em São Paulo.
- Ao Dr. José Procópio, por ter me fornecido muita ajuda em parte dos experimentos, e também pelos conhecimentos adquiridos. Além da sua aluna Natália por ter me auxiliado muito no laboratório.
- Ao Dr. Marcelo Mamede por ter me dado a oportunidade de conhecer ao Dr. João Osso, e acreditar em mim na indicação para este trabalho.
- As minhas grandes amigas Angélica, Marcela, Carla, Renata, Fabíola, Tânia, Graciela, Daniele, Larissa e Aline, que deixaram momentos maravilhosos de alegria e felicidade.
- Aos meus amigos, Florêncio, Mariana, André Amaral, Phablo e Douglas pelas boas risadas e receptividade ao longo destes anos.
- Ao diretor Jair Menghatti e a toda equipe, de amigos, do Centro de Radiofarmácia.
- Aos institutos IPEN, Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) e INCa, pela formidável colaboração deste projeto, e por todo o cuidado e zelo que devotam à população brasileira.

- Ao CNPQ e a USP por terem arcado não somente com a bolsa de pesquisa mas também com a moradia e a alimentação no restaurante universitário.

“Esta vida é uma estranha hospedaria,
De onde se parte quase sempre às tontas,
Pois nunca as nossas malas estão prontas
E a nossa conta nunca está em dia”

Mário Quintana

ESTUDO DE MARCAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-PBP2a COM ^{99m}Tc

Autor: Janio da Silva Mororó

RESUMO

Staphylococcus aureus é um dos principais microorganismos causadores de infecção em humanos, podendo causar inclusive bacteremia e endocardite nos indivíduos infectados. Diversas cepas desta bactéria apresentam resistência a diferentes tipos de antibióticos, dentre eles os antibióticos meticilina e amoxicilina, como no caso da bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). A Proteína ligadora de Penicilina 2a (PBP2a) é a enzima responsável por conferir resistência para a MRSA aos antibióticos β -lactâmicos, sendo uma molécula promissora para terapia com AcM. No entanto, além das terapias os métodos de diagnóstico também são ineficientes, pois atualmente o diagnóstico leva vários dias para produzir um resultado confiável. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um radiofármaco utilizando o AcM anti-PBP2a, desenvolvido em Bio-Manguinhos/FioCruz, marcado com ^{99m}Tc , para identificação *in situ* do foco infeccioso causado por MRSA. Neste trabalho, inicialmente o AcM anti-PBP2a foi reduzido com o agente redutor 2-mercaptoetanol (2-ME), para gerar grupos sulfidrilas (-SH). Logo após foram utilizados dois diferentes métodos da Marcação Direta: o Método 1, utilizando o reagente tartarato e o ácido gentísico, que atuam como agente transquelante e estabilizador, respectivamente; e o Método 2, utilizando um kit comercial de MDP, no qual o MDP atua como agente transquelante. Após a marcação do anticorpo, o radiofármaco foi submetido a ensaios de avaliação funcional, utilizando os métodos de eletroforese em gel SDS-PAGE não redutor; Immunoblotting; ELISA e o Ensaio de Neutralização *in vitro*. Como resultado foi visto que a quantidade média de grupos sulfidrilas produzida por AcM foi considerada satisfatória, cerca de 5 grupos -SH por IgG, utilizando para isto a relação

molar de 6.500:1 de 2-ME:AcM. O Método 2 foi o método que obteve melhor rendimento de marcação, com 73,5%, apresentando boa estabilidade depois de 2 horas (73,2%). A melhor formulação utilizada foi a seguinte: 0,5 mg de AcM anti-PBP2a; 10 µL do kit do MDP, depois de ser resuspendido com 5 mL de solução salina; e 75,48 MBq (2,04 mCi) de ^{99m}Tc , a reação ocorrendo em 15 minutos. Os Ensaio de Avaliação Funcional demonstraram que o AcM manteve a especificidade e afinidade de ligação à PBP2a.

THE LABELLING OF ANTIBODY ANTI-PBP2a WITH ^{99m}Tc

Autor: Janio da Silva Mororó

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a major cause of life-threatening infections such as bacteremia and endocarditis. Unfortunately, many strains of this bacterial species have become resistant to certain antibiotics, including methicillin and amoxicillin. These strains are known as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The penicillin binding protein 2a (PBP2a) is the enzyme responsible for conferring resistance β -lactams antibiotics for MRSA, being one promising molecule for therapy with mAb. However, besides the therapy, the methods of diagnosis are also inefficient because the diagnosis currently takes several days to produce a reliable result. Taking into account, the objective of this research was radiolabeling one anti-PBP2a mAb developed by Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ, utilizing ^{99m}Tc , for *in situ* diagnostic of the infectious caused by MRSA. First, anti-PBP2a mAb was reduced utilizing 2-mecaptoethanol (2-ME) for generate sulphhydryl groups (-SH) and after to be labeled with ^{99m}Tc . In this work, were utilized two techniques of direct method: Method 1, using tartrate and gentisic acid reagents, acting like transchelant and stabilizer agents, respectively; and Method 2, using one commercial kit of MDP. Besides the radiolabeling, the mAb reduced and mAb labeled with ^{99m}Tc were submitted to immunoreactivity analysis, with SDS-PAGE non-reducing, Immunoblotting, ELISA and neutralization assay *in vitro* methods. The quantity produced of sulphhydryl groups by mAb was satisfactory, approximately 5 per mAb, utilizing 6.500:1 of 2-ME:mAb molar ratio. The better labeling method was Method 2, with labeling yield of 73.5%, and showed a good stability after 2 hours (73.2%). The better formulation was: 0.5 mg of mAb anti-PBP2a, 10 μL of MDP kit, after resuspended with 5 mL of saline, and 75.48 MBq (2.04 mCi) of ^{99m}Tc , reacting by 15 minutes. The labeled mAb maintained the immunoreactivity, utilizing immunologic and *in vitro* experiments.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. A bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.1.1. Infecções Hospitalares	20
1.1.2. Tratamento de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando β -Lactâmicos	22
1.1.3. Resistência a Meticilina - PBP2a	23
1.1.4. Fontes de localização e disseminação de MRSA	24
1.1.5. Métodos de Diagnóstico de Infecção por MRSA	26
1.1.5.1. Métodos Convencionais ou Cultura Bacteriana	26
1.1.5.2. Métodos Moleculares	27
1.1.5.3. Imunocromatografia de Fluxo Lateral (Lateral Flow)	27
1.1.5.4. Importância do Diagnóstico Clínico	28
1.1.6. Tratamentos de MRSA	28
1.2. Perspectiva Histórica das Imunizações Passivas - da utilização do soro À terapia com anticorpos monoclonais	29
1.2.1 Imunização Ativa e Imunização Passiva	29
1.2.2 Histórico das Imunizações	30
1.2.3 Terapia com Anticorpos Monoclonais	33
1.2.3.1 Imunoterapia anti- <i>Staphylococcus aureus</i> – atuais desenvolvimentos	38

1.2.3.2	Perspectivas de Vacinas para <i>S. aureus</i>	39
1.2.3.3	Anticorpo Monoclonal anti-PBP2a	39
1.3.	Radioimunoconjugados – Radioimunoterapia e Radioimunodiagnóstico	40
1.3.1.	Aumentando a eficácia dos AcM com radiação	40
1.3.2.	A Medicina Nuclear e os Radiofármacos	42
1.3.3.	Método Direto e Indireto de Marcação com ^{99m}Tc	43
1.3.4.	Revisão da literatura - Radiofármacos utilizados em Infecção/Inflamação	45
1.3.4.1.	Radioimunofármacos Desenvolvidos para Doenças Infecciosas	48
1.4.	Tecnécio	50
1.4.1.	Perspectiva Histórica da utilização do radiofármaco ^{99m}Tc	51
1.4.2.	Gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	52
1.4.3.	Primeira Geração dos Radiofármacos com ^{99m}Tc	53
1.4.4.	Segunda e Terceira Geração dos Radiofármacos com ^{99m}Tc	53
2.	OBJETIVO	56
3.	JUSTIFICATIVAS	57
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1.	Infraestrutura e Equipamentos	58
4.2.	Lista de matérias-primas e Reagentes	59
4.2.1.	Matérias-Primas	59
4.2.1.1.	Anticorpo Monoclonal Murino (Anti-PBP2a)	59
4.2.1.2.	Geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	60
4.2.2.	Reagentes	60

4.2.3.	Preparo das Soluções	62
4.2.3.1.	Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,4	62
4.2.3.2.	Tampão Fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 8,0	63
4.2.3.3.	Solução de Cisteína	63
4.2.3.4.	Reagente de Ellman (5,5 ditiobis [ácido 2-nitrobenzóico] ou DTNB)	63
4.2.3.5.	Meio Luria-Bertani (LB) líquido	63
4.2.3.6.	Tampão TE	64
4.2.3.7.	Tampão de Amostra	64
4.2.3.8.	Solução de TBS	64
4.2.3.9.	Solução de T-PBS	64
4.3.	Metodologia	64
4.3.1.	Redução do Anticorpo (Anti-PBP2a)	66
4.3.2.	Construção da curva de calibração do anticorpo e análise da concentração de AcM reduzido	68
4.3.3.	Determinação dos grupos sulfidrilas livres (-SH)	68
4.3.4.	Marcação do AcM com ^{99m} Tc	71
4.3.5.	Análise Radioquímica do ^{99m} Tc(V)-AcM _{red}	74
4.3.6.	Purificação e Separação das Espécies em Coluna PD-10	76
4.3.7.	Avaliação Funcional do AcM-marcado e do AcM-reduzido	77
4.3.7.1.	Dosagem e Análise da Integridade do AcM-marcado e do AcM-reduzido	77
4.3.7.2.	Avaliação da Atividade e da Afinidade de Ligação do AcM-marcado e do AcM-reduzido	78
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	82

5.1.	Redução do AcM (Anti-PBP2a)	82
5.2.	Purificação e Análise da Concentração de AcM-Reduzido	82
5.2.1.	Purificação Utilizando a Coluna PD-10	82
5.2.2.	Análise da Concentração de AcM-Reduzido	84
5.2.2.1.	Utilizando o Coeficiente de Extinção molar da IgG	84
5.2.2.2.	Utilizando a Curva de Calibração de Albumina	84
5.3.	Análise da Quantidade de Grupos Sulfidrilas (-SH) gerados por Redução de Anticorpo	86
5.3.1.	Análise do Comprimento de Onda	86
5.3.2.	Análise do Tempo	87
5.3.3.	Construção da Curva Padrão de Cisteína	88
5.3.4.	Resultado da Quantidade de Grupos -SH Gerados por Redução de Anticorpo	89
5.4.	Análise Radioquímica do ^{99m}Tc -AcM _{red} e das Espécies Envolvidas na Reação	92
5.5.	Marcação Direta - Variáveis e Análise Radioquímica utilizando CP e CCD	94
5.5.1.	Método I	94
5.5.1.1.	Variação da Massa do Agente Redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	94
5.5.1.2.	Variação da Massa do AcM _{red} . (anti-PBP2a)	95
5.5.1.3.	Variação do Tempo (minutos)	95
5.5.1.4.	Variação da Atividade do ^{99m}Tc	96
5.5.2.	Método II	97
5.5.2.1.	Variação do volume do kit de MDP	98
5.5.2.2.	Variação do Tempo de Reação	99

5.5.2.3. Variação da massa do AcM (anti-PBP2a)	99
5.5.3. Estabilidade	100
5.5.4. Purificação e Separação das espécies em coluna PD-10	101
5.5.5. Comparação do Rendimento de Marcação com os Grupos –SH gerados pela redução do AcM	103
5.6. Avaliação Funcional do AcM-Marcado e do AcM-Reduzido	104
5.6.1. Avaliação da Dosagem Protéica e da Integridade do AcM-Marcado e do AcM-Reduzido	104
5.6.1.1. Solubilidade e Dosagem Proteica	104
5.6.1.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) não-redutor	107
5.6.2. Avaliação da Atividade e da Afinidade de Ligação das Amostras de AcM-Marcado e AcM-Reduzido	109
5.6.2.1. Immunoblotting	109
5.6.2.2. Imunoensaio enzimático (ELISA) direto	112
5.6.2.3. Análise de Neutralização Bacteriana <i>in vitro</i>	114
6. CONCLUSÕES	116
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Comparação das vantagens e desvantagens dos anticorpos monoclonais com os anticorpos policlonais utilizados em doenças infecciosas.	34
TABELA 2. Indicações para uso de diferentes Radiofármacos em pacientes com Infecção e Inflamação.	45
TABELA 3. Principais radiofármacos com ^{99m}Tc e suas utilizações.	50
TABELA 4. Sistemas cromatográficos analisados, com diferentes fases móveis e fases estacionárias.	75
TABELA 5. Relação das reduções do AcM com os Lotes de Anticorpo, Massa de Anticorpo, Volume do Anticorpo, Tempo de Incubação, Relações Molares de 2-ME:AcM e a quantidade de grupos -SH gerados.	91
TABELA 6. Valores dos Rf das espécies contendo $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos diversos sistemas cromatográficos.	92
TABELA 7. Concentrações das amostras de AcM-reduzido e de AcM-marcado antes e depois da centrifugação.	105
TABELA 8. Análise da porcentagem de pureza (IgG/Proteínas totais) das amostras de AcM-reduzido e do AcM Anti-PBP2a Controle.	106
TABELA 9. Análise de Neutralização Bacteriana <i>in vitro</i> utilizando 5×10^4 bactérias. Concentração de 100 μg do Pool de AcM e de 100 μg de AcM anti-PBP2a não marcado e não reduzido. Controle: amostra sem AcM.	114

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Prevalência internacional de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) em comparação à cepa sensível.	22
FIGURA 2- Organização da camada de Peptidoglicano nas bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> .	23
FIGURA 3 – Evolução dos Anticorpos Monoclonais: Murino, Quimérico, Humanizado e completamente Humanizado ou Humano.	36
FIGURA 4- Fragmentos de anticorpos: Fab, Fab ₂ , scFv, Bis-scFv, <i>Diabody</i> , <i>Triabody</i> , <i>Tetrabody</i> e <i>Minibody</i> .	36
FIGURA 5 - Esquema de uma Biomolécula marcada pelo método indireto: a Biomolécula e o Radionuclídeo são conectados através de um AQB e um Espaçador.	43
FIGURA 6 – Etapas do método direto de marcação: utilizando o 2-ME como agente redutor, o MDP como agente transquelante e o ^{99m} Tc como radionuclídeo.	44
FIGURA 7 – Representação esquemática dos mecanismos de ação dos radioimunofármacos contra agentes infecciosos. a) Fungo e b) Vírus.	48
FIGURA 8 - Núcleos de ^{99m} Tc (A) ^{99m} Tc-tricarbonila, (B) ^{99m} Tc-HYNIC-(tricina)(L) e (C) ^{99m} Tc-nitrído.	55
FIGURA 9 - Fluxograma da metodologia aplicada.	65
FIGURA 10 - Absorbância em 280 nm por cada fração coletada de AcM reduzido.	83

- FIGURA 11** - Concentração protéica do AcM_{red.} em comprimento de onda de 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de IgG a 1 mg/mL. 84
- FIGURA 12** - Curva de Calibração de Albumina: Absorbância X Concentração de Albumina. 85
- FIGURA 13** - Concentração protéica do AcM_{red.} em comprimento de onda de 280 nm, utilizando a Curva de Albumina. 85
- FIGURA 14** - Curva de Absorbância X Comprimento de Onda da solução de cisteína 1mmol.L⁻¹, em Espectrofotômetro UV/Visível. 86
- FIGURA 15** - Curva de Absorbância X Tempo de Reação da solução de cisteína 1 mmol.L⁻¹, em Espectrofotômetro UV/Visível à 407 nm. 87
- FIGURA 16** - Curva Padrão de Cisteína (0,25; 0,5; 0,75 e 1 mmol.L⁻¹), 5 minutos de reação e comprimento de onda de 407 nm. 88
- FIGURA 17** - Relação molar 2-ME:AcM em comparação a quantidade de grupos –SH gerados. 89
- FIGURA 18** - Análise de diferentes sistemas cromatográficos para a espécie hidrolizada reduzida (^{99m}TcO₂): A) TLC-SG (Al) com MEC; B) papel Whatman 3MM com MEC; C) TLC-SG (Al) com fase móvel de solução salina 0,9%; D) papel Whatman 3MM com solução salina 0,9%; e E) fita ITLC-SG fibra de vidro com solução EtOH:NH₄OH:H₂O 93
- FIGURA 19** - Pureza radioquímica (%) das espécies em relação as diferentes massas do agente redutor (SnCl₂.2H₂O): 50 µg (26,30 µg de Sn⁺²); 75 µg (39,45 µg de Sn⁺²); 100 µg (52,61 µg de Sn⁺²) e 500 µg (263,05 µg de Sn⁺²), no Método I. 94
- FIGURA 20** - Pureza radioquímica (%) das espécies em relação as diferentes massas do AcM-anti PBP-2A: 0,50 mg; 0,85 mg; 1,00 mg e 1,86 mg, no Método I. 95
- FIGURA 21** - Pureza radioquímica (%) das espécies em relação aos diferentes tempos de reação (minutos): 30, 45 e 60, no 1º Método de marcação. 96
- FIGURA 22** - Pureza radioquímica (%) das espécies em relação a atividade do ^{99m}TcO₄⁻ em MBq: 39,96; 54,39; 127,65; 167,61; 175,75; 183,15 e 185, no Método I de marcação. 97

- FIGURA 23** - Pureza radioquímica (%) das espécies em relação ao volume retirado da solução de 5 mL do kit do MDP: 20 µL, 30 µL e 40 µL, no Método II. 98
- FIGURA 24** - Pureza radioquímica (%) das espécies em relação a diferentes tempos de reação (minutos): 15, 30, 60 e 150, no Método II. 99
- FIGURA 25** - Pureza radioquímica (%) das espécies em relação a diferentes massas do AcM-anti PBP-2a: 0,20 µg; 0,50 µg e 0,75 µg, no 2º Método de marcação. 100
- FIGURA 26** - Curva de Eluição do (A) $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, (B) $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ e (C) $\text{MDP-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ em coluna PD-10. 101
- FIGURA 27** - Relação dos Grupos –SH gerados por molécula de AcM com o Rendimento de Marcação. 103
- FIGURA 28** - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) não-redutor das amostras de AcM-reduzido. PM – padrão de peso molecular; CT – Controle (AcM Anti-PBP2a não marcado e não reduzido); A – 1ª Redução; B - 2ª Redução; C – 3ª Redução; D – 6ª Redução. 107
- FIGURA 29.** Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) não-redutor das amostras de AcM-marcado. PM – padrão de peso molecular; CT – Controle (AcM Anti-PBP2a não marcado e não reduzido); E – AcM-Marcado 14.11.11; F – AcM-Marcado 01.03.12; G – AcM-Marcado 01.03.12; H – AcM-Marcado 15.03.12; I – AcM-Marcado 15.03.12; J – AcM-Marcado 13.04.12; L – 21.04.12. 108
- FIGURA 30.** Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) não-redutor do Pool de AcM-marcado. PM – padrão de peso Molecular; CT – Controle (AcM Anti-PBP2a não marcado e não reduzido); Pool – amostras E, F, G, H, I, J e L de AcM-marcado. 109
- FIGURA 31.** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE não redutor do lisado celular e membrana de nitrocelulose com a proteína recombinante purificada PBP2a. A – Lisado Celular (L) e B – Proteína Recombinante PBP2a (PBP2a). PM – padrão de peso molecular. 110
- FIGURA 32.** Immunoblotting das amostras de AcM-marcado e de AcM-reduzido em lisado celular (A) e da proteína recombinante purificada PBP2a (B) em gel de

poliacrilamida SDS-PAGE não redutor. PM – padrão de peso molecular; CT – Controle (AcM Anti-PBP2a não marcado e não reduzido); A – 1ª Redução; B - 2ª Redução; C – 3ª Redução; D – 6ª Redução. Ligação das amostras AcM-marcado e AcM-reduzido.

111

FIGURA 33. Imunoensaio enzimático (ELISA) direto, com a adição da proteína purificada PBP2a 0,25 µg/poço. Concentrações das amostras: 50; 25; 12,5; 6,25; ng/poço.

112

FIGURA 34. Imunoensaio enzimático (ELISA) direto, com a adição da proteína purificada PBP2a 0,25 µg/poço. Concentrações das amostras: 1,5; 3,1; 6,2; 12,5; 25 e 50 ng/poço.

113

1. INTRODUÇÃO

1.1. A BACTÉRIA *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, encontrados como organismos comensais ou patógenos bacterianos tanto para humanos como animais. São imóveis, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 μm , não formadoras de esporos podendo aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos.

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – 2008 a classificação taxonômica de *Staphylococcus aureus* segue a seguinte sequência: Filo: Firmicutes, Classe: *Bacilli*, Ordem: *Bacillales*, Família: *Staphylococcaceae*, Gênero: *Staphylococcus*, Espécie: *S. aureus*.

Staphylococcus aureus é um importante patógeno causador de infecções bacterianas em humanos. Os problemas causados por esta bactéria variam amplamente – desde pequenos problemas de pele até doenças mais graves como pneumonia, meningite ou septicemia. Esta bactéria é um organismo comensal nos seres humanos, que geralmente coloniza a região anterior das narinas, embora o restante do trato respiratório, o trato urinário, as regiões de cateteres intravenosos e feridas na pele também sejam potenciais regiões para colonização desta bactéria.

Aproximadamente 25-30% dos indivíduos saudáveis estão colonizados assintomaticamente com *S. aureus*, na região das narinas (Kluytmans et al., 1997). A cavidade nasal é considerada o principal sítio de colonização ou de transporte de *S. aureus*, no qual a partir daí o patógeno pode se disseminar para outras partes do corpo. Foi visto por Reagan e colaboradores que a eliminação desta colonização nasal pelo uso do antibiótico mupirocina de maneira tópica, também causa a eliminação desta bactéria de outras regiões do corpo (Reagan et al. *apud* Parras et al., 1995). A associação entre

colonização (o indivíduo que possui a bactéria mas não possui a doença) e infecção (o indivíduo que apresenta a doença), tem sido observada com frequência e por isso vem sendo muito estudada, pois comumente o paciente infectado pela bactéria deveria ser previamente colonizado pelo microorganismo (Noble et al., 1964).

Atualmente na população foram identificados três grupos distintos de indivíduos colonizados ou não por esta bactéria: o primeiro grupo composto aproximadamente por 20% dos indivíduos, quase sempre são colonizados por um único tipo de linhagem de *S. aureus* ao longo da vida, e são chamados de portadores persistentes. No segundo grupo, que corresponde à maior parte da população (60%), os indivíduos são colonizados por *S. aureus* continuamente, e a linhagem muda com certa periodicidade nos indivíduos, sendo denominados de portadores intermitentes. No último grupo, que corresponde a 20% do restante da população quase nunca estes indivíduos são colonizados pela *S. aureus*, e são chamados de não portadores (Williams, 1963).

O principal modo de transmissão de *S. aureus* é por contato direto, normalmente entre um indivíduo colonizado e um indivíduo infectado, no entanto, o contato com objetos e superfícies contaminadas também tem uma notória importância na disseminação da doença. Além disso, várias alterações no organismo do indivíduo ou no hábito de vida podem facilitar o contágio, dentre eles os indivíduos imunodeprimidos, no caso de pacientes oncológicos, diabéticos ou com imunodeficiência adquirida (HIV); pessoas que apresentam feridas ou ferimentos na pele, como queimaduras e traumas; usuários de drogas ilícitas; trabalhadores da área da saúde e pacientes que estão em uso constante de antibióticos, com desregulação da flora bacteriana (Williams, 1963).

Atualmente a bactéria *S. aureus*, juntamente com a *Escherichia coli*, tem sido os principais microorganismos causadores de Infecções Hospitalares (Stein, 2005).

1.1.1. Infecções Hospitalares

As Infecções hospitalares (IH) ou nosocomiais (do grego nosos = doença; komeion = hospital) são atualmente um dos principais problemas de saúde pública em hospitais do mundo inteiro. Estas infecções acarretam um tempo de internação prolongado,

altos índices de mortes e elevado custo econômico para o sistema de saúde dos países (Lobdell et al., 2012).

Nos EUA, em torno de 2 milhões de indivíduos adquirem IH anualmente, e 90.000 pacientes são levados à morte, de acordo com o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC), em Atlanta (site 1). O instituto Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA), responsável pelo controle de antibióticos na população americana, averiguou que a resistência aos antibióticos custa entre 17-26 bilhões de dólares ao país, representando cerca de 1% dos gastos com saúde pública por ano (site 2).

Alguns dados demonstram que em 2 bilhões de indivíduos portadores de *S. aureus* ao redor do mundo, cerca de 25 milhões de pessoas são infectadas pela forma resistente, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (FIG. 1) (Grundmann, 2006).

Na Inglaterra, 40% das infecções causadas por *S. aureus* são infecções MRSA, e no continente asiático este índice sobe para 70-80% (site 3). Esta bactéria é responsável por gerar uma grande epidemia em países como Itália, Turquia e Argentina. Foi visto em um estudo que dentre 500 crianças atendidas em sistema público em hospitais em Nashville, nos EUA, 9,2% apresentavam colonização com MRSA na região nasal (site 4).

A taxa de pacientes que adquirem IH no Brasil é de 16%, das quais aproximadamente 47% destas infecções são causadas por *Staphylococcus* sp., sendo este patógeno o principal responsável pelas IH no país (Fernandes 2000).

FIGURA 1- Prevalência internacional de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em comparação à cepa sensível (Stapleton et al., 2002).

1.1.2. Tratamento de *Staphylococcus aureus* utilizando β -Lactâmicos

O microorganismo *Staphylococcus aureus* é revestido por uma estrutura semelhante a uma rede, medindo aproximadamente 20-40 nm de espessura, denominada de camada de peptideoglicano. Esta estrutura é composta por uma série de pequenas cadeias de açúcares, de aproximadamente 20 moléculas de Ácido N-acetilmurâmico e β -1-4-N-acetilglicosamina, que vão se alternando entre si.

Ligado a cada ácido N-acetilmurâmico existe uma cadeia pentapeptídica denominada *Stem Peptide* (peptídeo nascente). As cadeias de açúcares nos peptideoglicanos estão ligadas através do último resíduo de glicina de uma cadeia cruzada de cinco glicinas (pentaglicina), ligadas a um resíduo de L-lisina na cadeia do *Stem Peptide* do açúcar seguinte. As cadeias cruzadas de pentaglicina são pré-formadas no citoplasma pelas proteínas FemX, FemA, e FemB, no qual são unidos os resíduos de glicina aos resíduos de L-lisina da cadeia do *Stem Peptide* (FIG. 2).

FIGURA 2 - Organização da camada de Peptideoglicano nas bactérias *Staphylococcus aureus* (Hackbarth et al., 1995).

Estas reações de transpeptidação que ocorrem na superfície externa da membrana citoplasmática são catalisadas pelas chamadas Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBPs). Até o momento as principais PBPs identificadas na *S. aureus* são a PBP1, PBP2, PBP3 e a PBP4. As PBPs com alto peso molecular tem dois domínios protéicos, um envolvido na transpeptidação e o outro envolvido na transglicosilação (aumentando a cadeia de açúcares). Os antibióticos β -lactâmicos, que se ligam a região terminal D-alanil-D-alanina da cadeia de *Stem Peptide*, inibem o domínio de transpeptidação das PBPs e também inibem a atividade carboxipeptidase das PBPs de baixo peso molecular, interferindo com isso nas reações de transpeptidação. Assim, estas deficiências nas ligações do peptideoglicano geram paredes celulares mecanicamente fracas, podendo ser facilmente rompidas pela pressão osmótica interna celular, levando a célula bacteriana à morte celular.

1.1.3. Resistência a Meticilina - PBP2a

Antes da década de 50, o tratamento utilizado em pacientes infectados pela *Staphylococcus aureus* era o antibiótico benzilpenicilina (penicilina G). No entanto, após 1950 começou haver um aumento no número de isolados clínicos resistentes a benzilpenicilina, apresentando como mecanismo de resistência enzimas β -lactamases, que inativavam este antibiótico. Sendo assim a partir de 1959 começou a ser utilizado o

antibiótico meticilina, no qual este antibiótico apresenta o grupo fenol da benzilpenicilina substituído por grupos metoxi (Stapleton et al., 2002).

No ano de 1961, Patricia Jevons descreveu pela primeira vez uma cepa resistente à meticilina (MRSA), na Inglaterra (Grundmann et al., 2006). Nas próximas décadas, houve grande disseminação pelo mundo desta forma resistente, e atualmente se tornou um problema endêmico em muitos hospitais e centros de saúde (Enright, 2003). Uma grande preocupação para o tratamento de infecções por MRSA é o aumento da resistência contra vários antibióticos, ou seja, resistência a múltiplas drogas.

O principal mecanismo de resistência da MRSA é um aumento na expressão da enzima PBP2a. Pois esta enzima em comparação as outras PBPs apresenta baixa afinidade e possui maiores índices de dissociação ao antibiótico meticilina (Hackbarth et al., 1995).

A síntese de PBP2a é normalmente mantida em baixos níveis em *S. aureus*, no entanto em MRSA os níveis de síntese desta proteína podem estar aumentados, principalmente através de mutações nos genes regulatórios da proteína PBP2a, em resposta a pressão seletiva causada por antibióticos (Chambers et al., 2009).

MRSA difere geneticamente de isolados de *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA), pois existe a presença de um gene denominado de *mecA*, que codifica a proteína PBP2a, que apresenta em torno de 76 kDa. Algumas pesquisas demonstram que este gene foi originado da bactéria *Staphylococcus sciuri* (Cookson, 2011).

1.1.4. Fontes de localização e disseminação de MRSA

Existem duas fontes principais de localização e disseminação de surtos de MRSA: MRSA associada à infecção hospitalar (HA-MRSA - Hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), e MRSA associada à comunidade (CA-MRSA - Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Esta última pode ocorrer em indivíduos que não tiveram proximidade com hospitais ou centros cirúrgicos.

Alguns trabalhos sugerem que as cepas CA-MRSA tem maior virulência do que as cepas HA-MRSA (Dean, 2010). Além disso, algumas cepas CA-MRSA, como a

USA300, têm a capacidade de se disseminar mais rapidamente na população, e estas características talvez expliquem o fato de a CA-MRSA estar presente em diversos países (Deurenberg et al., 2009).

Desde que MRSA foi descrita em 1961, esta bactéria tem sido considerada como um patógeno nosocomial que não está normalmente presente na comunidade. No entanto, com o aparecimento de pacientes infectados que viviam em regiões remotas e pouco povoadas, sem terem tido contato prévio com centros médicos, este conceito começou a mudar. Além disso, foi visto que os isolados de MRSA destes pacientes não estavam relacionados com multirresistência (Deurenberg et al., 2009).

As manifestações clínicas mais freqüentes em indivíduos infectados por MRSA são abscessos, inflamações na epiderme e septicemia, já em indivíduos infectados por HA-MRSA apenas a septicemia é mais frequente (Deurenberg et al., 2009).

CA-MRSA tem sido um problema de saúde em quase todos os países industrializados, sendo que em graus variados. Por exemplo, as linhagens de CA-MRSA PVL-positivas (*Panton-Valentine leukocidin*) foram isoladas em cerca de 1-3% de todas as infecções de pele e de tecidos moles na França nos anos de 2000-2003 (Tristan et al., 2007), sendo que a prevalência destas cepas foi relatada como sendo maior do que 50% nos EUA ((Tristan et al., 2007).

A freqüência de infecções causadas pelas bactérias do gênero *Staphylococcus* tem aumentado bastante desde o surgimento da CA-MRSA, e aproximadamente 90% destas infecções estão localizadas na pele ou em tecidos moles, nas quais estes indivíduos apresentam algumas manifestações clínicas, como drenagem purulenta ou abscessos (Farley, 2008).

Essencialmente, as cepas CA-MRSA podem causar os mesmos tipos de infecções do que as MSSA. No entanto, algumas cepas CA-MRSA têm sido associadas com doenças muito graves, fator relevante que explica a grande virulência em comparação a *S. aureus* (Farley, 2008).

Esta alta incidência, levou o Centro para Prevenção e Controle de Doenças de Atlanta, nos EUA, a citar quatro fatores que auxiliam na transmissão de MRSA:

aglomeração de pessoas; contato pele a pele, com feridas ou machucados; contato com itens ou superfícies contaminadas e a falta de limpeza ou higiene (site 5).

1.1.5. Métodos de Diagnóstico de Infecção por MRSA

Os métodos para monitoração e controle da propagação das infecções por MRSA dependem de um diagnóstico específico e eficiente, tanto no hospital como na comunidade. Os diagnósticos laboratoriais deste agente infeccioso são feitos levando em consideração sensibilidade, rapidez, custo e especificidade. Atualmente os testes utilizados para MRSA na clínica são testes envolvendo: cultura bacteriana, técnicas moleculares e imunocromatografia de fluxo lateral (Lateral Flow).

1.1.5.1. Métodos Convencionais ou Cultura Bacteriana

Atualmente os testes de diagnósticos mais utilizados para a MRSA são as técnicas envolvendo cultura bacteriana, na qual é utilizada uma amostra, que pode ser fezes, urina, sangue, líquido cefalorraquidiano ou secreções de vias aéreas (escarro), coletada do paciente e enviada para análise.

Neste método de diagnóstico é feito a semeadura em meios de cultura, seguido por incubação de 18-24 horas. Logo após, é feita observação das colônias e análise por exame bacterioscópico (coloração de Gram), a fim de determinar características morfo-tintoriais das bactérias presentes. Assim, permite-se caracterizar o agente infeccioso como Gram-positivo ou Gram-negativo, e obter informações sobre sua morfologia (cocos, bacilos, etc.). Como último passo é feito um teste de sensibilidade para analisar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos antimicrobianos.

Os métodos automatizados, usado em grandes hospitais, são rápidos e ainda podem ser utilizados para analisar simultaneamente um grande número de amostras, no entanto estes métodos apresentam como desvantagem o elevado custo.

1.1.5.2. Métodos Moleculares

Os métodos moleculares utilizam a reação da cadeia da polimerase (PCR) convencional. Existem diversos métodos descritos na literatura, no qual um exemplo é o método que utiliza o PCR-multiplex proposto por Vanuffell e colaboradores (Vannuffel et al., 1995), que identifica o patógeno através da detecção do gene *mecA*, com a utilização de seqüências iniciadoras, oligonucleotídeos e DNA polimerase, bem como a detecção do gene *FemA*, específico de *Staphylococcus aureus*.

1.1.5.3. Imunocromatografia de Fluxo Lateral (Lateral Flow)

As reações de imunodiagnóstico, utilizando anticorpos monoclonais (AcM) são baseadas na ligação específica antígeno-anticorpo para detectar a bactéria. A utilização dos AcM possuem inúmeras vantagens como: elevada sensibilidade, reprodutibilidade no processo de produção (reatividade e título) e especificidade (Payne et al., 1988). Como exemplos de ensaios que utilizam anticorpos monoclonais, pode-se citar: imunoenzimáticos, imunofluorescência, imunocromatografia e aglutinação.

A metodologia do teste rápido de imunocromatografia de fluxo lateral tem sido uma ferramenta usada no diagnóstico em domicílio. Suas aplicações incluem testes com patógenos, drogas, hormônios e metabólitos, tanto na área médica e veterinária (Posthuma-Trumpie et al., 2009).

Esta metodologia utiliza uma plataforma imunocromatográfica, que é constituída essencialmente por membranas de nitrocelulose, e no local de imobilização da proteína de captura está presente um antígeno ou anticorpo. A escolha da membrana varia de acordo com a porosidade e espessura, as quais estão diretamente relacionadas ao fluxo capilar dos reagentes (Walther et al., 2008). As forças de interação estabelecidas entre a molécula de captura e a membrana (linha teste) é um elemento chave na produção de imunoensaios sensíveis.

1.1.5.4. Importância do Diagnóstico Clínico

Embora existam estes testes de diagnóstico citados anteriormente, o aumento do número de casos de infecção por MRSA e o alto índice de morbidade e mortalidade causado por esta bactéria, tornam necessário o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais específicas e mais rápidas.

Além disso, nenhum dos métodos citados anteriormente permite estimar o grau de infecção presente no paciente, sendo esta análise feita levando em consideração os sinais clínicos do paciente. Com isso um método de diagnóstico *in situ* que fosse capaz de estimar a extensão da infecção de forma rápida seria de altíssima relevância no diagnóstico clínico de MRSA. Auxiliando também o médico na escolha da terapia mais eficiente, diminuindo efeitos adversos.

1.1.6. Tratamentos de MRSA

Embora ambas as linhagens de MRSA, CA-MRSA e HA-MRSA, sejam resistentes a antibióticos beta-lactâmicos, como a cefalexina, a bactéria CA-MRSA ainda apresenta alguma sensibilidade a outros antimicrobianos, como as sulfonamidas (como a trimetoprima), as tetraciclinas (como a doxiciclina e a minociclina) e aos glicopeptídeos (Cercenato et al., 2008).

Atualmente os antibióticos vancomicina e teicoplanina, da classe dos glicopeptídeos, tem sido muito utilizados para tratamento de MRSA (Pan et al., 2008). Ambos agentes devem ser administrados de maneira intravenosa para controle de infecções sistêmicas, devido à baixa absorção oral de ambos os antibióticos. Sendo assim a administração é feita com o auxílio de um catéter, que pode ser colocado por radiologistas, médicos ou enfermeiros certificados. No entanto esta rota de administração ainda é inconveniente para muitos médicos e em muitos casos o tratamento já se tornou ineficiente, pelo aparecimento de novas formas resistentes (Stefani et al., 2010), como a *S. aureus* intermediária à vancomicina (VISA) e a *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA).

A cepa VISA foi inicialmente detectada no Japão em 1996, e logo depois foi detectada em hospitais no Reino Unido, França, EUA, Ásia e Brasil (Fridkin, 2000; Ruff et

al., 2004). Este patógeno também pode ser chamado de cepa GISA (*Staphylococcus aureus* intermediário a glicopeptídeos), demonstrando com isso a rápida resistência aos antibióticos pela *S. aureus*.

Sendo assim fatores associados com a (i) diminuição do desenvolvimento de antibióticos pelas indústrias farmacêuticas, (ii) alto índice de mortes por MRSA, e (iii) a rápida resistência, tornam o desenvolvimento de novas terapias e métodos de diagnóstico extremamente necessários.

Atualmente, alguns antibióticos de diferentes classes estão em desenvolvimento clínico, como três glicopeptídeos: dalbavancina, telavancina e a oritavancina; duas cefalosporinas de amplo espectro: a ceftobiprole e a ceftarolina; e alguns carbapenêmicos, como por exemplo o CS-023/RO-4908463 (Pan et al., 2008).

Além destes fármacos também tem começado a serem investigadas outras moléculas para tratamento, diagnóstico e profilaxia contra MRSA. Por exemplo, os anticorpos policlonais e os anticorpos monoclonais, que apresentam como principais vantagens: a diminuição da resistência bacteriana (causada pela menor pressão de seleção), e a diminuição dos efeitos colaterais, quando comparados a antibióticos.

1.2. PERSPECTIVA HISTÓRICA DAS IMUNIZAÇÕES PASSIVAS - DA UTILIZAÇÃO DO SORO À TERAPIA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

1.2.1. Imunização Ativa e Imunização Passiva

A imunização é definida como a aquisição de proteção imunológica contra uma doença infecciosa, na qual esta prática tem como objetivo aumentar a resistência de um indivíduo contra infecções. Esta administração pode ocorrer de diversas formas: por meio de microorganismos atenuados ou mortos; através de imunoglobulinas; ou com a utilização de vacinas sintéticas, que utilizam técnicas de Recombinação Gênica.

Os microorganismos atenuados ou mortos são administrados por vacinas nos indivíduos, com o objetivo de induzir a imunidade ativa, e sua administração resulta na produção de anticorpos contra o patógeno. Atualmente as vacinas também tem sido muito utilizadas com o objetivo de promover a imunização passiva, inoculando nos pacientes imunoglobulinas que serão responsáveis por neutralizar a doença, como por exemplo no tratamento de câncer ou AIDS (John et al., 2004).

A imunidade ativa dura muitos anos, às vezes por toda vida do indivíduo, e esta ocorre quando o próprio sistema imune, ao entrar em contato com uma substância estranha ao organismo, responde produzindo anticorpos e linfócitos B e T. Existem dois meios de se adquirir imunidade ativa: contraindo o patógeno, através da infecção de uma doença, ou através da vacinação, na qual microorganismos atenuados ou mortos são inoculados propositalmente no indivíduo.

A imunidade passiva utiliza anticorpos, que na maioria dos casos foram produzidos tanto por células, em reatores biológicos, ou por animais, e esta imunidade dura apenas algumas semanas. No caso da imunização passiva natural, essa transferência de anticorpos ocorre nos últimos 2 meses de gestação, na qual os anticorpos da mãe são repassados para o feto conferindo imunidade à criança durante seu primeiro ano de vida. A imunização passiva artificial se utiliza de diferentes maneiras para administrar anticorpos no indivíduo, podendo ser intravenosa ou intramuscular.

Historicamente, a imunização passiva artificial produziu e repassou anticorpos de três formas principais: (1) com a administração de plasma, soro ou sangue total (de animais ou pessoas); (2) com a administração de anticorpos policlonais concentrados, produzidos em animais ou seres humanos, e denominado de soro hiperimune; ou (3) através da inoculação de anticorpos monoclonais (Casadevall et al., 2004; Stiehm, 1996).

1.2.2. Histórico das Imunizações

No final do século XIX, o pesquisador Paul Erlich, que trabalhava com identificação e tratamento de bactérias apresentou o termo “*magic bullet*”, no qual uma molécula que tivesse afinidade por determinado microorganismo poderia ser utilizada para

identificar ou inativar determinado patógeno. Este termo vem sendo utilizado até os dias de hoje, para referenciar o efeito dos anticorpos em atingir especificamente um epítopo.

Este imunologista começou a perceber esta complementariedade quando utilizou agentes corantes, precursores da coloração Gram, para classificar determinadas bactérias, e quando utilizou agentes quimioterápicos para tratar certos tipos de doenças infecciosas, pois como estas moléculas agiam especificamente nas células tumorais, os pacientes apresentavam poucos efeitos colaterais (Strebhardt et al., 2008).

Em seguida, os cientistas Behring e Kitasato, alunos e colaboradores do pesquisador Paul Erlich começaram a investigar a eficácia do soro humano na prevenção ou tratamento de doenças infecciosas. Naquela época estes pesquisadores estudavam a transferência de sangue de animais infectados para animais não infectados para ser utilizado no tratamento da difteria (Behring et al., 1965).

Esta pesquisa foi um passo inicial para a produção em larga escala de soro imunológico, pois a partir do ano de 1893 esta solução de imunoglobulina começou a ser utilizada nas terapias humanas, utilizando soro extraído de ovelhas, cavalos e galinhas (Strohl et al., 2009).

Quando os seres humanos eram os únicos hospedeiros dos patógenos a serem tratados, como no caso de algumas doenças virais, então era coletado o soro de pacientes que apresentavam a doença e este era utilizado em outros indivíduos. Como exemplo, no início de 1900 o soro de indivíduos que se recuperavam de sarampo era utilizado para tratar e prevenir as infecções de outros indivíduos (Good et al., 1991).

Logo após, na década de 1930 começou a ser utilizado o soro hiperimune, que é uma solução com alta concentração de imunoglobulinas. Este soro era extraído de animais ou pessoas, e sofria processos de concentração e purificação para somente separar anticorpos.

O soro hiperimune foi utilizado para tratar infecções causadas por *Streptococcus spp.* ou doenças causadas por toxinas, como a difteria. Em algumas doenças, como a pneumonia pneumocócica e a meningite meningocócica, foi percebido que quanto

mais rápida a administração deste soro hiperimune nos pacientes, mais rápida e eficiente era a resposta, aumentando as chances de vida do paciente (Good et al., 1991).

Embora nos primeiros anos a terapia com anticorpos tenha obtido bastante vantagens no tratamento e prevenção de algumas doenças, posteriormente, com a descoberta dos antibióticos, nos anos de 1930 a 1940, rapidamente começou a haver substituição da terapia imune.

Este fato ocorreu por vários motivos: (I) os antibióticos eram mais fáceis de serem produzidos do que os soros; (II) os antibióticos possuíam menor toxicidade nos pacientes, pois o soro utilizado tinha alta quantidade de proteína animal; e (III) a resposta obtida pelos pacientes era melhor quando tratados com antibióticos do que com anticorpos (Casadevall et al., 2004).

Outros motivos de menor relevância podem ser citados: (IV) a terapia com soro é eficiente somente no início do processo infeccioso, sendo que os antibióticos mantinham eficácia por todo o tempo de doença; (V) a produção do soro dependia fundamentalmente da utilização de animais, podendo geralmente apresentar grande variação de lote para lote de soro; e (VI) o fato de que não é necessário reconhecer o patógeno causador da doença, pois os antibióticos de amplo espectro podem ser utilizados para diferentes bactérias (Casadevall et al., 2004).

Estes motivos levaram a soroterapia a ser menos utilizada do que a terapia com antibióticos, utilizando-a somente para o tratamento de algumas poucas doenças, como por exemplo: doenças virais e doenças causadas por toxinas, como no caso da raiva e de venenos ofídicos (Habel, 1954).

As pesquisas com imunoterapia continuaram seguindo na década de 40, com o desenvolvimento de melhores técnicas de purificação de anticorpos. A utilização inicial do soro hiperimune apresentava muita toxicidade nos pacientes, gerando principalmente reações de hipersensibilidade, chamadas de “Doença do Soro” (Stiehm, 1996).

Algumas técnicas purificavam o soro utilizando o etanol para separar imunoglobulinas de outras proteínas do soro, e ao mesmo tempo concentravam as imunoglobulinas. Geralmente este soro era coletado de pessoas convalescentes (que

estavam se recuperando de uma doença), tendo sido infectadas ocasionalmente ou de maneira proposital (Saylor et al., 2009).

Nas décadas de 70 e 80, motivos como o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, aumento na produção de AcMs e o surgimento de várias bactérias resistentes a antibióticos, fizeram com que as pesquisas com anticorpos fossem retomadas (Casadevall et al., 2004).

1.2.3. Terapia com Anticorpos Monoclonais

A terapia com soro humano por definição utiliza preparações de anticorpos policlonais que são obtidos de diferentes linfócitos B e apresentam diferentes epítomos, e apenas uma pequena quantidade de anticorpos são específicos para um epítomo alvo. No entanto, no caso de AcMs existe apenas um único tipo de imunoglobulina, com uma especificidade definida e um único isotipo.

Em 1975, a tecnologia do hibridoma descrita por Georges Köhler e Cesar Milstein, proporcionou a capacidade de gerar grandes quantidades de AcM (Payne apud Georges Köhler e Cesar Milstein, 1988). A partir daí muitos esforços foram feitos com o objetivo de desenvolver terapias utilizando AcMs cada vez mais eficazes e com menores desvantagens, seja durante a produção ou no tratamento do paciente (Payne et al., 1988).

Os mecanismos de ação dos AcMs assim como dos anticorpos policlonais podem ser tanto pela ação direta como pela ação indireta:

- Mecanismo Direto: (i) ocorre a neutralização das toxinas ou a neutralização dos vírus, através da ligação da imunoglobulina ao patógeno, para assim prevenir a entrada do microorganismo na célula hospedeira; (ii) pode ocorrer a ligação do AcM a algum epítomo impedindo a proliferação do microorganismo e levando à morte celular (Liu et al., 2008; Oral et al., 2002).
- Mecanismo Indireto: existe a atuação da região Fc do anticorpo, ativando a opsonização e lise do microorganismo; (ii) pode ocorrer a ativação do sistema complemento (Liu et al., 2008; Oral et al., 2002).

No entanto existem vantagens e desvantagens quando anticorpos monoclonais são comparados com anticorpos policlonais, como demonstrado na TAB. 1.

TABELA 1. Comparação das vantagens e desvantagens dos anticorpos monoclonais com os anticorpos policlonais utilizados em doenças infecciosas

	<u>Anticorpos Monoclonais</u>	<u>Anticorpos Policlonais</u>
<u>Vantagens</u> (Payne et al., 1988; Berger et al., 2002; Good et al., 1991)	<ul style="list-style-type: none"> - Alta especificidade - Podem ser manipulados pela biologia molecular para aumentar a especificidade e a eficácia - Menores chances de contaminar o paciente com microorganismos - Podem ser produzidos em larga escala - Apresentam menor toxicidade quando são humanizados 	<ul style="list-style-type: none"> - Podem proteger contra mais de um agente infeccioso - Atuam contra diferentes epítomos no mesmo microorganismo
<u>Desvantagens</u> (Bayry et al., 2004; Robinson et al., 2000)	<ul style="list-style-type: none"> - Existe a possibilidade de perda de atividade se ocorrer uma única mutação no epítomo alvo - Alto custo 	<ul style="list-style-type: none"> - Podem apresentar partículas infecciosas - Apresentam baixa atividade específica -Variação de imunoglobulinas de lote para lote

A utilização dos AcM foi estabelecida com o medicamento Orthoclone OKT3, que foi o primeiro AcM murino aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), em Junho de 1986. Este AcM foi utilizado como imunossupressor para reduzir a rejeição em pacientes transplantados. No entanto, assim como a soroterapia utilizada na década de 30 e 40 a utilização de AcMs murinos causava hipersensibilidade aos pacientes, e além disso o *clearance* sanguíneo deste fármaco era muito rápido, fazendo com que a dose terapêutica administrada fosse maior, aumentando ainda mais a sensibilidade no paciente (Kunq et al., 1979).

Com o desenvolvimento da engenharia genética, pesquisadores construíram o AcM quimérico, que possui 33% de proteína murina e 67% de proteína humana (FIG. 3). Com isso a resposta de sensibilidade a imunoglobulina diminuiu, mas ainda poderia acontecer dependendo do paciente. No ano de 1994 o primeiro AcM quimérico aprovado pelo FDA foi o Reopro, um fármaco utilizado para terapia anti-trombose (Jubelirer et al., 1999). Estes AcM tem como grande vantagem a maior $\frac{1}{2}$ vida plasmática em relação aos AcM murinos, por causa da região Fc humanizada (Hwang et al., 2005).

Logo após, algumas inovações na área molecular, como a técnica de *Phage Display* utilizando biblioteca de anticorpos, possibilitou o desenvolvimento e a produção de AcMs humanizados (Riechmann et al., 1988). Estes AcMs humanizados possuem em torno de 5-10% de proteína murina e 90-95% de proteína humana, e dificilmente promovem reação de hipersensibilidade nos pacientes (FIG. 3). O Zenapax foi o primeiro anticorpo humanizado aprovado pelo FDA, no ano de 1997, sendo utilizado para transplante renal (Carswell et al., 2001).

O próximo passo na evolução dos AcMs foi com a produção do AcM completamente humanizado ou humano, utilizando por exemplo camundongos transgênicos (FIG. 3). Em 2002 o FDA aprovou o Humira, para tratamento de artrite reumatóide (Epstein et al., 1987), e no ano de 2006 o medicamento Vectbix, também um AcM completamente humanizado, foi aprovado para tratamento de câncer colorretal (Pedersen et al., 2010).

FIGURA 3 – Evolução dos Anticorpos Monoclonais: Murino, Quimérico, Humanizado e completamente Humanizado ou Humano (Brekke et al., 2003).

Atualmente os fragmentos de anticorpos (Fab, Fab' e scFv), e as suas variantes (*diabody*, *triabody*, *tetrabody* e o *minibody*) estão começando a serem produzidos e estudados (FIG. 4) (Holliger et al., 2005). Estes fragmentos retêm a especificidade dos AcM íntegros, são economicamente mais baratos na produção e podem atingir o local infeccioso ou tumor de maneira mais rápida e fácil (Ward et al., 1989). Estes fragmentos também podem ser ligados a outras moléculas, como radionuclídeos, toxinas, enzimas, lipossomos e vírus, como no caso do fármaco Sulesomabe, que é um fragmento de AcM marcado com ^{99m}Tc (Barron et al., 1999).

FIGURA 4- Fragmentos de anticorpos: Fab, Fab₂, scFv, Bis-scFv, *Diabody*, *Triabody*, *Tetrabody* e *Minibody* (Holliger et al., 2005).

Atualmente os anticorpos aprovados pelo FDA dos EUA são para uso em doenças auto-imune, alérgicas, infecciosas e oncológicas (Brekke et al., 2003). No entanto, a utilização de anticorpos para atingir microorganismos, na área da Infectologia, fornece uma vantagem quando comparada com a utilização de anticorpos para a Oncologia, pois as diferenças antigênicas entre o hospedeiro e o patógeno tornam o desenvolvimento dos AcMs altamente promissores para tratamento de doenças infecciosas. Diferente do câncer ou de doenças auto-imunes, nos quais o epítipo alvo é um antígeno próprio do paciente, o que pode aumentar as chances de ocorrer efeitos colaterais graves no paciente (Saylor et al., 2009). Como exemplo existe o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), no qual existem diversos AcMs sendo utilizados na clínica (Cetuximabe e Erlotinibe), com o objetivo de tratar câncer de cabeça e pescoço, sendo que como praticamente toda célula normal humana possui o EGFR, estas células serão atingidas erroneamente.

O AcM humanizado palivizumabe (Synagis), é o único anticorpo monoclonal atualmente aprovado para ser utilizado na terapia de uma doença infecciosa. Este anticorpo se liga à proteína F do Vírus Sincicial Respiratório (RSV), inibindo a entrada do vírus na célula do hospedeiro e prevenindo a doença infecciosa, principalmente em crianças e adultos imunodeprimidos (Casadevall et al., 2004). Este fármaco recebeu aprovação regulatória em 1998, sendo que antes a profilaxia desta doença dependia do RespiGam, ou do RSV-IGIV, um soro hiperimune policlonal profilático para a RSV (Wu et al., 2008).

O RespiGam foi substituído porque apresentava atividade específica baixa como desvantagem, sendo necessário administrar um grande volume de solução de anticorpos, elevando a toxicidade no paciente. Contudo como o palivizumabe não apresenta este problema, pois ele apresenta atividade específica elevada, cerca de 50 vezes maior do que o soro policlonal (RespiGam), os efeitos colaterais são menores (Casadevall et al., 2004).

A imunoterapia passiva apresenta atualmente 20 anticorpos ou fragmentos de anticorpos que foram aprovados pelo FDA, representando um mercado financeiro que alcançou em torno de US\$20 bilhões somente no ano de 2010 (Glennie et al., 2003).

1.2.3.1. **Imunoterapia anti-*Staphylococcus aureus* – atuais desenvolvimentos**

A imunoterapia para *S. aureus*, utilizando anticorpos, tem se focado principalmente em pacientes: HIV positivos, oncológicos, com traumas físicos, queimados, que fazem diálise, transplantados, ou que estejam em UTI (Unidade de Terapia Intensiva) (Laupland et al., 2008). É importante para este grupo o tratamento com imunidade passiva, principalmente por serem pacientes imunodeprimidos ou com risco iminente de infecção.

Para a população, é importante que os indivíduos recebam profilaxia com imunização ativa, principalmente indivíduos que estão em ambientes coletivos por longo período de tempo, como militares e atletas, ou profissionais da área da saúde, como enfermeiros e médicos (García-Lara et al., 2009).

Atualmente, não existem métodos eficientes de terapia e profilaxia para a *S. aureus*, demonstrando a importância de serem desenvolvidas imunoterapias mais eficazes, tendo em vista que: (i) a imunoterapia ativa pode resultar em infecções futuras menos danosas aos pacientes; (ii) pacientes com alto índice de anticorpos anti-estafilococos tem menores chances de contrair uma infecção; (iii) e estudos pré-clínicos tem demonstrado que em torno de 80% de animais vacinados com *S. aureus* mortos são protegidos contra a mastite bovina (Projan et al., 2006).

Historicamente tem sido visto que o aumento da eficácia da imunoterapia passiva contra bactérias, incluindo para a *S. aureus*, é alcançado quando esta inibe a aderência bacteriana, promove fagocitose contra o patógeno, neutraliza exoproteínas tóxicas. Além disso, é importante que a solução de anticorpos seja dirigida para um ou mais alvos antigênicos (Patti, 2004).

A patogênese de *S. aureus* é multi-fatorial e esta bactéria apresenta grande quantidade de fatores de virulência, que podem variar entre diferentes cepas. Então os fatores escolhidos para a imunoterapia devem ser essenciais para a vida ou para a virulência do patógeno, diminuindo as possibilidades de desenvolver resistência (García-Lara et al., 2009).

No entanto deve ser levado em consideração que estes epítomos sejam acessíveis ao sistema imune, possuam elevada imunogenicidade na forma purificada e não apresentem toxicidade ao paciente (García-Lara et al., 2009).

1.2.3.2. Perspectivas de Vacinas para *S. aureus*

Algumas estratégias para a imunoterapia da *S. aureus* recomendam utilizar os fatores de virulência conservados nesta bactéria. Além disso, a combinação de vacinas também pode ser um método promissor e pode conferir proteção contra cepas diferentes, minimizando o número e a necessidade de várias imunizações, apresentando baixo custo de administração, e conferindo bom índice de cobertura na população (Stranger-Jones et al., 2006).

Várias análises têm revelado importantes proteínas e peptídeos conservados, que são tanto expressos durante a infecção e que são altamente imunogênicos, sendo assim estes epítomos são promissores (Projan et al., 2006). Como por exemplo, a enzima PBP2a, importante no processo infeccioso por MRSA (Roth et al., 2006).

Embora até o momento existam vários ensaios clínicos e pré-clínicos sendo realizados, ainda não existe nenhuma imunoterapia que se mostrasse eficiente em diferentes modelos animais. Além disso, nenhuma molécula apresentou resultados relevantes para ser aprovada, após estudos clínicos de Fase III. Sendo assim é importante aumentar o entendimento do processo infeccioso, o comportamento do microorganismo *in vivo* e a relação patógeno-hospedeiro, para assim facilitar o desenvolvimento de AcM e vacinas produzidas para profilaxia e terapia.

1.2.3.3. Anticorpo Monoclonal anti-PBP2a

Alguns trabalhos, tem estudado a enzima PBP2a como alvo para imunoterapia passiva ou ativa. Roth e colaboradores analisaram o efeito de vacinas de DNA da PBP2a em camundongos, seguido por dose subletal da bactéria MRSA, por um período de 7 dias. Após este período, foi feita análise do número de colônias bacterianas nos rins dos

camundongos, e foi visto que o grupo imunizado apresentou 1000 vezes menor número de colônias do que o grupo controle (Senna et al., 2003).

O Dr. José Procópio Senna e colaboradores desenvolveram em Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ, um AcM murino anti-PBP2a. Esta imunoglobulina tem sido estudada tanto para terapia como para diagnóstico para MRSA, utilizando o método de imunocromatografia de fluxo lateral (Chagas, 2011).

Este AcM foi produzido de acordo com a técnica de hibridomas descrita por Köhler e Milstein (Kohler et al., 1975), e se apresenta altamente promissor. Para isto foram utilizados camundongos Balb/C, fêmeas, de 4 a 8 semanas, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FioCruz-RJ e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN), também na FioCruz-RJ. O clone selecionado, clone 38 (90/DA5/CB5/AA3 hibridoma 77), foi armazenado em nitrogênio líquido, e para a obtenção do AcM foi feita purificação do sobrenadante de cultura de células (Chagas, 2011).

Este AcM (anti-PBP2a) teve pedido de patente depositado no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) em 2008 e teve um pedido de patente internacional Patent Cooperation Treaty (PCT) em 2010, encontrando-se depositado atualmente em diversos países.

1.3. RADIOIMUNOCONJUGADOS – RADIOIMUNOTERAPIA E RADIOIMUNODIAGNÓSTICO

1.3.1. Aumentando a eficácia dos AcM com radiação

Os AcMs podem ser utilizados para tratamento e diagnóstico tanto sozinhos ou combinados com alguma outra molécula, formando assim os chamados imunoconjugados. Estas imunoglobulinas podem ser ligadas a radionuclídeos, enzimas, medicamentos, toxinas e citocinas, com o objetivo de produzir efeitos combinatórios e entregar especificidade ao tratamento, sem contudo perder a eficiência imunorreativa.

Na Medicina Nuclear os anticorpos são ligados a radionuclídeos, sendo denominados de radioimunoconjugados, podendo ser utilizados tanto na terapia (Radioimunoterapia - RIT) como no diagnóstico (Radioimunodiagnóstico - RID). Estas moléculas são mais utilizadas na área oncológica, mas também pode ser empregadas em doenças neurológicas, cardíacas, infecciosas e inflamatórias (Casadevall et al., 2004; Dadachova et al., 2009).

Para ser alcançada boa eficiência na utilização de radioimunoconjugados são necessários serem levados em consideração alguns fatores importantes e determinantes, tanto para o RID como para a RIT: no caso do anticorpo é importante levar em consideração a especificidade e afinidade pelo epítopo, avidéz, dose e imunorreatividade; em relação ao radionuclídeo são observadas as propriedades de emissão, meia-vida física, meia-vida biológica e estabilidade química do radioimunoconjugado assim como sua farmacocinética e depuração plasmática; com relação ao antígeno é importante analisar a localização do patógeno, a densidade, a heterogeneidade de expressão da enzima alvo, a estabilidade e modulação, e com relação a natureza da infecção (Casadevall et al., 2004; Dadachova et al., 2009).

Atualmente os radioimunoconjugados estão sendo muito utilizados na área oncológica, no entanto na infectologia, esta modalidade ainda está sub-utilizada. Poucos radioimunofármacos foram bem sucedidos na pesquisa clínica, necessitando de mais estudos no desenvolvimento destes fármacos.

Anticorpos ligados a radionuclídeos apresentam eficiência em entregar radiação em tecidos alvos, e existem várias vantagens quando comparado o tratamento destas moléculas conjugadas com a utilização de anticorpos sozinhos, como por exemplo, o efeito *Bystander* (Casadevall et al., 2004). Este efeito ocorre quando as células ou microorganismos que não foram marcados por causa da heterogeneidade das células alvo, recebem radiação de maneira indireta, pela proximidade com o radiofármaco.

Além deste efeito, o efeito sinérgico do radionuclídeo com o efeito do anticorpo também é responsável pela grande eficiência destes tratamentos. A radiação confere efeitos citotóxicos (morte celular) e os anticorpos conferem efeitos citostáticos

(interrupção do ciclo celular), alcançando um efeito terapêutico combinatório (Blackwell Science Ltd, 2000).

1.3.2. A Medicina Nuclear e os Radiofármacos

A medicina nuclear é uma área da medicina que utiliza radiofármacos, podendo estes serem formados por apenas um radionuclídeo (ou um elemento radioativo), como no caso do ^{133}Xe , ou formados pela combinação de uma molécula (ou uma biomolécula) associada a um radionuclídeo, como os AcM marcados com o Tecnécio-99 meta estável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Atualmente mais de 80% dos radiofármacos utilizados para imagens de diagnóstico são compostos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (site 6).

No caso dos anticorpos marcados com radionuclídeos, utilizados no RID, geralmente estes conjugados são utilizados para detectar tumores primários e metastáticos; analisar a eficiência dos tratamentos, detectando a progressão ou regressão da doença; e também para realizar estudos dosimétricos, avaliando a atividade e a dose do radiofármaco no paciente (Biersack et al., 2007).

No tratamento a medicina nuclear pode utilizar radionuclídeos que emitem partículas alfa, como o ^{213}Bi e o ^{211}At ; ou então utilizar radionuclídeos que emitem partículas beta, como o ^{131}I , o ^{90}Y , o ^{177}Lu , dentre outros. No caso do diagnóstico que utiliza a imagem nuclear¹ para detectar patologias, são utilizados radionuclídeos que emitem pósitrons (como o ^{18}F , o ^{64}Cu e o ^{68}Ga) ou então os radionuclídeos que emitem radiação gama (como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o ^{123}I e o ^{111}In).

Os aparelhos utilizados no diagnóstico da medicina nuclear, procedimento que pode ser chamado de radiodiagnóstico ou de radiocintilografia, são as câmaras gama e os aparelhos de Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (Single Positron Emission Computed Tomography - SPECT) que detectam radiação gama, e também podem ser utilizados os aparelhos de Tomografia por Emissão de Pósitrons (Positron Emission Tomography - PET) que detectam pósitrons.

¹Imagem Nuclear: é a análise temporal e espacial dos radiofármacos administrados no paciente.

1.3.3. Método Direto e Indireto de Marcação com ^{99m}Tc

Os radioimunofármacos utilizados para diagnóstico, contendo o ^{99m}Tc , são conjugados a biomoléculas através de dois métodos de marcação: (i) marcação direta e (ii) marcação indireta.

O método indireto utiliza agentes quelantes bifuncionais (AQB) para intermediar a ligação da biomolécula com o radionuclídeo. Os principais AQB's utilizados são o MAG3, o HYNIC, o DOTA, o NOTA, o HMPAO, dentre outros. Neste método também podem ser utilizados Espaçadores, entre o AQB e a biomolécula, com objetivo de afastar a biomolécula do radionuclídeo evitando que ocorra degradação da biomolécula por radiólise (Eckelman et al., 1989) (FIG. 5).

FIGURA 5 - Esquema de uma Biomolécula marcada pelo método indireto: a Biomolécula e o Radionuclídeo são conectados através de um AQB e um Espaçador (Teodoro, 2010).

No método direto, ocorre a ligação do radionuclídeo à biomolécula, sem a utilização de um agente intermediário (o AQB). Sendo que para isto é utilizado um agente redutor, como o 2-Mercaptoetanol (2-ME), que promove a redução e quebra das pontes dissulfetos dos anticorpos, para que nesta região se ligue o radionuclídeo. Logo após é realizada uma purificação, separando o agente redutor da biomolécula, e posteriormente é feito o procedimento de marcação com o radionuclídeo (Mather et al., 1990) (FIG. 6).

FIGURA 6 – Etapas do método direto de marcação: utilizando o 2-ME como agente redutor, o Ácido Metilenodifosfônico (MDP) como agente transquelante e o ^{99m}Tc como radionuclídeo (Mather et al., 1990)

A marcação direta foi utilizada e aperfeiçoada porque na marcação indireta pode ocorrer a ligação do ^{99m}Tc ao grupamento amina da biomolécula, e não no AQB, produzindo com isso radiofármacos instáveis e alterando a especificidade do anticorpo, por se ligar à região hipervariável da imunoglobulina (Eckelman et al., 1990).

A etapa de redução na marcação direta também tem significativa importância pois experimentos feitos sem redução prévia demonstraram que apenas 0,6% de radioimunoconjugado foi formado (Mather et al., 1990). Com a geração dos grupamentos –SH, com o agente redutor, ocorria um aumento significativo do rendimento de marcação e as interações obtidas eram mais fortes e estáveis do que as alcançadas com marcações indiretas (Rhodes, 1991).

Outros fatores como o custo, a complexidade de síntese e de purificação do reagente bifuncional também são desvantagens da marcação indireta, que foram levadas em consideração quando foi aperfeiçoado o método direto (Childs et al., 1985).

1.3.4. Revisão da literatura - Radiofármacos utilizados em Infecção/Inflamação

Ao longo dos anos diferentes radiofármacos foram desenvolvidos e investigados para terapia e diagnóstico de doenças infecciosas, dentre eles o Citrato de ^{67}Ga e Leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, que são os radiofármacos mais utilizados atualmente. Além destes, algumas outras moléculas como HMPAO; anti-granulócitos; IgG não específica; anti-selectina E; lipossomos; peptídeos quimiotáticos; citocinas (como Interferons e Interleucinas); antibióticos e peptídeos anti-microbianos (Ubiquidina) também foram desenvolvidas para serem marcadas por $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{111}In ou ^{18}F (Becker et al., 2001) (TAB. 2).

TABELA 2. Indicações para uso de diferentes Radiofármacos em pacientes com Infecção e Inflamação (Luppeti, 2003)	
INDICAÇÃO	RADIOFÁRMACOS PROPOSTOS
- Febre de origem desconhecida	- ^{18}F -FDG - Citrato de ^{67}Ga - Anticorpos anti-granulócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$
- Osteomielite	
- Ossos Periféricos	- ^{18}F -FDG - Anticorpos anti-granulócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - Leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$
- Coluna Vertebral	- ^{18}F -FDG - Citrato de ^{67}Ga - Imunoglobulina não específica marcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{111}In

- Infecção Pulmonar	- Citrato de ^{67}Ga
- Endocardite	- Leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - Anticorpos anti-granulócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$
- Infecção Vascular	- Leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - Anticorpos anti-granulócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$
- Inflamação e Infecção abdominal	- Leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - Anticorpos anti-granulócitos marcados
- Inflamação Crônica no intestino	- Leucócitos marcados com ^{111}In
- Infecção em transplante renal	- Leucócitos marcados com ^{111}In
- Infecções crônicas (ex. tuberculose e sarcoidose)	- Citrato de ^{67}Ga

Algumas destas moléculas são utilizadas pelo fato de se concentrarem preferencialmente nos locais de infecção e inflamação, do que nos tecidos normais porque em infecções e inflamações ocorrem mudanças fisiológicas no corpo do paciente, como aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e aumento da quantidade de leucócitos (Signore et al., 2011).

Alguns fatores importantes devem ser levados em consideração quando for desenvolvido um radiofármaco para imagem de infecção/inflamação. Dentre estes fatores o radiofármaco deve apresentar: elevado acúmulo e retenção no local da doença; pouco background na imagem; baixos efeitos colaterais; baixo custo de produção, como no caso do $^{99\text{m}}\text{Tc}$; e fácil preparo na radiofarmácia ou no hospital, como no caso do uso dos kits liofilizados (Boerman et al., 2001).

Do ponto de vista clínico, este radiofármaco deve entregar informações importantes, como a localização, a extensão e o avanço da doença. Além disso, é importante que este radiofármaco diferencie um quadro infeccioso de uma inflamação (Boerman et al., 2001).

O citrato de ^{67}Ga foi o primeiro radiofármaco utilizado para imagem de infecção e inflamação, sendo desenvolvido no ano de 1971 (Roivainen et al., 2012). Este radionuclídeo apresenta a sua química semelhante ao elemento Ferro, e por isso é assimilado pelas proteínas transferrina e lactoferrina que estão presentes em leucócitos.

Este radionuclídeo também é captado pelos sideróforos bacterianos, que são estruturas que captam o ferro livre, por isso ocorre alta captação do ^{67}Ga no local infeccioso (Love et al., 2004). Este radionuclídeo também apresenta elevada concentração no local da inflamação por causa do aumento da permeabilidade vascular (Love et al., 2004).

Assim como o ^{67}Ga , eritrócitos e leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{67}Ga também são utilizados para diagnosticar estas doenças infecciosas/inflamatórias. No entanto, estes radiofármacos apresentam algumas desvantagens, como: o elevado tempo de marcação das células e o grande risco de contaminação do material marcado, que pode levar o paciente a desenvolver uma infecção (Signore et al., 2011).

Alguns tipos de peptídeos, como a ubiquidina (UBI) e o peptídeo inibidor da elastase de neutrófilo (HNE) também vem sendo marcados com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, com resultados contraditórios quanto a sua eficiência (Lupetti et al., 2003).

Diferentemente dos peptídeos e de outras biomoléculas, os anticorpos monoclonais e policlonais vem sendo pouco empregados na pesquisa com infecção e inflamação. Os anticorpos desenvolvidos até hoje para infecção/inflamação atingem as proteínas ou células do hospedeiro e não as células do patógeno (Lupetti et al., 2003).

1.3.4.1. Radioimunofármacos Desenvolvidos para Doenças Infecciosas

Atualmente existe somente um anticorpo radiomarcado para ser utilizado no diagnóstico de infecção e inflamação, o LeukoScan, e nenhum, para terapia (Barron et al., 1999; Chopra, 2011). Na FIG. 7 estão representadas algumas atuações dos radioimunofármacos em doenças causadas por fungos e vírus.

FIGURA 7 –Representação esquemática dos mecanismos de ação dos radioimunofármacos contra agentes infecciosos. a) Fungo e b) Vírus (Dadachova et al., 2009).

O fungo demonstrado na FIG. 7, *Cryptococcus neoformans*, tem sido muito estudado, pois este patógeno causa a meningoencefalite em cerca de 6-8% dos pacientes HIV-positivos (Wendel, 2003), e no laboratório apresenta um bom modelo animal de infecção (Schop, 2007). Alguns AcM foram desenvolvidos para atingir determinados polissacarídeos presentes neste microorganismo (Zaragoza et al., 2009), pois foram detectados altos níveis destas moléculas circulando no sangue de camundongos infectados, tanto nos modelos de infecção local como nos modelos de infecção sistêmica (Saylor et al., 2009).

Outros anticorpos monoclonais radiomarcados com ^{213}Bi ou ^{188}Re também vem sendo estudados para tratamento da meningoencefalite, promovendo a morte celular das células fúngicas em estudos *in vitro* (Dadachova et al., 2006; Dadachova et al., 2007).

Estes resultados foram seguidos por estudos *in vivo*, utilizando animais AJ/Cr com infecção sistêmica (Saylor et al., 2009).

As pneumonias fúngicas causadas pelo fungo *Histoplasma capsulatum*, que infectam pacientes imunodeprimidos, tem sido estudadas para tratamento com radioimunofármacos (Dadachova et al., 2004). O anticorpo monoclonal 9C7 (IgM), que tem afinidade pela parede celular deste fungo, foi marcado com o ^{188}Re . Foi visto que em torno de noventa por cento das células fúngicas apresentaram morte celular com esta terapia (Nosanchuck et al., 2003).

O anticorpo D11 radiomarcado com o ^{213}Bi contra a bactéria *Streptococcus pneumoniae* foi analisado *in vivo*. Os camundongos tratados com este radioimunofármaco apresentaram maior sobrevida do que o grupo controle, sendo que os camundongos não tratados morreram de bacteremia entre os dias 1 e 3 após a infecção. A atividade utilizada foi de 2,96 MBq, e cerca de 87-100% dos camundongos sobreviveram, com pouca ou nenhuma toxicidade (Saylor et al., 2009).

Em um estudo, utilizando o anticorpo monoclonal humano 246-D, que atinge a proteína viral gp-41 do HIV, foi feita a marcação com o ^{213}Bi (Dadachova et al., 2006[a]). Este radioimunofármaco promoveu a morte celular de linfócitos ACH-2 e de células mononucleares humanas infectadas com HIV-1. Estudos *in vivo*, através de infecção hepática e infecção peritoneal, promoveram morte celular dependente de dose dos linfócitos infectados (Dadachova et al., 2006).

No caso do RID alguns estudos de marcação de células leucocíticas foram feitos, como no caso da marcação de um anticorpo anti-granulócito (BW250/183) com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Neste estudo foram analisados 106 pacientes com processos de osteomielite e foi visto que este radiofármaco apresentou em torno de 90% de sensibilidade, 84% de especificidade e 87,9% de acurácia (Saylor et al., 2009). Mais estudos são necessários porque o radioimunofármaco apresentou eficácia inferior do que o método padrão usando Leucócitos marcados com HMPAO- $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

1.4. TECNÉCIO

Em 1937, os pesquisadores Perrier e Segré descobriram o elemento Tecnécio, com número atômico 43 (Perrier et al., 1937), tendo sido formado pelo bombardeamento do Molibdênio com dêuterons. O nome tecnécio foi dado pelo pesquisador Paneth, e foi o primeiro elemento artificial sintetizado pelo homem, com o símbolo químico sugerido de Tc. Logo após, o isomerismo nuclear do elemento Tc e a existência do ^{99m}Tc foi descoberto pelos pesquisadores Seaborg e Segré (Banerjee et al., 2001).

O ^{99m}Tc apresenta uma grande importância nos estudos de diagnóstico na medicina nuclear e vem sendo amplamente utilizado ao longo dos anos, por diversos motivos: o ^{99m}Tc apresenta uma grande versatilidade química, com ampla variação nos estados de coordenação; 89% das emissões são de partículas gama na faixa de 140 keV de energia, sendo esta faixa de energia boa para captação e geração de imagem pela técnica SPECT; o tempo de meia-vida de 6 horas, evitando que o paciente seja exposto a altas doses durante o exame; a produção do radionuclídeo pode ser feita por gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, trazendo praticidade aos profissionais da saúde; e o custo baixo, em relação aos outros radionuclídeos (Schwochau, 1994).

Ao longo dos 70 anos de utilização do ^{99m}Tc foram desenvolvidos vários radiofármacos, para serem utilizados no diagnóstico de diferentes doenças ou para analisar a fisiologia de diferentes órgãos. Os principais radiofármacos com ^{99m}Tc utilizados atualmente estão demonstrados na tabela a seguir (TAB. 3).

TABELA 3. Principais radiofármacos com ^{99m}Tc e suas utilizações (Dias, 2010).

<u>RADIOFÁRMACOS</u>	<u>UTILIZAÇÃO</u>
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
Ácido Metilenodifosfônico ou Medronato (MDP)	Imagem óssea
HMPAO	Imagem cerebral
MIBI	Imagem cardíaca
Tetrofosmina	Imagem cardíaca
Peptídeos e Anticorpos	Caracterização de tecido tumoral

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

O tecnécio pertence ao grupo VIIB na tabela periódica e exibe uma química versátil pela capacidade de apresentar 8 diferentes estados de oxidação, apresentando desde o estado -1 ao +7. A estabilidade destes estados de oxidação depende do tipo de ligante e do ambiente químico. Os estados +7 e +4 são os estados mais estáveis e estão presentes na forma de óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos. Além deles o estado de oxidação +5 é o estado mais comumente encontrado nos complexos de Tc, sendo que os baixos estados de oxidação (como por exemplo -1, +1, +2 e +3) são estabilizados em complexação com o ligante específico (Molinski, 1982).

1.4.1. Perspectiva Histórica da utilização do radiofármaco ^{99m}Tc

O primeiro pesquisador que demonstrou a utilização do ^{99m}Tc na medicina para técnicas de contagem no tecido foi o Dr. Shellabarger, do Departamento Médico de Brookhaven (Molinski, 1982). O aumento de pertecnetato na tireóide foi reportado em julho de 1960 pelo Bulletin of the Brookhaven Medical, e em seguida o pesquisador Richards em 1960 foi o primeiro a publicar em um artigo a utilização do ^{99m}Tc como traçador (Richards, 1960).

Após estes trabalhos, que demonstraram a importância do ^{99m}Tc como sendo um radionuclídeo promissor para a medicina nuclear, vários pesquisadores renomados começaram a investigar a utilização de geradores $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, principalmente entre os anos de 1961 a 1964 (Molinski, 1982; Harper et al., 1964; Boyd, 1982).

Em 1964, um artigo sugeriu a utilização do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para escaneamento cerebral (Harper et al., 1964) e durante este período todos os geradores de ^{99m}Tc foram fornecidos pelo Departamento Médico de Brookhaven. Nos anos seguintes, houveram altos investimentos na pesquisa e na qualidade do ^{99}Mo produzido por fissão, e também no *design* dos geradores.

Com o passar dos anos o Departamento Médico de Brookhaven desenvolveu vários novos radiofármacos com o ^{99m}Tc , como por exemplo o ^{99m}Tc -S coloidal, o ^{99m}Tc -DTPA, e também foi desenvolvido o primeiro kit instantâneo para preparo de radiofármacos (Richards, 1965; Smith, 1964; Srivastava et al., 1983). Muitos destes estudos iniciais, que foram realizados pelo pesquisador Harper, demonstraram a importância do uso do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ na localização de tumores cerebrais, e também para imagens da tireoide (Harper et al., 1962).

1.4.2. Gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$

Desde a descoberta da função do ^{99m}Tc , como um provável radionuclídeo para ser utilizado em exames de diagnóstico, ocorreu um crescente interesse na química deste elemento, principalmente com relação aos métodos de obtenção do mesmo, levando a um rápido desenvolvimento do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Schwochau, 1994).

Estes trabalhos começaram quando em 1950, também no Laboratório de Brookhaven, foi encontrada uma impureza radionuclídica a partir do gerador de $^{132}\text{Te}/^{132}\text{I}$, que foi o ^{99m}Tc , com emissão gama de 140 keV (Nowotnik, 1994). As similaridades entre a química do pai e do filho, Te-I e o Mo-Tc levaram ao conceito do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Foram desenvolvidos quatro tipos de geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$: (1) cromatografia por coluna com alumina ácida; (2) extração do ^{99m}Tc com o solvente metiletilcetona; (3)

sublimação dos óxidos do Tc e a (4) eluição do ^{99m}Tc pelas colunas de gel de molibdato de zircônio (Nowotnik, 1994).

Atualmente o método de separação mais utilizado nos geradores, e comercialmente disponível é o sistema de alumina, pois a operação deste gerador envolve um único passo, a eluição do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ utilizando salina estéril. Além disso, este gerador apresenta outras vantagens, como a alta eficiência de eluição, elevada pureza radionuclídica, boa concentração radioativa e fornecimento diário do radionuclídeo.

1.4.3. Primeira Geração dos Radiofármacos com ^{99m}Tc

No início, os radiofármacos de primeira geração do ^{99m}Tc foram desenvolvidos levando em consideração somente propriedades como absorção, distribuição, metabolismo e a excreção. Um exemplo é o complexo $\text{DTPA-}^{99m}\text{Tc}$, que apresenta importante função no diagnóstico renal em estudos de filtração glomerular.

Logo após, com a utilização do Sn^{+2} para reduzir o Tc(VII) para o Tc(V) foi possível a liofilização de diversos reagentes (ligante + Sn^{+2}), aumentando a estabilidade dos reagentes e facilitando a praticidade da marcação. Nesta época também foram feitas outras pesquisas utilizando ácidos graxos, gluconatos, glucoheptonato e o ácido dimercapto-succínico (Nowotnik, 1994). O produto comercial glucoheptonato marcado com o ^{99m}Tc foi aprovado neste período para estudos de diagnóstico renal e cerebral (Richards et al., 1975).

No entanto, com pesquisas extensivas e um melhor entendimento da química do Tecnécio, foram desenvolvidos vários outros complexos utilizando este elemento, sendo estes denominados de radiofármacos de segunda e terceira geração.

1.4.4. Segunda e Terceira Geração dos Radiofármacos com ^{99m}Tc

As pesquisas iniciais com a química do radiofármaco ^{99m}Tc aconteceram sem a utilização de muitos equipamentos e métodos sofisticados, no entanto, estudos posteriores utilizando técnicas analíticas aprimoradas como a Ressonância Magnética Nuclear, a

Espectrometria de Massa e a Difração por Raio-X trouxeram aumento no conhecimento e no desenvolvimento dos complexos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi a técnica mais utilizada no desenvolvimento de novos radiofármacos, sendo que para o desenvolvimento dos radiofármacos de segunda geração foram levadas em consideração características importantes como o tamanho, a carga e a lipofilicidade destes agentes (Bandoli et al., 1982; Fritzberg et al., 1980; Melnik et al., 1987).

Além disso, técnicas analíticas eficientes proporcionaram a descoberta de melhores agentes redutores, maior entendimento da função do pH nas soluções e a melhoria nas formulações dos kits (Troutner et al., 1982; Pandey et al., 1997).

Levando isto em consideração, processos como a síntese e a produção de novos ligantes radiomarcados com o ^{99m}Tc foram facilitados, levando à produção de radiofármacos utilizados principalmente em estudos de perfusão cerebral e funcionamento cardíaco, como o ^{99m}Tc -metoxi isobutil isonitrila [^{99m}Tc -MIBI] (Cardiolite), o ^{99m}Tc -tetrafosmina (Myoview), o ^{99m}Tc -hexametil propileno amino oxima [^{99m}Tc -HMPAO] (Ceretec) e o ^{99m}Tc -etileno dicisteína dietiléster [^{99m}Tc -ECD] (Neurolite) (Zolle, 2007).

Atualmente, os radiofármacos são denominados de radiofármacos de terceira geração e o desenvolvimento destes agentes é baseado na seleção de moléculas que agem dando especificidade ao radionuclídeo, como peptídeos, hormônios e anticorpos. Esta estratégia implica em metodologias de marcação mais aprimoradas, para não provocar distorções estruturais e não promover alterações nas propriedades biológicas das moléculas. No entanto, estes agentes requerem o desenvolvimento de métodos sofisticados de marcação que vão além das tecnologias previamente utilizadas. Por isso a introdução do conceito de agentes quelantes bifuncionais e novos núcleos de ^{99m}Tc , como o ^{99m}Tc -tricarbonila, o ^{99m}Tc -Nitrído, e o ^{99m}Tc -6- hidrazinonicotinamida (^{99m}Tc -HYNIC) (FIG. 8), bem como os complexos que utilizam ligantes mistos (Sundberg et al., 1974).

Os radiofármacos ^{99m}Tc -HYNIC-N'-N''-etilenodiaminodiacético-Try-octreotídeo (^{99m}Tc - HYNIC-EDDA-TOC), desenvolvido a partir do alternativo In^{111} -octreotídeo para o mapeamento de tumores neuroendócrinos (Li-Ling et al., 2001), assim como o agente ^{99m}Tc -TRODAT-1, utilizado para estudos de receptores cerebrais, são os melhores exemplos da terceira geração de radiofármacos de ^{99m}Tc (Kung et al., 2007).

Deve ser levado em consideração que o principal objetivo conquistado ao longo das gerações do ^{99m}Tc , foi o aumento da especificidade do fármaco, facilitando a chegada deste ao órgão alvo, diminuindo com isso a irradiação inespecífica e aumentando a qualidade das imagens.

FIGURA 8 - Núcleos de ^{99m}Tc (A) ^{99m}Tc -tricarbonila, (B) ^{99m}Tc -HYNIC-(tricina)(L) e (C) ^{99m}Tc -nitrido (Teodoro, 2010).

2. **OBJETIVO**

- O objetivo geral do trabalho foi estudar a marcação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a com o ^{99m}Tc , utilizando o método direto de marcação, sendo este radiofármaco desenvolvido para detecção de infecções causadas pela MRSA.

- Especificamente pretendeu-se:
 1. Otimizar os parâmetros de marcação do radiofármaco para encontrar a melhor formulação, que será denominada de formulação otimizada;
 2. Realizar ensaios *in vitro*, para avaliar a manutenção da atividade funcional do anticorpo monoclonal anti-PBP2a após ser feita a redução ou marcação com o radionuclídeo ^{99m}Tc .

3. JUSTIFICATIVAS

➤ A IMPORTÂNCIA DA REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO:

- A bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina tem sido uma grande causadora dos diversos problemas encontrados no sistema de saúde de diversos países, dentre eles o Brasil, tanto pelos altos gastos nos sistemas de saúde quanto pelo grande número de óbitos causados por este microorganismo, principalmente em pacientes imunodeprimidos;
- Existe a necessidade de diagnosticar de maneira rápida e precisa o tipo de infecção no paciente, já que quanto mais rápido o diagnóstico mais eficaz será o tratamento;
- Não existe até o momento, nenhum diagnóstico *in situ* para doenças infecciosas bacterianas;
- É importante a identificação do local exato e a da amplitude da infecção (um ou mais órgãos), para que assim possam ser tomadas as devidas decisões sobre o melhor tratamento, bem como monitorar a evolução deste;
- O radioimunodiagnóstico da MRSA além de possibilitar o acompanhamento do tratamento da doença também pode auxiliar em estudos de dosimetria, caso seja utilizado a radioimunoterapia como tratamento;
- O desenvolvimento e o estudo da marcação deste anticorpo com ^{99m}Tc proporciona grande conhecimento ao grupo, para posteriormente serem realizados estudos da marcação com o ^{188}Re , com objetivos terapêuticos;
- Os resultados obtidos com o AcM murino poderão ser aplicados ao AcM humanizado, a ser empregado em pacientes;
- O projeto promove uma colaboração técnico-científica entre três instituições: o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ e o Instituto Nacional de Câncer (INCa).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. INFRAESTRUTURA E EQUIPAMENTOS

Os procedimentos de redução, purificação e marcação direta do anticorpo monoclonal anti-PBP2a, assim como os ensaios radioquímicos de controle de qualidade foram realizados nos laboratórios da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). Os ensaios de avaliação funcional do AcM foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), em Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ. Logo os equipamentos e reagentes utilizados foram destes dois laboratórios:

- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

- Agitador de tubos tipo Vortex : Vertex, modelo Q1-901
- Balança Analítica : Shimadzu, modelo AUW 220D
- Calibrador de dose : Capintec, modelo CRC-15R
- Contador automático tipo poço, com cristal NaI (TI) : Packard-Canberra, modelo D5002 cobra II
- Espectrofotômetro UV-VISÍVEL : Thermoscientific, modelo EVOLUTION-160
- Espectroscopia gama com detector de Ge hiperpuro : Canberra modelo GX1518, acoplado ao programa Geniepc para análise de dados

- Estufa com microprocessador de controle de temperatura : Fanen, modelo Orion 515
- pHmetro : Digimed modelo DM-20
- Sistema de Purificação de Água : Millipore, modelo ELIX-10
- Balança Analítica, Micronal : modelo B160

- **Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ**

- Espectrofotômetro UV/Vis : Thermo Scientific, modelo NanoDrop 1000
- Fluxo laminar : VECO
- Shaker : IKA Labortechnik, modelo K250 basic
- Leitor de microplacas : Tecan, modelo Sunrise
- Microcentrifuga : Eppendorf, modelo 5415R (5415D)
- Shaker Estufa Incubadora : New Brunswick Scientific's, modelo Innova 44
- Sistema de Eletroforese : Bio-Rad, Cuba vertical Mini Protean II
- Sistema de Transferência mini transblot II Cell : Bio-Rad

4.2. **LISTA DE MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES**

4.2.1. **Matérias-Primas**

4.2.1.1. **Anticorpo Monoclonal Murino (Anti-PBP2a)**

O anticorpo monoclonal anti-PBP2a utilizado neste estudo foi produzido e cedido pelos laboratórios de Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ.

Esta imunoglobulina foi fornecida ao IPEN, sobre a forma liofilizada ou diluída em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ (PBS), pH 7,4. O liofilizado foi ressuscitado em PBS 7,4, para obter o volume final de 1 mL.

4.2.1.2. Geradores de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc

Os geradores de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc IPEN-TEC utilizados foram produzidos pelo IPEN-CNEN/SP. Os geradores possuíam atividade em torno de 37 GBq (1000 mCi).

Estes geradores contém uma coluna com alumina, contendo ⁹⁹Mo, que por decaimento radioativo gera o ^{99m}Tc. Este radionuclídeo é obtido sob a forma de pertecnetato de sódio, estéril e apirogênico, pela eluição do gerador com 6 a 8 mL de NaCl 0,9%, dependendo da concentração radioativa necessária.

4.2.2. Reagentes

- 2-Mercaptoetanol, P.A.: Sigma
- Acetona (C₃H₆O), P.A.: Vetec
- Ácido Clorídrico fumegante a 37%, P.A. : Merck
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) : Promega
- Ácido Gentísico (ácido-2,5-dihidroxibenzóico), P.A. (> 99% de pureza) : Sigma
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) : Merck
- Agar : BD Becton Dickinson
- Agulhas e seringas : BD (Plastipak)
- Cassete de diálise Slide-A-Lyzer 3.500 : Thermo Scientific

- Cloreto de Sódio (NaCl), P.A. (99,5% de pureza) : Merck
- Cloreto Estanoso Dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), P.A. (> 98% de pureza) : Quimex
- Coluna PD-10 de Sephadex G25 médio : Amersham
- Coomassie brilliant blue R-250 : Sigma
- Cromógeno 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) 1% : FioCruz-RJ
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), P.A. (99,9% de pureza) : Merck
- Extrato de Levedura : BD Becton Dickinson
- Filtro Amicon, Membrana em Celulose Regenerada Ultracell, 50 K : Millipore
- Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), P.A. (99% de pureza) : Merck
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), P.A. (99% de pureza) : Merck
- Hidróxido de amônia (NH_4OH), P.A (28-30% de NH_3) : Nuclear
- Hidróxido de sódio (NaOH), P.A. (99% de pureza) : Merck
- Imunoglobulina IgG anti-*mouse* conjugada com peroxidase marcada com HRP : Sigma A 0412
- Imunoglobulina IgG anti-*mouse* conjugada com fosfatase alcalina : Sigma-Aldrich, USA
- L-Cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) : Sigma
- Leite em pó desnatado : Molico - Nestlé
- Membrana de Nitrocelulose 0,2 μm : BIO-RAD
- Metiletilcetona (MEC- $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$), P.A. (99,5% de pureza): Merck
- Microplaca de Elisa, ThermoScientific : NUNC MaxisorpTM
- Nitrogênio gasoso (> 99,9% pureza) : White Martins

- Antibiótico Oxacilina, lote L0477075 : TEUTO
- Padrão de Peso Molecular Kaleidoscope, catálogo 161-0324 : Bio-Rad
- Papel indicador de pH (0-14) : Merck
- Pérolas de vidro
- Pipetas automáticas de 20, 200 e 1000 μL : Gilson modelo Pipetman
- Proteína Recombinante Purificada PBP2a
- Reagente de Ellman, 5,5'-Ditio-Bis (Ácido 2-nitrobenzóico), P.A. : Sigma
- Solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% (NaCl 0,9%) : Soreq
- Soro Albumina Bovino (BSA), Fração V (98% de pureza) : Sigma
- Suporte universal e vidrarias
- Suportes Cromatográficos: ITLC-SG fibra de vidro (PALL), TLC-SG 60 alumínio (Merck) e Papel Whatman 3MM (Whatman)
- Tartarato de Potássio e Sódio tetra hidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), P. A. (99,8% de pureza) : Sigma
- Triptona : BD Becton Dickinson
- Tween 20 : MERCK

4.2.3. Preparo das Soluções

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

Foram formuladas duas soluções iniciais: a solução A – na qual foi pesado 5,516 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, e dissolvido em 200 mL de água (H_2O) deionizada; e a solução B – na qual foi pesado 14,19 g de Na_2HPO_4 , e dissolvido em 500 mL de água deionizada. Em seguida, foram adicionados 95 mL da solução (A), 405 mL da solução (B) e 9 g de

NaCl, e o volume final foi completado para 1 litro de solução com água deionizada. Logo após, o pH foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 6 mol.L⁻¹.

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

Para um litro de solução foram pesados 6,1 g de NaH₂PO₄.H₂O e 8,7 g de Na₂HPO₄, e logo após foi adicionado 1 litro de água deionizada. Para ajustar o pH foi utilizado o NaOH 6 mol.L⁻¹.

4.2.3.3. Solução de Cisteína

Para construção de uma Curva Padrão de Cisteína foi preparada uma solução de cisteína 1,0 mol.L⁻¹, adicionando-se 88mg de L-Cisteína à 500 ml de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0. Logo após, foram feitas as sucessivas diluições (0,75; 0,5 e 0,25 mmol.L⁻¹).

4.2.3.4. Reagente de Ellman (5,5 ditiobis [ácido 2-nitrobenzóico] ou DTNB)

Foi preparada uma solução de reagente de Ellman com concentração de 0,3 mg/ml, na qual 3,0 mg de Reagente de Ellman foi diluído em 10 ml de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ com pH 8,0.

4.2.3.5. Meio Luria-Bertani (LB) líquido

O meio Luria-Bertani (LB) é um meio utilizado para crescimento bacteriano, sendo este formulado com 10 g de Triptona, 5 g de Extrato de Levedura e 10 g de NaCl, para o volume final de 1 litro.

Para esta solução os reagentes foram dissolvidos em 900 mL de água destilada, e foi feita agitação do meio. Logo após, o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 6 mol.L⁻¹, a solução foi avolumada para 1 L e autoclavada.

4.2.3.6. Tampão TE

O Tampão TE foi preparado adicionando 10 mL da solução Tris-HCl 1 mol.L^{-1} pH 7,5 com 2 mL de EDTA 500 mmol.L^{-1} pH 8.0. Logo depois, esta solução deve ser avolumada para 1 litro.

4.2.3.7. Tampão de Amostra

Para 9,5 mL de solução, foi adicionado 3,55 mL de água deionizada; 1,25 mL de Tris-HCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,8; 2,5 mL de glicerol; 2,0 mL de SDS 10% (m/v) e 0,2 mL de azul de bromofenol 0,5% (m/v). Este tampão foi mantido em temperatura ambiente e no momento de uso foi feita diluição 1:2 da amostra em relação ao tampão de amostra.

4.2.3.8. Solução de TBS

Foi preparado um litro de solução de TBS utilizando 500 mL de Tris-HCl pH 7,4; 300 mL de NaCl 5 mol.L^{-1} e 200 mL de água deionizada.

4.2.3.9. Solução de T-PBS

Para o preparo da solução de T-PBS foi diluído 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,424 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,2 g de KH_2PO_4 em 1 L de água deionizada, e o pH foi ajustado para 7,4. Em seguida foi adicionado 500 μL de Tween 20 na solução.

4.3. METODOLOGIA

O procedimento experimental feito aqui seguiu o fluxograma da FIG. 9.

FIGURA 9. Fluxograma da metodologia aplicada

4.3.1. Redução do Anticorpo (Anti-PBP2a)

Os dois métodos de marcação, direta e indireta, promovem de diferentes maneiras a ligação e conjugação de biomoléculas a um radionuclídeo, sendo que a marcação direta, utiliza um agente redutor para promover a redução e quebras de regiões importantes de anticorpos, para assim promover uma reação entre o anticorpo e o radionuclídeo. No caso das marcações indiretas, são utilizados agentes quelantes bifuncionais (AQB) para facilitar a interação entre ambas as moléculas, biomolécula e o elemento radioativo.

A marcação direta apresenta enormes vantagens quando comparada a marcação indireta, como por exemplo o uso de kits de marcação, pois em uma única etapa o radiofármaco está pronto para ser usado no paciente. Com isso aumenta a praticidade e facilidade de preparo do radiofármaco e diminui a exposição dos profissionais da saúde.

Além disso, na marcação direta do anticorpo como existe maior interação e afinidade entre o radionuclídeo e o anticorpo, o radioconjugado se torna menos suscetível a transquelação com outras moléculas no sangue do paciente (Childs et al., 1985).

Em experimentos de marcação direta de anticorpo é necessário inicialmente que sejam reduzidas as pontes dissulfeto presentes no anticorpo, pois será nesta região que ocorrerá a interação do AcM com o radionuclídeo ^{99m}Tc .

Os principais agentes redutores do AcM utilizados ao longo dos anos para marcação direta foram o SnCl_2 , o ácido ascórbico, o DTT, o DTE e o 2-ME (Thakur et al., 1991). O SnCl_2 foi muito utilizado para fazer a marcação “*pretinning*”, que é a redução feita por um período de 18 horas (Rhodes et al., 1982). No entanto, o longo período de incubação torna o radiofármaco desvantajoso, principalmente para ser utilizado na clínica.

A redução do AcM foi feita utilizando o agente redutor 2-ME, que atua quebrando a ligação dos átomos de enxofre presentes entre as ligações de cisteína, sendo que logo após ocorre a ligação de átomos de hidrogênio ao enxofre.

Para isso a metodologia utilizada aqui seguiu a redução realizada por Mather & Ellison (Mather et al., 1990), na qual o AcM, na concentração aproximada de 1,5 mg/mL, foi incubado por diferentes períodos de tempo (60, 90 minutos) à temperatura ambiente, no

próprio frasco em que foi cedido por Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ, variando no entanto a relação molar do 2-ME em relação ao AcM (2-ME:AcM) (2.857, 5.300, 6.302, 6.909, 8.022, 17.067).

Após a redução foi avaliada a quantidade de grupos –SH gerados por anticorpo comparando com as relações molares 2-ME:AcM, os diferentes tempos de incubação e os diferentes lotes de AcM.

Em seguida foi realizada a etapa de purificação do AcM reduzido para retirar o 2-ME em solução, utilizando para isto uma coluna cromatográfica de exclusão de peso molecular (Coluna Sephadex G-25M). Esta etapa é importante para encerrar a reação de redução do 2-ME com AcM, e também pela toxicidade que o 2-ME possui, pois este agente poderia promover danos em células ou animais na qual fosse testado. Além disso, a sua presença pode interferir no método de determinação e quantificação dos grupos –SH livres, pelo espectrofotômetro Ultravioleta/Visível.

O método de purificação utilizado aqui começou a ter maior importância quando foi descrito por Petit e colaboradores (Pettit et al., 1980), que em 1980 utilizaram uma coluna cromatográfica de dextrano (Sephacryl S-200), para separar por exclusão de peso molecular a imunoglobulina IgG do agente redutor (Pettit et al., 1980).

A coluna de Sephadex é uma coluna de purificação cromatográfica que separa as moléculas por exclusão de peso molecular. Como a IgG (150.000 Da) tem maior peso molecular em relação ao 2-ME (78.000 Da), o AcM será coletado nas primeiras frações.

Para o ensaio de purificação com a coluna de Sephadex, a coluna foi equilibrada com um volume 20 vezes maior de PBS 0,1 mol.L⁻¹ nitrogenado, pH 7,4, em relação ao volume do anticorpo. Em seguida a solução de anticorpo reduzida foi percolada na coluna PD-10, seguida pela eluição de 10 mL de PBS 7,4 nitrogenado, sendo coletado de 1 em 1 mL.

A concentração do anticorpo reduzido foi determinada por um espectrofotômetro Ultravioleta/Visível (ThermoScientific - Evolution 160), no comprimento de onda de 280 nm, diluindo uma alíquota de cada fração coletada na coluna Sephadex em uma proporção de 1:10 com tampão PBS.

4.3.2. Construção da curva de calibração do anticorpo e análise da concentração de AcM reduzido

A concentração de anticorpo em cada 1 mL das frações coletadas foi calculada de duas formas, utilizando o coeficiente de extinção molar ou utilizando uma curva de calibração de albumina:

I. UTILIZANDO O COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR

Com o valor obtido da absorbância de cada amostra (A_{280}) foi feita uma divisão pelo coeficiente de extinção molar de IgG a 1 mg/mL, que é $\epsilon_{280} = 1,4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, na seguinte equação:

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

II. UTILIZANDO A CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ALBUMINA

Após a detecção da absorbância no espectrofotômetro UV/Vis com comprimento de onda 280 nm, como citado anteriormente, este valor de absorbância foi lançado na equação da reta gerada pela curva de calibração de Soro Albumina Bovino (BSA). As concentrações utilizadas na curva de calibração foram: 0,15; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,00 mg/mL.

Em seguida as duas amostras que continham maior concentração de anticorpo foram unidas, formando um *pool* de AcM reduzido, para determinar o número de grupos -SH livres e também para uso posterior no processo de marcação.

4.3.3. Determinação dos grupos sulfidrilas livres (-SH)

O Reagente de Ellman, é utilizado para detectar a quantidade de grupos tióis livres em AcM reduzido. Este reagente se liga aos grupos -SH produzindo a molécula 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB⁻), que é posteriormente ionizada para o NTB⁻², formando uma cor amarelada que é detectada no comprimento de onda visível de 408 nm. Esta cor amarelada é interpolada com a curva padrão de cisteína, para fornecer a concentração de

cisteína no *pool* de anticorpos, e logo após são feitos cálculos para analisar a quantidade de grupos –SH.

O Método de Ellman foi desenvolvido e descoberto pelo pesquisador George Ellman (Ellman, 1958; Boyne, 1972), e tem sido muito utilizado ao longo dos anos, inclusive com amostras de tecidos, fluidos corporais ou em soluções contendo anticorpo reduzido (Ellman, 1958). No entanto, alguns autores sugerem a utilização de outros reagentes, como o reagente Ninhidrina, que foi um método desenvolvido por Gaitonde, em 1967, e que também foi utilizado para determinar a quantidade de grupos cisteína (Gaitonde, 1967).

No entanto, o método de Gaitonde possui mais etapas do que o Método de Ellman, como por exemplo, o aquecimento dos reagentes, a utilização de ácido acético, de ácido clorídrico, e também de etanol absoluto, podendo com isso produzir impurezas na quantificação e aumentando também o tempo do experimento (Gaitonde, 1967).

O reagente 5-Iodoacetamidofluoresceína assim como o reagente Ditiodipiridina também foram outros reagentes sugeridos por diversos autores ao longo dos anos (Muddukrishna et al., 1995), para serem métodos alternativos ao reagente de Ellman. No entanto, o método de Ellman ainda continua sendo o método mais prático e eficiente atualmente, por isso foi escolhido para ser utilizado neste trabalho (Hnatowich et al., 1994).

I. ANÁLISE DAS VARIÁVEIS TEMPO E COMPRIMENTO DE ONDA

Antes de ser analisada a quantidade de grupos -SH no *pool* de anticorpo e na curva de cisteína, foi estudado o melhor tempo e o melhor comprimento de onda para serem utilizados na detecção pelo espectrofotômetro. Foi escolhido o tempo e o comprimento de onda que tiveram maior absorbância.

- Análise do Tempo: A cada 5 minutos foi medida a absorbância produzida por uma amostra de 1 mmol.L⁻¹ de cisteína até o tempo de 40 minutos.

- Análise do Comprimento de Onda: foi feita uma varredura com intervalo de 200 a 600 nm de comprimento de onda também com a solução de 1 mmol.L⁻¹ de cisteína em espectrofotômetro UV/Vis.

II. CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE CISTEÍNA

A curva padrão de cisteína foi utilizada para auxiliar na identificação da quantidade de grupos tióis livre, presentes no anticorpo reduzido, relacionando a quantidade de grupos –SH livres com a absorbância em 408 nm.

Para construção da curva padrão de cisteína foram utilizadas as seguintes concentrações milimolares: 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0. No qual 50 µL de cada solução de cisteína foi diluída em 900 µL de PBS 8,0, e 50 µL de Reagente de Ellman.

III. ANÁLISE DOS GRUPOS –SH POR MOLÉCULA DE AcM

As concentrações e volumes deste experimento seguiram as análises dos grupos -SH feitas por Mather & Ellison (Mather, 1990): 50 µL do *pool* de AcM reduzido foi adicionado a 50 µL do Reagente de Ellman (0,3 mg/mL) e avolumado para 1mL com tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0. Esta solução foi analisada no espectrofotômetro em 407 nm, e o valor da absorbância foi lançada na equação da reta da Curva de Calibração de Cisteína.

Após o resultado da equação da reta, este valor foi lançado na Eq. 3, em “**mmol.L⁻¹ interpolado na curva de cisteína**”, e o valor do denominador da equação “**mmol.L⁻¹ de Ac**” é obtido como resultado final da Eq. 2.

Na Eq. 2, o numerador é o resultado da análise da concentração de AcM reduzido (“**mg de Ac/mL**”), e o denominador é o peso molecular da Imunoglobulina G em daltons (Da), considerado 150.000 Da.

$$\text{mmol.L}^{-1} = [(\text{mg de Ac /mL}) / \text{PM IgG}] \times 10^3 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{-SH/mol de Ac} = \frac{(\text{mmol.L}^{-1} \text{ interpolado na curva de cisteína})}{(\text{mmol.L}^{-1} \text{ de Ac})} \quad (\text{Eq. 3})$$

Após as reações de redução e purificação, e as subsequentes análises da concentração proteica do *pool* de anticorpo e dos grupos -SH, os frascos com AcM reduzido foram armazenados em freezer doméstico, com temperatura de -20°C, para com isso evitar a re-oxidação das pontes dissulfeto do AcM (Rhodes, 1991).

4.3.4. Marcação do AcM com ^{99m}Tc

Dentre os métodos de marcação estudados e utilizados atualmente com o ^{99m}Tc foi escolhida a marcação direta, conjugando o anticorpo anti-PBP2a a este radionuclídeo. Foram estudados 2 diferentes tipos de marcação direta para conjugação do AcM com o ^{99m}Tc .

✓ Método I

O Método I utiliza o AcM_{red.}, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, Tartarato de Sódio e Potássio, Ác. Gentísico e $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Ao longo dos anos, vários métodos e reagentes foram utilizados para reduzir o ^{99m}Tc , como o (i) reagente Ditionida de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$); (ii) a utilização de métodos eletrolíticos; ou (iii) a evaporação até a secura, utilizando o ácido clorídrico (Rhodes, 1974; Richards et al., 1975). No entanto, o reagente mais utilizado e também padronizado neste trabalho para reduzir o ^{99m}Tc , pelo método de marcação direta, foi o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

A massa de AcM_{red} é uma variável que está altamente relacionada com o rendimento de marcação, pois tem sido visto em diversos experimentos de marcação que o rendimento de marcação aumenta conforme aumenta a massa da biomolécula, porque a quantidade de anticorpo disponível para se ligar ^{99m}Tc aumenta.

O Tartarato é uma importante molécula que atua como agente transquelante, predispondo o ^{99m}Tc a se ligar ao AcM_{red.}. Esta molécula forma um complexo intermediário com o ^{99m}Tc (^{99m}Tc -Ag. Transquelante), que posteriormente auxilia a ligação do radionuclídeo à biomolécula (^{99m}Tc -Biomolécula) (Sailerova et al., 2003).

A utilização de agentes antioxidantes para o ^{99m}Tc impede que este seja re-oxidado, depois que ocorre a redução com o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Os reagentes antioxidantes mais utilizados são o ácido ascórbico e o ácido gentísico (Ballinger et al., 1988). Neste trabalho foi utilizado e mantida a massa de 0,25 mg de Ácido Gentísico para todas as marcações.

Tendo em vista a função e importância destes reagentes, na primeira formulação foi utilizada a padronização utilizada por Carla Dias durante o trabalho de doutorado (Dias, 2010): 0,85 mg de AcM (anti-PBP2a); 40 mg de Tartarato; 0,5 mg de

$\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (285 μg de Sn^{+2}); 0,25 mg de Ácido Gentísico; e 1 mL de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ com atividade de 185 MBq. Esta reação foi feita por um período de 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a primeira marcação utilizando a formulação acima, as seguintes variáveis foram estudadas com o objetivo de aumentar o rendimento de marcação:

VARIÁVEIS:

- Massa dos reagentes:

- 1) Anticorpo anti-PBP2a reduzido (0,5; 0,85; 1,00 e 1,86 mg);
- 2) Agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (50; 75; 100 e 500 μg);
- 3) Tartarato de Sódio e Potássio Tetrahidratado (somente 40 mg);
- 4) Ácido Gentísico (somente 250 μg);

- **Atividade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$** (39,96; 54,39; 127,65; 167,61; 175,75; 183,15 e 185 MBq)
(1,08; 1,47; 3,45; 4,53; 4,75; 4,95 e 5 mCi);

- **Tempos de marcação** (30, 45 e 60 min.);

- **Temperatura de marcação** (somente Temperatura Ambiente);

- **pH de Marcação** (7,5).

Os reagentes foram inicialmente pesados ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Tartarato e Ácido Gentísico) e dissolvidos, sendo o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em HCl 0,1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e nitrogenado por 10 minutos, e o Tartarato e o Ácido Gentísico dissolvidos em água deionizada.

A ordem de adição dos reagentes foi a seguinte: Tartarato + AcM + Ác. Gentísico + $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, nos volumes, massas e atividades previamente determinados. Após o tempo de reação, foram retiradas alíquotas de AcM marcado para serem feitos o controle radioquímico e as análises do pH.

✓ Método II

Existe uma grande quantidade de agentes tranquelantes utilizados, como por exemplo o Tartarato de Sódio e Potássio, o Ácido Metilenodifosfônico (Medronato), o

Gluconato, o Glucoheptonato e o Glucarato (Pak et al., 1988; Pak et al., 1989). É importante que o agente transquelante forme uma ligação fraca ou média com o ^{99m}Tc , facilitando posteriormente a liberação do radionuclídeo pelo agente transquelante para se ligar ao anticorpo, pois se este agente formar uma ligação forte com o ^{99m}Tc , a ligação do anticorpo com o ^{99m}Tc não será realizada.

No método utilizado pelos pesquisadores Schwarz e Steinstraber, foi utilizado o MDP como agente transquelante, depois de reduzir o anticorpo com 2-ME (Schwarz et al., 1987). Pak e colaboradores utilizaram o glucoheptonato, o tartarato e vários outros análogos como agentes transquelantes para marcar anticorpos, depois da redução com o Ditiotreitol, com o objetivo de marcar fragmentos Fab' (Pak et al., 1989).

Zhang e colaboradores (1992) demonstraram que dentre um grupo de 5 agentes fosfonatos e dois AQB (DTPA e EDTA), o MDP foi o reagente que conferiu melhor rendimento de marcação, tanto em 10 minutos como em 30 minutos. A eficiência de marcação foi de 99,3% no tempo de 10 minutos e 99,2% no tempo de 30 minutos.

Na segunda formulação, denominado de Método II, foi utilizado: AcM reduzido, Pertecnetato de sódio, e um kit comercial liofilizado de marcação do MDP (Site 7), constituído por 10 mg de MDP; 1,2 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2,0 mg de Ácido Paraminobenzóico.

Para este método foi utilizado como referência o tempo de marcação e o volume do kit do MDP utilizado por Carla Dias durante o mestrado (Dias, 2005), no qual o MDP atua como importante agente transquelante.

Na primeira marcação utilizando o Método II foram utilizadas as seguintes condições: 0,5 mg de AcM (anti-PBP2a); 30 μL do kit do MDP, resuspendido previamente em 5 mL de NaCl 0,9% e 1mL de ^{99m}Tc com atividade de 59,2 MBq (1,6 mCi). O volume do kit do MDP representa 7,2 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 60 μg de MDP. A reação foi feita por um período de 30 minutos à temperatura ambiente, e o pH foi mantido em 8,0.

Logo após, foram alteradas as seguintes variáveis:

VARIÁVEIS:

- Massa dos reagentes:

1) Anticorpo anti-PBP2a reduzido (0,2; 0,5 e 0,75 mg);

2) Volume ressuspendido do kit do MDP:

20 µL - 4,8 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,74 µg de Sn^{+2}) e 40 µg de MDP;

30 µL - 7,2 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,11 µg de Sn^{+2}) e 60 µg de MDP;

40 µL - 9,6 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5,49 µg de Sn^{+2}) e 80 µg de MDP;

- **Atividade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$** (somente 59,2 MBq) (1,6 mCi);

- **Tempos de marcação** (15, 30, 60 e 150 min.);

- **Temperatura de marcação** (somente Temperatura Ambiente);

- **pH de Marcação** (8,0).

Para a utilização do kit liofilizado foi feita inicialmente a dissolução do kit com 5 mL de NaCl 0,9%, e logo após, foi retirado 20, 30 ou 40 µL do volume ressuspendido e adicionado ao AcM, de acordo com o volume padronizado na marcação, sendo em seguida adicionado o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.

Também foi analisada a estabilidade do AcM-marcado até duas horas depois da reação.

Após o tempo de reação foram retiradas alíquotas de AcM marcado para serem feitos o controle radioquímico e as análises do pH.

4.3.5. Análise Radioquímica do $^{99\text{m}}\text{Tc(V)}\text{-AcM}_{\text{red}}$

A pureza radioquímica, que reflete o rendimento da marcação foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase estacionária: fitas de vidro

revestidas com sílica gel (ITLC-SG: Instant Thin Layer Chromatography), fitas de alumínio revestidas com sílica gel (TLC-SG/Al: Thin Layer Chromatography Sílica Gel/aluminium Sheets); e fitas de papel (CP) Whatman 3MM.

Para melhor interação das espécies com a fita de vidro revestida com sílica gel (ITLC-SG), estas foram incubadas previamente (24 horas) com BSA 5%, secas a temperatura ambiente e estocadas na geladeira.

Com a finalidade de identificar e encontrar os melhores sistemas cromatográficos para este estudo, foram analisados previamente os fatores de retenção (R_f) de cada espécie ($^{99m}\text{TcO}_4^-$, $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{Tc-AcM}$, $^{99m}\text{Tc-tartarato}$ e $^{99m}\text{Tc-MDP}$) levando em consideração as fases estacionárias (citadas anteriormente) e as fases móveis (Metiletilcetona, Salina 0,9%, solução de Etanol:Amônia:H₂O [2:1:5] e Acetona) (TAB. 4).

TABELA 4. Sistemas cromatográficos analisados, com diferentes fases móveis e fases estacionárias

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

Para avaliar o fator de retenção (R_f) de cada espécie possível de ser produzida na marcação, as seguintes soluções foram submetidas ao controle radioquímico em cada fase estacionária e móvel da TAB. 4:

- (1) $^{99m}\text{TcO}_4^-$: 0,3 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, eluído do gerador, foi diluído para alcançar volume final de 1,5 mL com atividade de 74 MBq (2 mCi).

- (2) **$^{99m}\text{TcO}_2$** : com o objetivo de preparar $^{99m}\text{TcO}_2$, 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi dissolvido com 200 μL de HCl 0,1 mol.L^{-1} e nitrogenado por 10 minutos. Em seguida essa solução foi adicionada a 1 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ eluído do gerador, com atividade de 74 MBq (2 mCi), e foi feita a reação por 10 minutos.
- (3) **$^{99m}\text{Tc-MDP}$** : foi eluído 0,5 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ do gerador com atividade de 370 MBq (10 mCi), em seguida esta amostra foi diluída para o volume de 5 mL com NaCl 0,9%. Logo após, este volume foi adicionado ao kit do MDP liofilizado.
- (4) **$^{99m}\text{Tc-AcM}$** : foi feito conforme descrito na metodologia.

Ao final do tempo de reação estipulado para cada marcação foi retirado uma alíquota do marcado e aplicado tanto no suporte (fitas de 1,5 X 12 cm), a um centímetro e meio da margem inferior, e também foi aplicado em fita de papel de pH. Logo após, o suporte foi colocado em uma cuba de vidro, com a fase móvel correspondente, que por capilaridade ascende até 12 cm do ponto de partida.

Em seguida a fita foi cortada em 10 pedaços, de um em um centímetro a partir do local de aplicação do radiofármaco, e foi medida a atividade de ^{99m}Tc em cada pedaço da fita utilizando o detector de Germânio hiperpuro.

4.3.6. Purificação e Separação das Espécies em Coluna PD-10

A Coluna PD-10 de Sephadex G25-M também foi utilizada para purificar o anticorpo marcado, separando a espécie $^{99m}\text{Tc-AcM}$ das demais espécies, $^{99m}\text{Tc-MDP}$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e o $^{99m}\text{TcO}_2$.

O comportamento individual de cada espécie $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{Tc-AcM}$, e $^{99m}\text{Tc-MDP}$ na coluna PD-10 foi avaliado percolando as espécies (ver item 4.3.5.) pela coluna previamente condicionada.

O preparo prévio da coluna PD-10 foi feito seguindo o protocolo utilizado na purificação do AcM-reduzido, do item 1.5.4. Logo depois foi percolada a amostra marcada, e em seguida foram eluídos mais 30 mL de PBS 0,1 mol.L^{-1} (pH 7,4). Cada

alíquota foi contada no contador de dose, para ser elucidado o perfil de eluição das espécies. A radioatividade da coluna também foi contada para identificar se houve retenção das espécies na coluna.

4.3.7. Avaliação Funcional do AcM-marcado e do AcM-reduzido

Os ensaios de avaliação funcional dos anticorpos monoclonais foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), em Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ, com o objetivo de avaliar as estruturas e as atividades do anticorpo anti-PBP2a marcado (AcM-marcado) e do AcM somente reduzido (AcM-reduzido).

4.3.7.1. Dosagem e Análise da Integridade do AcM-marcado e do AcM-reduzido

✓ Dosagem

A estimativa da concentração de anticorpos e de proteínas totais (mg/mL), nas amostras de AcM-Marcado e AcM-Reduzido, foram feitas com o uso do Espectrofotômetro UV/Vis NanoDrop 1000, em 280 nm. Para isto foram utilizados 2 µL de cada amostra, e como branco foi utilizado PBS 0,01 mol.L⁻¹, pH (7,4).

Além disso, também foi analisado a porcentagem de pureza das amostras de AcM-reduzido e de AcM-marcado, sendo feito pela divisão da concentração de IgG sobre a concentração de proteínas totais, quantificadas pelo NanoDrop. Esta análise é importante porque determina quanto de AcM sofreu degradação, sendo este resultado levado em consideração até mesmo para liberação de biomoléculas pela ANVISA, para serem utilizadas em pacientes.

✓ Solubilidade

Foi realizado uma centrifugação das amostras de AcM-marcado e do AcM-reduzido por 5 minutos à 14.000 rpm, na microcentrífuga Eppendorf.

Após isto, foram unidas as 7 amostras do AcM-marcado, formando um pool de 9 mL, que foi submetido à diálise *overnight*, utilizando um Cassete de Diálise, imerso em 4 litros de tampão fosfato, PBS 0,5 mmol.L⁻¹ pH 7,4. Esta solução tampão foi mantida sobre leve agitação, e foi trocada por duas vezes.

Ao final da diálise, a amostra de anticorpo foi retirada do Cassete e foi feita concentração do *pool* em filtro Amicon Ultracell 50K, utilizando centrifugação de 3.000 rpm por um período de 5 minutos. Logo após, esta amostra dialisada e concentrada foi novamente quantificada no NanoDrop.

✓ Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) Não Redutor

As amostras foram submetidas a eletroforese em um sistema Mini-Protean, utilizando gel SDS-PAGE 12% com espessura de 1 mm, por aproximadamente 120V por 90 minutos. Tendo sido aplicado no gel 2,5 µg do AcM reduzido e 2,5 µg do AcM marcado diluída em água com tampão de amostra. Em cada ensaio foi reservado uma posição no gel para aplicação do padrão de peso molecular, para comparação com os anticorpos.

Ao final do processo este gel foi revelado com solução corante composta de Coomassie brilliant blue R-250 0,2% na mistura de metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v). A solução descorante utilizada foi metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v).

4.3.7.2. Avaliação da Atividade e da Afinidade de Ligação do AcM-marcado e do AcM-reduzido

✓ Immunoblotting

As amostras de proteína recombinante e lisado de MRSA foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE 12%, em seguida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em um sistema de transferência, com 90V por 60 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com *ponceau* para observação das bandas, e foi cortada, para ser incubada individualmente com cada amostra de anticorpo.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução TBS contendo 10% de leite em pó desnatado e 1% de BSA, sobre agitação à temperatura ambiente durante 2 horas. A incubação das membranas foi feita com o AcM-reduzido, o AcM-marcado ou o AcM não marcado e não reduzido (controle) à 37°C, durante um período de 12 horas, utilizando 2,5 µg de cada amostra. As lavagens foram feitas com solução de Tween 20 (0,05%) em TBS após cada etapa de incubação.

Na incubação com anticorpo secundário foi utilizado IgG anti-*mouse*, na diluição 1:10.000 (v/v) em solução 0,5% BSA + 1% de leite desnatado em TBS, por 2 horas. As membranas foram lavadas novamente, e incubadas com Imunoglobulina IgG anti-*mouse* conjugada com fosfatase alcalina, até a identificação visual das bandas. A reação foi interrompida pela adição de água destilada. Foram utilizadas as amostras do lisado de MRSA e da PBP2a recombinante purificada para analisar a afinidade de ligação à enzima PBP2a íntegra e analisar a ligação somente ao sítio de ligação do AcM anti-PBP2a, que está presente no lisado e na PBP2a recombinante, respectivamente.

- Preparo do lisado de MRSA

Inicialmente, para a obtenção do lisado de MRSA foi utilizado um pré-inóculo a partir de uma (1) colônia bacteriana da cepa COL em meio de cultura Luria-Bertani (LB), cultivado overnight a 37°C, sob constante agitação de 120 rpm em uma incubadora INNOVA 44. No dia seguinte, o pré-inóculo foi diluído 1:100 (v/v) em meio LB, e também foi submetido à agitação de 120 rpm a 37°C, para que alcançasse densidade óptica aproximada de 1,1 em 600 nm, que corresponde a aproximadamente 10⁸ bactérias/mL (fase exponencial de crescimento). Logo após, estas amostras foram resuspendidas com 100 µL de tampão TE e foi utilizado 50 mg de pérolas de vidro para promover a lise celular deste inóculo bacteriano. Em seguida foi feita centrifugação, separação do sobrenadante e a incubação deste material com 25 µL de TE + 25 µL SDS 10%, em agitação suave por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi aplicado no gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, 15 µL de lisado junto com tampão de amostra (concentrado 4X) em 6 slots, além de uma amostra de padrão de peso molecular.

- Preparo da proteína recombinante PBP2a

A proteína recombinante purificada foi produzida no laboratório de tecnologia recombinante LATER em Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ, sendo utilizado o lote CI 24.04.09, com concentração de 0,34 mg/mL. Foi adicionado 2,5 µg de PBP2a no gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, em 6 *slots*, além de uma amostra de padrão de peso molecular.

✓ Imunoensaio Enzimático (ELISA) Direto

O ELISA foi utilizado para analisar a afinidade de ligação do AcM-reduzido e do AcM-marcado à enzima PBP2a. Esta metodologia foi seguida conforme descrito por Senna e colaboradores (Senna et al., 2003).

Inicialmente foram adicionados 0,25 µg/poço da proteína recombinante purificada PBP2a diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 em microplaca NUNC Maxisorp, sendo feita incubação *overnight* a 4°C para adsorção do antígeno.

No dia seguinte, foram efetuadas 3 lavagens com T-PBS, e em seguida foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas, utilizando 200 µL/poço de PBS-milk 5% (PBS 0,5 mmol.L⁻¹ pH 7,4 e leite desnatado 5%), com incubação a 37°C por 2 horas. Após isto a solução de bloqueio foi desprezada e foram efetuadas 3 lavagens com T-PBS.

O AcM-reduzido, o AcM-marcado e o anticorpo não marcado (controle), foram diluídos em PBS-milk 5% e adicionados no volume de 100 µl por poço, seguido por diluições seriadas, para a concentração final de 50, 25, 12,5 e 6,2 ng por poço. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C, e após 3 lavagens com T-PBS foi adicionado 100 µL/poço da imunoglobulina anti-mouse conjugada HRP, diluída 1:5000 em PBS-milk 5%, incubado por 90 minutos a 37°C. Finalmente foram realizadas as últimas 3 lavagens com T-PBS e foi adicionado 100 µL/poço do cromógeno Tetrametilbenzidina 1%, pelo tempo de 10-15 minutos.

A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 mol.L⁻¹ e as densidades óticas determinadas a 450 nm em leitor de microplacas.

As análises de cada amostra foram feitas em duplicata, e os resultados finais correspondem a média das amostras, subtraindo o valor do controle da reação (branco).

✓ Ensaio de Neutralização *in vitro*

Neste experimento, foi feito o estudo da neutralização bacteriana da cepa COL da MRSA (UFC/mL), em presença do AcM-reduzido e do AcM-marcado, comparado ao controle (AcM anti-PBP2a não marcado e não reduzido).

Um pré-inóculo de uma (1) colônia bacteriana da cepa COL em 10 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) com 20 µg/mL de oxacilina foi incubado *overnight* a 37°C, sob constante agitação de 120 rpm em uma incubadora INNOVA 44. Após este período, 50 µL do pré-inóculo foi diluído em 10 mL de meio LB por um período de 4 horas, para que alcançasse densidade óptica aproximada de 1,1 em 600 nm, que corresponde a aproximadamente 10⁸ bactérias/mL (fase exponencial de crescimento). Uma alíquota foi diluída e semeada em placas de agar de Luria e incubadas *overnight* a 37°C. No dia seguinte as colônias foram contadas e foi calculado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) / mL.

A seguir foram preparadas em tubos Falcon de 50 mL, três amostras, contendo aproximadamente 5 X 10⁴ UFC, em 5 mL de meio LB. Sendo utilizado uma amostra como controle, e as outras duas amostras para análise do AcM anti-PBP2a não marcado e não reduzido (5 mL de meio LB + inóculo bacteriano + 100 µg de AcM) e para análise do AcM-marcado (5 mL de meio LB + inóculo bacteriano + 100 µg de AcM). Estas amostras foram incubadas por 4 horas sobre agitação de 120 rpm à temperatura de 37°C. Logo após, foram coletadas alíquotas de 100 µL da cultura bacteriana nas 3 amostras, no tempo zero (inóculo) e 4 horas após incubação. Estas alíquotas foram diluídas e semeadas em duplicata em placas de Petri contendo o meio sólido ágar LB (20 µg/mL de oxacilina). As placas foram incubadas a 37°C durante 12 horas e as colônias obtidas foram quantificadas para definir a concentração de bactérias (UFC/mL).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. REDUÇÃO DO AcM (ANTI-PBP2a)

Foram feitas 6 reduções de soluções de AcM, sendo estas soluções derivadas de 4 lotes diferentes. A quantidade de reduções diferenciou do número de lotes porque alguns lotes foram divididos em duas ou três reduções, para haver maior possibilidade de variação do tempo e da relação molar 2-ME:AcM nas reações de redução. Os diferentes lotes utilizados foram das datas: 28.04.10; 07.05.10; 07.07.11 e 30.11.11.

Os tempos de incubação escolhidos foram 60 e 90 minutos, pois o período de incubação recomendado na literatura, utilizando o 2-ME, é entre 30-90 minutos (Thakur et al., 1991; Rhodes, 1991).

O volume das soluções de AcM tinham entre 0,8 e 1,5 mL, para que fosse mantido na coluna PD-10 o padrão de eluição das amostras reduzidas.

5.2. PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE AcM-REDUZIDO

5.2.1. Purificação Utilizando a Coluna PD-10

Com o objetivo de retirar o excesso de 2-ME da solução de AcM_{red.}, depois da redução do AcM, foi feita purificação por exclusão de peso molecular com a coluna Sephadex PD-10 (Rhodes et al., 1982).

No condicionamento da coluna PD-10 foi feito um preparo inicial utilizando PBS pH 7,4, nitrogenado por 30 minutos, que tem como objetivo retirar a solução de transporte e o oxigênio presente na coluna, pois o oxigênio pode re-oxidar o AcM_{red}.

A FIG. 10 demonstra a absorbância de cada fração no processo de purificação do AcM reduzido.

FIGURA 10. Absorbância em 280 nm por cada fração coletada de AcM reduzido

As maiores absorbâncias detectadas foram das frações 3 e 4, como identificado nos protocolos de TecDoc do IAEA (IAEA, 1997) e no trabalho de Carla Dias (Dias, 2010), com isso estas foram as frações coletadas para fazer o *pool* de anticorpo. Além disso, também foi visto no trabalho de Carla Dias que o agente redutor 2-ME estava presente principalmente nas frações 7 e 8, sendo confirmado por HPLC.

5.2.2. Análise da Concentração de AcM-Reduzido

5.2.2.1. Utilizando o Coeficiente de Extinção molar da IgG

A FIG. 11 demonstra os valores de concentração do AcM em cada fração calculados pela Eq. 1.

FIGURA 11. Concentração proteica do AcM_{red.} em comprimento de onda de 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de IgG a 1 mg/mL.

Com isso na FIG. 11 pode-se ver que a massa de AcM nos 2 mL, que compreendem o Pool de AcM, é de 2,84 mg.

5.2.2.2. Utilizando a Curva de Calibração de Albumina

Embora as maiores absorbâncias e concentrações de anticorpo corresponderam as frações esperadas, a concentração total de anticorpos não corresponderam as concentrações fornecidas pelo laboratório de Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ. Uma outra

análise para detectar a concentração de anticorpo, foi feita utilizando para isto uma curva padrão de albumina. A FIG. 12 mostra a curva de calibração.

FIGURA 12. Curva de Calibração de Albumina: Absorbância X Concentração de Albumina.

A FIG. 13 demonstra o cálculo da concentração proteica utilizando a curva de calibração.

FIGURA 13. Concentração proteica do AcM_{red}. em comprimento de onda de 280 nm, utilizando a Curva de Albumina.

Os valores calculados pela curva de calibração ficaram mais próximos daqueles fornecidos por Bio-Manguinhos/FioCruz-RJ, e foram assumidos neste trabalho. A massa total nos 2 mL foi de 3,4 mg.

5.3. ANÁLISE DA QUANTIDADE DE GRUPOS SULFIDRILAS (-SH) GERADOS POR REDUÇÃO DE ANTICORPO

5.3.1. Análise do Comprimento de Onda

Após a quantificação proteica de anticorpo reduzido, foi analisada a quantidade de grupos -SH gerados no AcM. Sendo que para isto foi utilizado o aminoácido cisteína, que possui um grupo -SH que interage com outra cisteína, formando uma Ponte Dissulfeto. Este aminoácido por apresentar um grupo sulfidrila é utilizado para fazer a curva padrão de cisteína, utilizando o Reagente de Ellman, para logo após quantificar os grupos -SH do AcM_{red.}.

Inicialmente foi padronizado o melhor tempo e comprimento de onda necessários para analisar os grupos -SH gerados com o reagente de Ellman. Nesta análise foi utilizada uma solução de 1 mmol/L⁻¹ de cisteína e no primeiro experimento foi feita uma varredura com esta solução no comprimento de onda de 200-600 nm (FIG. 14).

FIGURA 14. Curva de Absorbância X Comprimento de Onda da solução de cisteína 1mmol.L⁻¹, em Espectrofotômetro UV/Visível.

O comprimento de onda com máxima absorbância foi de 407 nm, no espectro visível de energia, sendo este comprimento de onda utilizado em várias análises e recomendado em vários protocolos na literatura, para quantificação dos grupos –SH (Castiglia et al., 1995). Este valor foi adotado neste trabalho.

5.3.2. Análise do Tempo

A seguir foi analisado o melhor tempo de reação para quantificar os grupos –SH, utilizando a mesma solução de cisteína 1 mmol/L^{-1} e no comprimento de onda de 407 nm. Para isto foram analisados os tempos de: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 minutos, como demonstrado na FIG. 15.

FIGURA 15. Curva de Absorbância X Tempo de Reação da solução de cisteína 1 mmol.L^{-1} , em Espectrofotômetro UV/Visível à 407 nm.

Nesta análise não houve diferença significativa entre os tempos de incubação e a absorbância, logo por praticidade foi escolhido o tempo de 5 minutos.

Mather e colaboradores, que também utilizaram o Reagente de Ellman para quantificar os grupos –SH, utilizaram comprimento de onda e o tempo de reação próximos

aos utilizados neste trabalho, com absorvância de 405 nm e o tempo de 15 minutos (Mather, 1990).

5.3.3. Construção da Curva Padrão de Cisteína

Para utilizar o método de Ellman na quantificação dos grupos -SH, inicialmente foi preparada a Curva Padrão de Cisteína, cujo resultado está sendo demonstrado na FIG. 16.

FIGURA 16. Curva Padrão de Cisteína (0,25; 0,5; 0,75 e 1 mmol.L⁻¹), 5 minutos de reação e comprimento de onda de 407 nm.

A Curva Padrão de Cisteína obteve ótimo coeficiente de correlação linear, sendo $R^2 = 0,9976$.

5.3.4. Resultado da Quantidade de Grupos -SH Gerados por Redução de Anticorpo

Mather e Ellison (1990) viram que quando não é feito o processo de redução do AcM menos do que 1 grupo -SH seria gerado por molécula de anticorpo. Thakur e colaboradores (1991) compararam um grupo de agentes redutores (SnCl_2 , 2-ME, Ácido ascórbico, Ditiotreitól, Ditioeritritol) e viram que o agente redutor que produziu melhor rendimento de marcação foi o Ácido ascórbico (AA), promovendo 95% de rendimento de marcação em uma relação molar de 3.500:1 (AA:AcM). No entanto, estes resultados foram criticados por outros autores por não serem reprodutíveis (Hnatowich et al., 1994).

Neste trabalho a reação de redução e quantificação dos grupos -SH seguiu os parâmetros utilizados por Mather e Ellison (1990). A TAB. 5 mostra os valores dos número de grupos -SH obtidos em cada redução do AcM. A FIG. 17 correlaciona o número de -SH gerados e a relação molar 2-ME:AcM.

FIGURA 17. Relação molar 2-ME:AcM em comparação a quantidade de grupos -SH gerados

Pela TAB. 5 pode-se observar que a mudança de tempo para 90 minutos de incubação para uma mesma razão molar aumenta o número de grupos -SH. Além disso, o aumento da razão molar leva a um grande aumento no número de grupos -SH.

Os anticorpos IgG apresentam em torno de 4 a 6 pontes dissulfídricas intercadeias e 12 intracadeias, e um total de 72 cisteínas por anticorpo, com isso existe um total de 36 grupos –SH por molécula de anticorpo. Neste trabalho foi encontrado uma média de 16% de grupos –SH reduzidos na maioria das reduções realizadas (TAB. 5) e um máximo de 35%.

TABELA 5. Relação das reduções do AcM com os Lotes de Anticorpo, Massa de Anticorpo, Volume do Anticorpo, Tempo de Incubação, Relações Molares de 2-ME:AcM e a quantidade de grupos –SH gerados.

	1ª REDUÇÃO	2ª REDUÇÃO	3ª REDUÇÃO	4ª REDUÇÃO	5ª REDUÇÃO	6ª REDUÇÃO
Tempo (min.)	60	90	90	90	90	90
Rel. Molar 2-ME:AcM-m calculada	6.302	2.857	5.300	17.067	8.022	6.909
Lote do Anticorpo	28.04.2010	28.04.2010	07.05.2010	07.07.2011	07.07.2011	30.11.2011
Volume de Anticorpo (mL)	1	1	1	1	0,8	1
Massa de Anticorpo (mg)-m calculada	3,386	7,460	4,019	1,249	2,661	2,481
-SH/mol de Ac	4,52	4,66	6,75	11,77	5,76	6,82

5.4. ANÁLISE RADIOQUÍMICA DO $^{99m}\text{Tc-AcM}_{\text{red}}$ E DAS ESPÉCIES ENVOLVIDAS NA REACÃO

Os resultados das análises do comportamento de cada espécie radioquímica com os sistemas cromatográficos estão na TAB. 6.

TABELA 6. Valores dos Rf das espécies contendo $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nos diversos sistemas cromatográficos.

Espécie Radioquímica	NaCl 0,9%	MEC	ACETONA	EtOH:NH ₄ OH:H ₂ O
	ITLC-SG fibra de vidro, TLC-SG (Al) e Papel Whatman 3MM	Papel Whatman 3MM	ITLC-SG fibra de vidro em BSA 5%	
	Rf	Rf	Rf	Rf
$^{99m}\text{TcO}_2$	0,0	0,0	0,0	0,0
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1,0	1,0	1,0	1,0
$^{99m}\text{Tc-MDP}$	1,0	0,0	0,0	1,0
$^{99m}\text{Tc-Tartarato}$	1,0	0,0	0,0	1,0
$^{99m}\text{Tc-AcM}$	0,0	0,0	0,0	1,0

Os sistemas cromatográficos escolhidos para o **Método I** foram:

- Fita TLC-SG (Al) com solvente NaCl 0,9% para as impurezas (Tartarato- ^{99m}Tc e $^{99m}\text{TcO}_4^-$) – Rf 1,0; fita TLC-SG (Al) com solvente de MEC para a espécie $^{99m}\text{TcO}_4^-$ – Rf:1,0; e fita ITLC-SG fibra de vidro com solvente EtOH:NH₄OH:H₂O para a espécie reduzida ($^{99m}\text{TcO}_2$) – Rf 0,0.

E para o **Método II**, foram utilizados:

- Fita de papel Whatman 3MM com solvente NaCl 0,9% para as impurezas (MDP- ^{99m}Tc e $^{99m}\text{TcO}_4^-$) – Rf 1,0; fita Whatman 3MM com solvente de Acetona para a espécie $^{99m}\text{TcO}_4^-$ – Rf 1,0; e fita ITLC-SG fibra de vidro com o solvente EtOH:NH₄OH:H₂O para a espécie reduzida ($^{99m}\text{TcO}_2$) – Rf 0,0.

Na FIG. 18, está representada uma análise cromatográfica da espécie $^{99m}\text{TcO}_2$, utilizando diferentes fases móveis (MEC, Salina 0,9% e solução de EtOH:NH₄OH:H₂O) e

diferentes fases estacionárias (fitas TLC-SG (Al), ITLC-SG e papel Whatman 3MM), representando o que foi feito para todas as espécies.

FIGURA 18. Análise de diferentes sistemas cromatográficos para a espécie hidrolizada reduzida ($^{99m}\text{TcO}_2$): A) TLC-SG (Al) com MEC; B) papel Whatman 3MM com MEC; C) TLC-SG (Al) com solução salina 0,9%; D) papel Whatman 3MM com solução salina 0,9%; e E) fita ITLC-SG fibra de vidro com solução EtOH:NH₄OH:H₂O

5.5. MARCAÇÃO DIRETA - VARIÁVEIS E ANÁLISE RADIOQUÍMICA UTILIZANDO CP E CCD

5.5.1. Método I

5.5.1.1. Variação da Massa do Agente Redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

A FIG. 19 mostra a variação do rendimento de marcação com a massa do agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

FIGURA 19. Pureza radioquímica (%) das espécies em relação as diferentes massas do agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 50 µg (26,30 µg de Sn^{+2}); 75 µg (39,45 µg de Sn^{+2}); 100 µg (52,61 µg de Sn^{+2}) e 500 µg (263,05 µg de Sn^{+2}), no Método I.

Os melhores resultados foram obtidos com 50 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que corresponde a 26 µg de Sn^{+2} . Muitos pesquisadores utilizam entre 10 e 40 µg de Sn^{+2} (Rhodes, 1974; Castiglia et al., 1995).

5.5.1.2. Varição da Massa do AcM_{red.} (anti-PBP2a)

Outra variável importante nos experimentos de marcação foi a massa do anticorpo, pois inicialmente foram feitos experimentos com 0,85 mg de AcM, sendo que em seguida a massa foi aumentada para 1,00 e 1,86 mg, como demonstrado na FIG. 20.

FIGURA 20. Pureza radioquímica (%) das espécies em relação às diferentes massas do AcM-anti PBP-2a: 0,50 mg; 0,85 mg; 1,00 mg e 1,86 mg, no Método I.

No experimento em que foi utilizado 0,5 mg de AcM, foi obtido rendimento de marcação de 32%, havendo grande quantidade de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Os maiores rendimentos de marcação foram alcançados com 1,00 e 1,86 mg de AcM, sendo alcançado 63% e 57% de rendimento de marcação, respectivamente.

5.5.1.3. Varição do Tempo (minutos)

Em seguida, como mostra a FIG. 21, foram variados os tempo das marcações (30, 45 e 60 minutos), sendo visto que os melhores rendimentos foram obtidos nos tempos de 30 e 60 minutos, alcançando 54% de $^{99m}\text{Tc-AcM}$ para ambos. No caso do tempo de reação de 45 minutos, o rendimento foi baixo (23%), provavelmente por causa da elevada

massa de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (100 μg) utilizada nesta reação, diferente das massas usadas nos tempos de 30 e 60 minutos (50 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Estudos feitos por Mather e Ellison (1990) demonstraram que o maior rendimento de marcação alcançado, utilizando a marcação direta com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, foi no tempo de 30 minutos.

FIGURA 21. Pureza radioquímica (%) das espécies em relação aos diferentes tempos de reação (minutos): 30, 45 e 60, no 1º Método de marcação.

5.5.1.4. Variação da Atividade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Logo após, foi variada a atividade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, sendo analisadas as seguintes atividades: 39,96; 54,39; 127,65; 167,61; 175,75; 183,15 e 185 MBq (1,08; 1,47; 3,45; 4,53; 4,75; 4,95 e 5 mCi), como demonstrado na FIG. 22.

FIGURA 22. Pureza radioquímica (%) das espécies em relação a atividade do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em MBq: 39,96; 54,39; 127,65; 167,61; 175,75; 183,15 e 185, no Método I de marcação.

Os rendimentos de marcação foram semelhantes para as atividades de 39,96; 127,65; 167,61; 175,75 e 183,15 MBq, alcançando uma média de 58%. Os menores rendimentos (32% e 22%) foram obtidos nas atividades de 54,39 e 185 MBq, respectivamente. O maior rendimento obtido, de 63%, foi alcançado com a atividade de 127,65 MBq (3,45 mCi).

As melhores condições obtidas no Método I foram: 1,0 mg de AcM; 50 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 127,65 MBq de atividade do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e 30 minutos de marcação, com máximo rendimento de 63%.

5.5.2. Método II

Levando em consideração que os maiores rendimentos de marcação alcançados foram em torno de 60%, e que a pureza radioquímica padronizada é $\geq 90\%$ foi utilizado outro método de marcação, no qual o MDP é utilizado como agente transquelante.

A primeira marcação procedida com este kit teve como referência a marcação mais eficiente feita na dissertação de mestrado de Carla Dias, sendo utilizado o mesmo tempo de marcação e o mesmo volume do kit do MDP (Dias, 2005): 0,5 mg de AcM; 30 μL do kit de MDP e 59,2 MBq (1,6 mCi) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, reagindo por um período de 30 minutos. Sendo que para o kit do MDP, inicialmente foi resuspendido o reagente liofilizado em 5 mL de NaCl 0,9%, e logo depois foi utilizado 20, 30 ou 40 μL do volume ressuspendido, na marcação do AcM.

5.5.2.1. Variação do volume do kit de MDP

A FIG. 23 demonstra o rendimento de marcação em relação ao volume utilizado do kit de MDP (20, 30 e 40 μL). Estes volumes correspondem as massas de 4,8 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,74 μg de Sn^{+2}) e 40 μg de MDP; 7,2 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,116 μg de Sn^{+2}) e de 60 μg de MDP; e de 9,6 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5,49 μg de Sn^{+2}) e de 80 μg de MDP, respectivamente.

FIGURA 23. Pureza radioquímica (%) das espécies em relação ao volume retirado da solução de 5 mL do kit do MDP: 20 μL , 30 μL e 40 μL , no Método II.

Os rendimentos obtidos com as variações do kit do MDP foram entre 83-93%, no qual o melhor rendimento obtido foi com 20 μL do kit (93%).

5.5.2.2. Variação do Tempo de Reação

Em seguida foi analisado o melhor tempo de marcação, sendo utilizadas as incubações de 15, 30, 60 e 150 minutos (FIG. 24). O melhor tempo de incubação foi alcançado em 15 minutos de marcação (93%), que coincide com o tempo recomendado na Bula de Preparo do kit do MDP (Site 7). O experimento com tempo de marcação de 150 minutos, obteve o menor índice de rendimento (23,71%), provavelmente por causa da baixa estabilidade do radioimunoconjugado.

FIGURA 24. Pureza radioquímica (%) das espécies em relação aos diferentes tempos de reação (minutos): 15, 30, 60 e 150, no Método II.

5.5.2.3. Variação da massa do AcM (anti-PBP2a)

Como última variável analisada foi verificada a influência da massa de anticorpo anti-PBP2a, em miligramas, no rendimento de marcação (FIG. 25).

FIGURA 25. Pureza radioquímica (%) das espécies em relação as diferentes massas do AcM-anti PBP-2a: 0,20 µg; 0,50 µg e 0,75 µg, no Método II.

O melhor rendimento (93%) obtido foi com a massa de 0,5 mg de AcM, diferente do Método I. As outras massas utilizadas (0,2 e 0,75 mg) alcançaram rendimento de marcação muito baixo (3% e 23%).

Com isso o melhor rendimento utilizando o kit do MDP foi com as seguintes condições: 20 µL do kit do MDP; 0,5 mg de Anticorpo anti-PBP2a reduzido e 15 minutos de marcação, com valor de rendimento de 93%.

5.5.3. Estabilidade

A padronização com melhor rendimento de marcação feito anteriormente não se mostrou reprodutível quando foi alterado o sistema cromatográfico do $^{99m}\text{TcO}_4^-$, sendo assim foram utilizadas as seguintes condições para analisar a estabilidade do AcM- ^{99m}Tc : 0,5 mg de AcM; 10 µL do Kit do MDP; 75,48 MBq (2,04 mCi) de atividade de ^{99m}Tc ; durante 15 minutos de marcação. Nestas condições o rendimento obtido foi de 73,5%, e este radiofármaco manteve a estabilidade após 2 horas, obtendo rendimento de marcação de 73,22%.

Estas condições, citadas acima, foram as que obtiveram melhor rendimento de marcação neste trabalho.

5.5.4. Purificação e Separação das espécies em coluna PD-10

Como o rendimento de marcação foi somente de 73,5%, e a farmacopeia padroniza que os radiofármacos devem ter rendimento $> 90\%$ para ser utilizado nos pacientes, então foi procedida a purificação e separação das espécies. Para isto foi utilizado uma coluna PD-10, condicionada com PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4.

O AcM-marcado foi purificado seguindo o trabalho de alguns autores que utilizaram a marcação direta, dentre eles Mather e Ellison (1990) que indicam a Sephadex 50 para purificação do radiofármaco.

A FIG. 26 mostra o comportamento das espécies contendo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em coluna PD-10.

A)

B)

FIGURA 26. Curva de Eluição do (A) $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, (B) $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$, (C) $\text{MDP-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ e (D) $\text{AcM-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ em coluna PD-10

As maiores atividades identificadas para o $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ foram das frações 15-19 (FIG. 26A); para o $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ (FIG. 26B) as maiores atividades foram das frações 5-9; para a espécie $\text{MDP-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ foram das frações 4-7 (FIG. 26C) e para o $^{99\text{m}}\text{Tc-AcM}$ foram das frações 4-6 (FIG. 25D).

O método não foi eficaz para separar o $\text{AcM-}^{99\text{m}}\text{Tc}$. Além disso, foi visto que dos volumes 11-15 mL houve elevada quantidade de TcO_4^- , como demonstrado na FIG. 26D.

5.5.5. Comparação do Rendimento de Marcação com os Grupos –SH gerados pela redução do AcM

Foi feita a relação do rendimento de marcação (%) com os grupos –SH por molécula de AcM (FIG. 27). Foi visto que o melhor rendimento de marcação (93%) foi alcançado com 5,76 grupos –SH, e a data de produção deste AcM foi 07.07.11.

FIGURA 27. Relação dos Grupos –SH gerados por molécula de AcM com o Rendimento de Marcação

Além disso, foi visto que dentre os 4 diferentes lotes de AcM utilizados (28.04.10; 07.05.10; 07.07.11 e 30.11.11), o melhor rendimento de marcação foi obtido com o lote de 07.07.11, apresentando 93% de ^{99m}Tc -AcM. No entanto, este mesmo lote teve um baixo rendimento de marcação de 23% em uma segunda redução, que obteve 11,77 grupos –SH. Isto ocorreu porque havia mais de uma amostra de AcM do mesmo lote (07.07.11).

Embora seja esperado que quanto maior o número de grupos –SH maior o rendimento de marcação, mas o fato de a amostra com 11,77 grupos –SH ter obtido baixo rendimento de marcação pode ser explicado porque provavelmente o elevado volume de 2-ME nesta amostra pode não ter sido separado completamente pela coluna PD-10,

mascarando a quantidade verdadeira de grupos –SH. Pois o 2-ME possui absorbância no mesmo comprimento de onda do Espectrofotômetro UV/Vis.

5.6. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO AcM-MARCADO E DO AcM-REDUZIDO

Para que ocorra a marcação direta de biomoléculas com o ^{99m}Tc é extremamente importante utilizar grupos reativos que promovam ligações de alta afinidade, como os grupos –SH, presentes inter e intracadeias nas imunoglobulinas. No entanto, é importante que a estrutura nativa e a função biológica destas moléculas não sejam alteradas. Por isso os agentes redutores utilizados em anticorpos devem atuar apenas nas pontes dissulfetos intercadeia (Mather e Ellison, 1990).

Os estudos de avaliação funcional de radioimunofármacos foram iniciados junto com os estudos de marcação *pre-tinning* (Rhodes, 1991). Atualmente, o ensaio mais utilizado para avaliação funcional dos anticorpos é o ensaio de *binding*, sendo que outros ensaios, como ELISA e eletroforese, também são muito utilizados (Mather e Ellison, 1990).

Neste trabalho, para avaliar a funcionalidade do AcM anti-PBP2a marcado e do AcM anti-BP2a reduzido foram feitos ensaios de ELISA, Immunoblotting, Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise de neutralização bacteriana *in vitro*.

5.6.1. Avaliação da Dosagem Proteica e da Integridade do AcM-Marcado e do AcM-Reduzido

5.6.1.1. Solubilidade e Dosagem Proteica

Inicialmente, foi identificado elevada quantidade de impurezas nas amostras dos AcM-marcado e AcM-reduzido, que poderia interferir na quantificação das amostras pelo NanoDrop, e poderia alterar os resultados dos experimentos. Estas impurezas provavelmente são decorrentes dos reagentes utilizados na etapa de marcação e redução.

Sendo assim foi procedido uma centrifugação prévia, tanto do AcM-marcado como do AcM-reduzido, para separar estas impurezas. O precipitado formado foi separado do sobrenadante, e foi descartado. O sobrenadante foi novamente quantificado e comparado com as amostras antes da centrifugação. Na TAB. 7 está sendo demonstrada as concentrações (mg/mL) de cada amostra, antes e depois da centrifugação, tanto de Proteína Total como de IgG. Como pode ser visto, foi identificada uma diminuição na concentração de ambos após a centrifugação.

TABELA 7. Concentrações das amostras (mg/mL) de AcM-reduzido e de AcM-marcado antes e depois da centrifugação.

	Antes da Centrifugação		Após a Centrifugação	
AcM-reduzido	Proteína Total (280 nm)	IgG	Proteína Total (280 nm)	IgG
1ª Redução	0,81	0,59	0,67	0,45
2ª Redução	1,43	0,92	1,04	0,79
3ª Redução	0,49	0,37	0,22	0,17
6ª Redução	0,34	0,22	0,37	0,25
AcM-marcado				
12ª Marcação	0,49	0,39	0,45	0,33
14ª Marcação	0,26	0,19	0,36	0,27
15ª Marcação	0,44	0,31	0,26	0,17
16ª Marcação	0,46	0,33	0,40	0,30
17ª marcação	0,42	0,35	0,41	0,31
18ª Marcação	0,55	0,39	0,48	0,33
20ª Marcação	0,32	0,37	0,26	0,19

No entanto, mesmo com a centrifugação das amostras ainda foi feita uma purificação por diálise, somente das amostras de AcM-marcado, pois estas amostras não foram identificadas na análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (FIG. 29). Provavelmente isto deve ter ocorrido pela elevada quantidade de impurezas.

Para esta diálise foram unidas as 7 diferentes amostras de AcM-marcado, demonstradas acima, sendo denominado de Pool. Estas amostras foram unidas por causa do baixo volume contido em cada uma, pois se fossem feitas individualmente, a purificação demandaria muito tempo e haveria grande perda do material de AcM marcado e AcM reduzido.

Após o processo de diálise do AcM-marcado o volume total contido na membrana de diálise foi de 15 mL, e posteriormente com a utilização do filtro Ultracell este volume foi diminuído para 2 mL, com concentração de 0,1 mg/mL.

Em seguida também foi analisado a % de IgG em relação a quantidade de proteínas totais, e foi visto que o AcM-reduzido obteve relação semelhante ao AcM Anti-PBP2a Controle (não marcado e não reduzido). Na qual as amostras reduzidas tiveram % de Pureza variando de 67,16% a 77,27%, com média de 71,98%, e a amostra controle teve 75,27% de pureza (TAB. 8).

TABELA 8. Análise da porcentagem de pureza (IgG/Proteínas totais) das amostras de AcM-reduzido e do AcM Anti-PBP2a Controle.

Amostras de AcM-reduzido	% Pureza:
	$\frac{\text{IgG}}{\text{Proteínas Totais}} \times 100$
A – 1ª Redução	67,16%
B – 2ª Redução	75,96%
C – 3ª Redução	77,27%
D – 6ª Redução	67,56%
AcM Anti-PBP2a Controle	75,27%

5.6.1.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) não-redutor

Esta análise foi feita para identificar se os processos de redução e marcação alteraram a integridade (estrutura e o peso molecular) do anticorpo anti-PBP2a. Sendo assim, este experimento foi feito em condições nativas para não desnaturar o anticorpo, não utilizando o 2-ME no tampão de amostra. As primeiras amostras analisadas foram as amostras do AcM-reduzido (FIG.28).

FIGURA 28. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) não-redutor das amostras de AcM-reduzido. PM – padrão de peso molecular; CT – Controle (AcM Anti-PBP2a não marcado e não reduzido); A – 1ª Redução; B - 2ª Redução; C – 3ª Redução; D – 6ª Redução.

As bandas das amostras A, B, C e D são amostras reduzidas com diferentes relações molares (2-ME:AcM) (TAB. 5). Estas amostras apresentaram as bandas semelhante a banda da amostra controle (AcM anti-PBP2a não marcado e não reduzido), que representa 162 kDa, demonstrando que não houve degradação do AcM anti-PBP2a pelo processo de redução.

Em seguida foi feita a mesma análise para as amostras do AcM-marcado, no entanto, como demonstrado na FIG. 29, as bandas não apareceram no gel de

poliacrilamida, sendo um provável sinal da quantificação proteica errada, como relatado anteriormente.

FIGURA 29. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) não-redutor das amostras de AcM-marcado. PM – padrão de peso molecular; CT – Controle (AcM Anti-PBP2a não marcado e não reduzido); E – AcM-Marcado 14.11.11; F – AcM-Marcado 01.03.12; G – AcM-Marcado 01.03.12; H – AcM-Marcado 15.03.12; I – AcM-Marcado 15.03.12; J – AcM-Marcado 13.04.12; L – 21.04.12.

Com isso foi feito a centrifugação e diálise para purificar estas amostras de AcM-marcado, sendo formado a amostra Pool de AcM-marcado (união das amostras E, F, G, H, I, J e L), para com isso ser feita outra eletroforese (FIG. 30).

FIGURA 30. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) não-redutor do Pool de AcM-marcado. PM – padrão de peso Molecular; CT – Controle (AcM Anti-PBP2a não marcado e não reduzido); Pool – amostras E, F, G, H, I, J e L de AcM-marcado.

A banda referente ao Pool é semelhante ao controle (CT) e não houveram outras bandas ao longo da corrida, demonstrando que o processo de marcação também não degradou o AcM anti-PBP2a, assim como o processo de redução.

5.6.2. Avaliação da Atividade e da Afinidade de Ligação das Amostras de AcM-Marcado e AcM-Reduzido

5.6.2.1. Immunoblotting

Esta análise foi procedida para averiguar a capacidade de ligação do AcM-reduzido e do AcM-marcado a proteína recombinante purificada PBP2a e também a PBP2a de um lisado de bactérias MRSA. Nas FIG. 31A e 31B estão sendo sinalizadas: em um gel de poliacrilamida à enzima PBP2a do lisado celular, com 76 kDa, e em uma membrana de nitrocelulose à proteína recombinante purificada PBP2a, com 8 kDa, respectivamente.

FIGURA 31. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE não redutor do lisado celular e membrana de nitrocelulose com a proteína recombinante purificada PBP2a. A – Lisado Celular (L) e B – Proteína Recombinante PBP2a (PBP2a). PM – padrão de peso molecular.

Logo após foi feita a incubação destas membranas com o AcM-marcado e o AcM-reduzido (FIG. 32), no qual as bandas formadas foram semelhantes ao controle (AcM anti-PBP2a não marcado e não reduzido), sendo assim houve ligação do AcM-marcado e do AcM-reduzido a proteína recombinante purificada PBP2a e também a PBP2a do lisado de MRSA.

FIGURA 32. Immunoblotting das amostras de AcM-marcado e de AcM-reduzido em lisado celular (A) e da proteína recombinante purificada PBP2a (B) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE não redutor. PM – padrão de peso molecular; CT – Controle (AcM Anti-PBP2a não marcado e não reduzido); A – 1ª Redução; B - 2ª Redução; C – 3ª Redução; D – 6ª Redução. → Ligação das amostras AcM-marcado e AcM-reduzido.

Estes resultados confirmam que ambas as amostras AcM-reduzido e o Pool do AcM-marcado mantém a capacidade de se ligar ao seu epítipo alvo, significando que os processos de redução e marcação também não interferiram na atividade destes anticorpos.

5.6.2.2. Imunoensaio enzimático (ELISA) direto

Diferentemente do Immunoblotting, que utiliza a proteína desnaturada ou sobre a forma linear, o ELISA é um método que analisa a proteína ou anticorpo sobre a forma nativa. Além disso, o ELISA é mais sensível do que o Immunoblotting, por isso foi importante analisar de diferentes formas e por diferentes métodos a capacidade de ligação do AcM-marcado e do AcM-reduzido ao epítipo alvo.

Foram feitas duas análises separadas de ELISA: ANÁLISE 1 - utilizando 4 amostras de AcM reduzido (1^a, 2^a, 3^a e 6^a reduções) (FIG. 33) e ANÁLISE 2 - utilizando uma amostra de AcM-marcado e uma de AcM-reduzido (FIG.34). Neste ensaio também foi utilizado como controle o AcM anti-PBP2a não marcado e não reduzido (controle).

Na ANÁLISE 1 foram utilizadas as concentrações de 6,2; 12,5; 25 e 50 ng de AcM-reduzido. Tendo sido visto que as amostras de AcM-reduzido mantêm a capacidade de se ligar ao epítipo alvo (proteína recombinante PBP2a), apresentando atividade similar a amostra controle.

FIGURA 33. Imunoensaio enzimático (ELISA) direto, com a adição da proteína purificada PBP2a 0,25 µg/poço. Concentrações das amostras: 50; 25; 12,5; 6,25; ng/poço.

A amostra da 3ª redução foi a única amostra que teve 30-50% menor absorbância do que o AcM controle, na ligação com a PBP2a. Esta amostra apresentou condições semelhantes de redução (tempo e relação molar 2-ME:AcM) em relação a amostra da 6ª redução (TAB. 5). Além disso esta amostra é do mesmo lote que a 1ª e 2ª amostra de AcM-reduzido. Sendo assim, a menor absorbância provavelmente não está relacionada ao processo de redução ou ao lote do anticorpo.

Logo após, foi feita a ANÁLISE 2 do experimento de ELISA, utilizando somente uma amostra do AcM-reduzido e a amostra do Pool de AcM-marcado, comparando com o controle (FIG. 34). Neste experimento foram utilizadas as concentrações de 1,5; 3,1; 6,2; 12,5; 25 e 50 ng de AcM.

Nas concentrações iniciais (1,5; 3,1; 6,2 e 12,5) foi detectado menor absorbância nas amostras AcM-marcado e AcM-reduzido em relação ao controle. No entanto, nas concentrações 25 e 50 ng, estas amostras apresentaram atividade semelhante ao controle. Sendo assim, estes dados confirmam que a capacidade de reconhecimento do epítipo alvo foi mantida em ambas as amostras.

FIGURA 34. Imunoensaio enzimático (ELISA) direto, com a adição da proteína purificada PBP2a 0,25 µg/poço. Concentrações das amostras: 1,5; 3,1; 6,2; 12,5; 25 e 50 ng/poço.

5.6.2.3. Análise de Neutralização Bacteriana *in vitro*

Para a análise da neutralização bacteriana *in vitro*, mediada pelo anticorpo anti-PBP2a foi utilizado somente o Pool de AcM-marcado, comparado com o AcM anti-PBP2a não marcado e não reduzido (TAB. 9). Este ensaio analisou se a amostra de AcM-marcado mantém a mesma capacidade de bloquear o crescimento bacteriano *in vitro*.

TABELA 9. Análise de Neutralização Bacteriana *in vitro* utilizando 5×10^4 bactérias. Concentração de 100 µg do Pool de AcM e de 100 µg de AcM anti-PBP2a não marcado e não reduzido. Controle: amostra sem AcM.

<u>Tempo de Incubação</u>	<u>Controle</u>	<u>AcM anti-PBP2a</u>	<u>Pool de AcM Marcado</u>
4 horas	$1,56 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$
	bactérias / mL	bactérias / mL	bactérias / mL
	<hr/>		
	$9,36 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
	bactérias em 6 mL	bactérias em 6 mL	bactérias em 6 mL

Foi visto que o Pool de AcM-marcado bloqueou de maneira semelhante a quantidade de células bacterianas, quando comparado com o AcM anti-PBP2a. Pois o Pool foi capaz de diminuir 90% do número de colônias que foi inibido pelo AcM anti-PBP2a, tanto na comparação do número de células por mL como na quantidade total de bactérias em 6 mL.

O número de células foi de $5,0 \times 10^5$ e $5,7 \times 10^5$ para o tratamento com o AcM anti-PBP2a e o Pool de AcM marcado, respectivamente, demonstrando que a diferença de

10%, citado anteriormente, representa somente 70.000 células bacterianas a mais na análise com o AcM-marcado em relação ao AcM anti-PBP2a.

Com isso, foi visto que o AcM-marcado continua mantendo a capacidade de neutralizar as bactérias MRSA *in vitro*, quando comparado com o AcM anti-PBP2a.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram identificados que a relação molar (2-ME:AcM) entre 5.000-8.000 formou uma quantidade de grupos –SH por anticorpo satisfatória (aproximadamente 5), para serem realizadas as marcações com o AcM anti-PBP2a. O método escolhido para quantificação e análise da concentração de AcM foi a curva de albumina.

O melhor método de marcação utilizado foi o Método II (73,5% de rendimento), utilizando o kit do MDP, com as seguintes condições: 0,5 mg de AcM; 10 µL do Kit do MDP ressuspendido em 5 mL; 75,48 MBq (2,04 mCi) de ^{99m}Tc ; agindo por 15 minutos de marcação. Este rendimento de marcação se manteve estável pelo tempo analisado de duas horas.

Foram identificados os métodos cromatográficos necessários para analisar as espécies geradas do Método II de marcação:

- Fita de papel Whatman 3MM com solvente NaCl 0,9% para as impurezas (MDP- ^{99m}Tc e $^{99m}\text{TcO}_4^-$) – Rf 1,0; fita Whatman 3MM com solvente Acetona para a espécie $^{99m}\text{TcO}_4^-$ – Rf 1,0; e fita ITLC-SG fibra de vidro com o solvente EtOH:NH₄OH:H₂O para a espécie reduzida ($^{99m}\text{TcO}_2$) – Rf 0,0.

O método de purificação e separação das espécies por exclusão de peso molecular, utilizando coluna PD-10, não apresentou boa eficácia neste trabalho.

Os Ensaios de Avaliação Funcional (eletroforese, ELISA e ensaio de neutralização *in vitro*) utilizados aqui demonstraram que o AcM-marcado e o AcM-reduzido mantiveram a atividade e a capacidade de ligação semelhante do AcM não marcado e não reduzido.

O experimento perspectivo deste trabalho será analisar a $\frac{1}{2}$ vida plasmática do AcM-reduzido e do AcM-marcado em camundongos, para detectar se as reações de redução e marcação alteraram a glicosilação e a estrutura da região Fc do AcM, comparado ao AcM não marcado e não reduzido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLINGER, J. R.; PYGAS, J.; GERSON, B.; GULENCHYN, K. Y. Stabilization of Stannous Pyrophosphate Kits with Gentisic Acid. *Nucl. Med. Biol.-Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B*, v. 15, p. 391-393, 1988.

BANDOLI, G.; MAZZI, U.; RONCARI, E.; DEUTSCH, E. Crystal structures of technetium compounds. *Coord. Chem. Rev.*, v. 44, p. 191-227, 1982.

BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 31, nº 4, p. 260-277, 2001.

BARRON, B.; HANNA, C.; PASSALAQUA, A. M.; LAMKI, L.; WEGENER, W.A.; GOLDENBERG, D.M. Rapid diagnostic imaging of acute, nonclassic appendicitis by leukoscintigraphy with sulesomab, a technetium 99m-labeled antigranulocyte antibody Fab' fragment. LeukoScan Appendicitis Clinical Trial Group. *Surgery*, v. 125(3), p. 288-96, 1999.

BAYRY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; KAZATCHKINE, M. D.; KAVERI, S. V. Intravenous immunoglobulin for infectious diseases: back to the pre-antibiotic and passive prophylaxis era? *Trends Pharmacol. Science*, v. 25, p. 306-310, 2004.

BECKER, W.; MELLER, J. The role of nuclear medicine in infection and inflammation. *Lancet Infectious Diseases*, v. 1; p. 326-333, 2001.

BEHRING, KITASATO. On the development of immunity to diphtheria and tetanus in animals. *Dtsch Med Wochenschr*, v. 90(49), p. 2183, 1965 .

BERGER, M.; SHANKAR, V.; VAFAI, A. Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Am. J. Med. Sci.*, v. 324, p. 14-30, 2002.

BIERSACK, H. J.; FREEMAN, L. M. *Clinical Nuclear Medicine*. New York, N. Y.: Springer 2007. Capítulo 2.

BLACKWELL SCIENCE LTD. The emerging role of radioimmunotherapy in haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, v. 108, p. 679-688, 2000.

BOERMAN, O. C.; RENNEN, H.; OYEN, W. J. G., CORSTENS, F. H. M. Radiopharmaceuticals to Image Infection and Inflammation. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 31, p. 286-295, 2001.

- BOYD, R. E. Technetium-99m Generators: The available options. *Int. Journal Appl. Radiat. Isot.*, v. 33, p. 801-809, 1982.
- BOYNE, A. F. A Metodology for Analysis of Tissue Sulfhydryl Components. *Analytical Biochemistry*, v. 46, p. 639-653, 1972.
- BREKKE, O. H.; SANDLIE, I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discov.*, v. 2, p. 52-62, 2003.
- CARSWELL, C.I.; PLOSKER, G.L.; WAGSTAFF, A.J. Daclizumab: a review of its use in the management of organ transplantation. *BioDrugs*, v. 15, p. 745-73, 2001.
- CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E.; PIROFSKI, L. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 695-703, 2004.
- CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. D. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.*, v. 21, p. 150-161, 1995.
- CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. D. Serum therapy revisited: animal models of infection and the development of passive antibody therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, p.1695-1702, 1994.
- CASTIGLIA, S. G.; DURAN, A.; FISZMAN, G.; HORENSTEIN, A. L. ^{99m}Tc Direct labeling of Anti-CEA Monoclonal Antibodies: Quality Control and Preclinical Studies. *Nucl. Med. Biol.*, v. 22, p. 367-372, 1995.
- CERCENADO, E.; RUIZ DE GOPEGUI, E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.*, v. 26, Suppl 13, p. 19-24, 2008.
- CHAGAS, M. C. B. *Desenvolvimento de kit de diagnóstico rápido para detecção de resistência à metilina em cepas de estafilococos*. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,
- CHAMBERS, H.F; DELEO F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microb.*, v. 7 (9), p. 629–641, 2009.
- CHILDS, R. L.; HNATOWICH, D. J. Optimum conditions for labelling of DTPA-coupled antibodies with technetium-99m. *Journal Nucl. Med.*, v. 26, p. 293-299, 1985.
- CHOPRA, A. ^{99m}Tc-Labeled murine IgM monoclonal antibody, fanolesomab, that targets the CD15 glycoprotein antigen. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* (Internet), 2011.
- COOKSON, B. Five decades of MRSA: controversy and uncertainty continues. *The Lancet*, v. 378, f. 9799, p. 1291 - 1292, 2011.
- DADACHOVA, E.; BRYAN, R.A.; APOSTOLIDIS, C.; MORGENSTERN, A.; ZHANG, T.; MOADEL, T.; TORRES, M.; HUANG, X.; REVSKAYA, E.; CASADEVALL, A. Interaction of radiolabeled antibodies with fungal cells and components of the immune system in vitro and during radioimmunotherapy for experimental fungal infection. *J. Infect. Dis.*, v. 15, p. 1427-1436, 2006.

DADACHOVA, E.; BRYAN, R.A.; HUANG, X.; ORTIZ, G.; MOADEL, T.; CASADEVALL, A. Comparative evaluation of capsular polysaccharide-specific IgM and IgG antibodies and F(ab')₂ and Fab fragments as delivery vehicles for radioimmunotherapy of fungal infection. *Clin. Cancer Res.*, v. 13 (18 Pt 2), p. 5629s-5635s, 2007.

DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Radioimmunotherapy of Infectious Diseases. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 39, p.146-153, 2009.

DADACHOVA, E.; HOWELL, R.W.; BRYAN, R.A.; FRENKEL, A.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. Susceptibility of the human pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* to gamma radiation versus radioimmunotherapy with alpha and beta emitting radioisotopes. *J. Nucl. Med.*, v. 45, p. 313-320, 2004.

[a] DADACHOVA, E.; PATEL, M.C.; TOUSSI, S.; APOSTOLIDIS, C.; MORGENSTERN, A.; BRECHBIEL, M.W.; GORNY, M.K.; ZOLLA-PAZNER, S.; CASADEVALL, A.; GOLDSTEIN, H. Targeted killing of virally infected cells by radiolabeled antibodies to viral proteins. *PLoS Med.*, v. 3, f. 11 e427, p. 2094-2103, 2006.

DEAN, N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired and health care-associated pneumonia: incidence, diagnosis, and treatment options. *Hosp. Pract.* (Minneapolis), v. 38(1), p. 7-15, 2010.

DEURENBERG, R.H.; STOBBERINGH, E.E. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Mol Med.*, v. 9(2), p. 100-115, 2009.

DIAS, C. R. B. R. *Estudo comparativo da marcação do anticorpo anti-CD20 com ¹⁸⁸Re*. 2010. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

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

ECKELMAN, W. C.; PAIK, C. H.; STEIGMAN, J. Three Approaches to Radiolabeling Antibodies with ^{99m}Tc. *Nucl. Med. Biol.-Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B*, v. 16, p. 171-176, 1989.

ELLMAN, G. L. A Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.74, p. 443-450, 1958.

ENRIGHT, M. C. The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 3, f. 5, p. 474-479, 2003.

EPSTEIN, A.L.; MARDER, R.J.; WINTER, J.N.; STATHOPOULOS, E.; CHEN, F.M.; PARKER, J.W.; TAYLOR, C.R. Two new monoclonal antibodies, Lym-1 and Lym-2, reactive with human B-lymphocytes and derived tumors, with immunodiagnostic and immunotherapeutic potential. *Cancer Res.*, v. 47(3), p. 830-40, 1987.

FARLEY, J. E. Epidemiology, clinical manifestations, and treatment options for skin and soft tissue infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Am. Acad. Nurse Pract.*, v. 20(2), p. 85–92, 2008.

FERNANDES, A. T. Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde. Atheneu. 2000.

FRIDKIN, S.K. Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. *Clin. Infect. Dis.*, v. 32(1), p. 108-15, 2000.

FRITZBERG, A. R.; LEWIS, D. HPLC analysis of Tc-99m iminodiacetate hepatobiliary agents and a question of multiple peaks: Concise communications. *J. Nucl. Med.*, v. 21, p. 1180-1184, 1980.

GAITONDE, M. K. A Spectrophotometric Method for the Direct Determination of Cysteine in the Presence of Other Naturally Occurring Amino Acids. *Biochem. J.*, v. 104, p. 627-633, 1967.

GARCÍA-LARA, J.; FOSTER, S. J. Anti-*Staphylococcus aureus* immunotherapy: current status and prospects. *Current Opinion in Pharmac.*, v. 9, p. 552-557, 2009.

GLENNIE, M.J.; VAN DE WINKEL, J.G. Renaissance of cancer therapeutic antibodies. *Drug. Discov. Today*, v. 8(11), p. 503-10, 2003.

GOOD, R.A.; LORENZ, E. Historic aspects of intravenous immunoglobulin therapy, *Cancer* , v. 68 (Supl. 6), p. 1415–1421, 1991).

GRUNDMANN, H.; AIRES-DE-SOUSA, M.; BOYCE, J.; TIEMERSMA, E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *The Lancet*, v. 368, f. 9358, p. 874–885, 2006.

K, HABEL. Antiserum in the prophylaxis of rabies. *Bull World Health Organ*, v. 10, p. 781–788, 1954.

HACKBARTH, C.J.; KOCAGOZ, T.; KOCAGOZ, S.; CHAMBERS, H.F. Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, p. 103–106, 1995.

HARPER, P. V.; ANDROS, G.; LATHROP, K. A. Semi annual report to the Atomic Energy Commission. Jacobson L.O. (ed.) ACRH 18, p. 76-87, 1962.

HARPER, P. V.; BECK, R.; CHARLESTON, D.; et al. Optimization of scanning method using Tc-99m. *Nucleonics*, v. 22, p. 50, 1964.

HNATOWICH, D.J.; VIRZI, F. P.; WINNARD, J.R.; FOGARASI M.; RUSCKOWSKI M. Investigations of Ascorbate for Direct Labeling of Antibodies with Technetium-99m. *J. Nucl. Med.*, v. 35, p. 127-134, 1994.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, v. 23 (9), p. 1126-36, 2005.

HWANG, W.Y.; FOOTE, J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, v. 36 (1), p. 3–10, 2005.

IAEA-TECDOC-1008. *Labelling, quality control and clinical evaluation of monoclonal antibodies for scintigraphy*. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1997.

JOHN, F.; KOKAI-KUN, A.; JAMES, J. M. Infectious diseases antibody therapy for treatment or prevention of infectious diseases. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, v. 1, f. 4, p. 475-481, 2004.

JUBELIRER, S.J.; KOENIG, B.A.; BATES, M.C. Acute profound thrombocytopenia following C7E3 Fab (Abciximab) therapy: case reports, review of the literature and implications for therapy. *Am. J. Hematol.*, v. 61(3), p. 205-8, 1999.

KLUYTMANS, J; VAN BELKUM, A; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 10, p. 505-20, 1997.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256 (5517), p. 495-97, 1975.

KUNG, H.F.; KUNG, M.P.; WEY, S.P.; LIN, K.J.; YEN, T.C. Clinical acceptance of a molecular imaging agent: a long march with [^{99m}Tc]TRODAT. *Nucl. Med. Biol.*, v. 34(7), p. 787-9, 2007.

KUNQ, P.; GOLDSTEIN, G.; REINHEN, E.L.; SCHLOSSMAN, S.F. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, v. 206, p. 347-349, 1979.

LAUPLAND, K.B.; ROSS, T.; GREGSON, D. B. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000-2006. *J. Infect. Dis.*, v. 198, p. 336-343, 2008.

LOBDELL, K.W.; STAMOU, S.; SANCHEZ, J.A. Hospital-Acquired Infections. *Surgical Clinics of North America*, v. 92, f. 1, p. 65-77, 2012.

LOVE, C.; PALESTRO, C. J. Radionuclide Imaging of Infection. *Nucl. Med. Technol.*, v. 32, n° 2, p. 47-57, 2004.

LI-LING, J.; IRVING, M. Somatostatin and octreotide in the prevention of postoperative pancreatic complications and the treatment of enterocutaneous pancreatic fistulas: a systematic review of randomized controlled trials. *Br. J. Surg.*, v. 88(2), p. 190-9, 2001.

LIU, X.; POP, L. M.; VITETTA, E. S. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunological Reviews*, v. 222, p. 9-27, 2008.

LUPETTI, A.; WELLING, M. M.; PAUWELS, E. K. J.; NIBBERING, P. H. Radiolabelled antimicrobial peptides for infection detection. *Lancet Infect. Dis.*, v. 3, p. 223-229, 2003.

MATHER, S. J.; ELLISON, D. Reduction-Mediated Technetium-99m Labeling of Monoclonal Antibodies. *Journal Nucl. Med.*, v. 31, p. 692-697, 1990.

MELNIK, M.; LIER, J. VAN. Analysis of structural data of technetium compounds. *Coord. Chem. Rev.*, v. 77, p. 275-324, 1987.

MOLINSKI, V. J. A review of ^{99m}Tc generator technology. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, v. 33, p. 811-819, 1982.

MORALES, A. A. M.; GANDOLFF, G. N.; PÉREZ, N. P.; VÉLIZ, B. C.; TORRES, I. C.; DUCONGÉ, JORGE; FERNÁNDEZ, E.; CRESPO, F. Z.; VELOSO, A.; ESCOBAR, N. I. Freeze-Dried Formulation for Direct ^{99m}Tc -Labeling ior-egf/r3 MAb: Additives, Biodistribution, and Stability. *Nuclear Medicine & Biology*, v. 26, p. 717-723, 1999.

MUDDUKRISHNA, S. N.; CHEN, A.; QI, PEI; SMOLENKI, A. Quantitation of Reduced Disulfide Groups in Monoclonal Antibodies Using 5-Iodoacetamidofluorescein: A Novel Size Exclusion-HPLC Technique. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 46, p. 1015-1026, 1995.

NELSON, P.N.; REYNOLDS, G.M.; WALDRON, E. E.; WARD, E.; GIANNOPOULOS, K.; MURRAY, P.G. Demystified... Monoclonal antibodies. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, v. 53, p. 111-17, 2000.

NOBLE, W.C.; WILLIAMS, R.E.O.; JEVONS, M.P.; SHOOTER, R.A. Some aspects of nasal carriage of staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, v. 17, p. 79-83, 1964.

NOSANCHUK, J.D.; STEENBERGEN, J.N.; SHI, L.; DEEPE, J. R. G. S.; CASADEVALL, A. Antibodies to a cell surface histone like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest.*, v. 112, p. 1164-1175, 2003.

NOWOTNIK, D. P. Physicochemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. *Sampson CB (ed.): Textbook of Radiopharmacy Theory and Practice (ed. 2)*. Amsterdam, Gordon e Breach Science Publisher, p. 29-49, 1994.

ORAL, H. B.; ÖZAKIN, C.; AKDIS, C. A. Back to the Future: Antibody-Based Strategies for the Treatment of Infectious Diseases. *Molecular Biotechnology*, v. 21, p. 225-239, 2002.

PAK, K. Y.; DEAN R. T.; MATTIS, J. A. Method for labeling antibodies with a metal ion. *International Application publicado com o número de patente de WO 88/07382*, 1988.

PAK, K. Y.; NEDELMAN, M. A.; STEWART, R. A rapid and efficient method for labeling IgG antibodies with Tc-99m and comparison to Fab' antibody fragments. *J. Nucl. Med. (abstract)*, v. 30, p. 793, 1989.

PAN, A.; LORENZOTTI, S.; ZONCADA, A. Registered and investigational drugs for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug. Discov.*, v. 3(1), p. 10-33, 2008.

PANDEY, P. M.; SACHDEV, S. S.; RAMAMOORTHY, N.; LAL, R.; RANGANATHA, D. K.; NARASIMHAN, S.; OOMMEN, R.; GUNASEKARAN, S.; NAIR, N. A. Formulation and evaluation of a two-component lyophilized kit for Tc-sestamibi: transchelation preparation of Tc-99m-sestamibi. *Nuclear and medicine Biology*, v. 24 (nº 7), p. 697-700, 1997.

- PARRAS, F.; DEL CARMEN GUERRERO, M.; BOUZA, E.; JOSÉ BLAZQUEZ, M.; MORENO, S.; CRUZ MENARGUEZ, M.; CERCENADO, E. Comparative study of mupirocin and oral co-trimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 9, p. 175–179, 1995.
- PATTI, J. M. A humanized monoclonal antibody targeting *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, v. 22S, p. S39-S43, 2004.
- PAYNE, W.J.; MARSHALL, D.L.; SHOCKLEY, R.K.; MARTIN, W.J. Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies. *Clinical Microbiology Review*, p. 313-29, 1988.
- PEDERSEN, M.W.; JACOBSEN, H.J.; KOEFOED, K.; HEY, A.; PYKE, C.; HAURUM, J.S.; KRAGH, M. Sym004: a novel synergistic anti-epidermal growth factor receptor antibody mixture with superior anticancer efficacy. *Cancer Res.*, v. 70(2), p. 588-97, 2010.
- PERRIER, C.; SEGRÉ, E. Radioactive isotopes of element 43. *Nature*, v. 140, p. 193-194, 1937
- PETTIT, W. A.; DELAND F. H.; BENNETT S. J.; GOLDENBERG D. M. Improved protein labeling by stannous tartrate reduction of pertechnetate. *J. Nucl. Med.*; v. 21; p. 59-62, 1980.
- POSTHUMA-TRUMPIE, G.A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 393, p. 569-582, 2009.
- PROJAN, S. J.; NESIN, M.; DUNMAN, P. M. *Staphylococcal* vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 6, f. 5, p. 473–479, 2006.
- PROTOCOLO BIO-RAD. **Mini-Protean 3 Cell.** Disponível em: <http://www.plant.uoguelph.ca/research/homepages/raizada/Equipment/RaizadaWeb%20Equipment%20PDFs/9B.%20miniprotean3%20cell%20manual.pdf>
- RHODES, B. A. Considerations in the radiolabelling of albumin. *Semin. Nucl. Med.*, v. 4, p. 281-293, 1974.
- RHODES, B. A. Direct Labeling of Proteins with ^{99m}Tc . *Nucl. Med. Biol.-Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B*, v. 18, p. 667-676, 1991.
- RHODES, B. A.; TORVESTAD, D. A.; BRELOW, K.; BURCHIEL, S. W.; REED, K. A.; AUSTIN, R. K. ^{99m}Tc labeling and acceptance testing of radiolabeled antibodies. In: Burchiel, S. W.; Rhodes, B. A., editors. *Tumor Imaging*, Masson, New York; 1982; 111.
- RICHARDS, P. A survey of the production at Brookhaven National Lab of the isotopes for medical research. Trans 5th Nuclear Congress. 7th Int. Electronic and Nuclear Symp., Roma, p. 225, 1960.
- RICHARDS, P. Radioactive Pharmaceuticals. *Proc. Symp.*, ORNL, p. 323-334, 1965.

RICHARDS, P.; STEIGMAN, J. Chemistry of technetium as applied to radiopharmaceuticals. In *Radiopharm. Int. Symp.*, (editado por Subramanian G., Rhodes B. A., Cooper J. F. e Sadd V. J.), p. 23-35. The Society of Nuclear Medicine, New York, 1975.

RIECHMANN, L.; CLARK, M.; WALDMANN, H; WINTER, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, v. 332, p. 323-327, 1988.

ROBINSON, R.F.; NAHATA, M.C. Respiratory syncytial virus (RSV) immune globulin and palivizumab for prevention of RSV infection. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, v. 57, p. 259-266, 2000.

ROIVAINEN, A; JALKANEN, S.; NANNI, C. Gallium-labelled peptides for imaging of inflammation. *Eur. J. Nucl. Med. Imaging*, v. 39 (sup. 1), p. S68-77, 2012.

ROIVAINEN, A; JALKANEN, S.; NANNI, C. Gallium-labelled peptides for imaging of inflammation. *Eur. J. Nucl. Med. Imaging*, v. 39 (sup. 1), p. S68-77, 2012.

ROTH, D.M.; SENNA, J.P.; MACHADO, D.C. Evaluation of the humoral immune response in BALB/c mice immunized with a naked DNA vaccine anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Genet. Mol. Res.*, v. 5(3), p. 503-12, 2006.

SAILEROVA, E.; BILLINGHURST, M. W. A study of factors affecting the labeling of tartrate with ¹⁸⁸Re and the transchelation of the ¹⁸⁸Re from the tartrate to a protein. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 59, p. 311-319, 2003.

SAYLOR, C.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. *Vaccine*, 27S, p. G38-G46, 2009.

SCHOP, J. Protective Immunity Against *Cryptococcus Neoformans* Infection. *McGill Journal of Medicine*, v. 10 (1), p. 35-43, 2007.

SCHWARZ, A.; STEINSTRASSER, A. A novel approach to Tc-99m labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med. (abstract)*, v. 28, p. 721, 1987.

SCHWOCHAU, K. Technetium Radiopharmaceuticals – Fundamentals, Synthesis, Structure, and Development. *Agew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 33, p. 2258-2267, 1994.

SENNA, J.P.; ROTH, D.M.; OLIVEIRA, J.S.; MACHADO, D.C.; SANTOS, D.S. Protective immune response against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model using a DNA vaccine approach. *Vaccine*. 2003 Jun 2;21(19-20):2661-6.

SIGNORE, A.; GLAUDEMANS, A. W. J. M. The molecular imaging approach to image infections and inflammation by nuclear medicine techniques. *Ann. Nucl. Med.*, v. 25, p. 681-700, 2011.

Site 1 < <http://www.economist.com/node/5107620> >. Acesso em: 28 Julho 2012.

Site 2 < <http://www.economist.com/node/18483671> >. Acesso em: 20 Julho 2012.

Site 3 < <http://www.economist.com/node/3151363> >. Acesso em: 20 Julho 2012.

Site 4 < www.economist.com/node/5107620 >. Acesso em: 20 Julho 2012.

Site 5 < www.cdc.gov/hicpac/mdro/mdro_5.html >. Acesso em: 20 Julho 2012.

Site 6 < <http://www.world-nuclear.org/info/inf55.html> >. Acesso em: 20 Julho 2012.

Site 7 < <http://www.ipen.br/conteudo/upload/201104250818070.MDP.pdf> >. Acesso em: 20 Julho 2012.

SMITH, E. M. Properties, uses, radiochemical purity and calibration of Tc-99m. *J. Nucl. Med.*, v. 5, p. 871-882, 1964.

SRIVASTAVA, S. C.; RICHARDS, P. Technetium-99m labeled compounds, em Rayudu GVs (ed.): Radiotracers for Medical Applications. Boca Raton, FL, CRC Press Inc, p. 107-185, 1983.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science Progr.*, v. 85, p. 57-72, 2002.

STEFANI, S.; GOGGIO, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 14 Suppl 4, p. S19-22, 2010.

STEIN, G.E. Antimicrobial resistance in the hospital setting: impact, trends, and infection control measures. *Pharmacotherapy*, v. 25, p. 44S-54S, 2005.

STIEHM, E. R. Appropriate Therapeutic Use of Immunoglobulin. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 10, p. 203-221, 1996.

STRANGER-JONES, Y.K.; BAE, T.; SCHNEEWIND, O. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Science*, v. 103 (45), p. 16942-7, 2006.

STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, v. 8, p. 473-80, 2008.

STROHL, W.R.; KNIGHT, D.M. Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 20, p. 668-672, 2009.

SUNDBERG, M.W.; MEARES, C.F.; GOODWIN, D.A.; DIAMANTI, C.I. Chelating agents for the binding of metal ions to macromolecules. *Nature*, v. 250 (467), p. 587-588, 1974.

TEODORO, R. *Avaliação pré-clínica do análogo da Neurotensina (8-13) radiomarcado com ^{99m}Tc: caracterização in vitro e in vivo*. 2010. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

THAKUR, M. L.; DEFULVIO, J.; RICHARD, M. D.; PARK, C. H. Technetium-99m Labeled Monoclonal Antibodies: Evaluation of Reducing Agents. *Nucl. Med. Biol. – Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B*, v. 18, p. 227-233, 1991.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Science*, v. 76(9), p. 4350-4, 1979.

TRISTAN, A.; BES, M.; MEUGNIER, H.; LINA, G.; BOZDOGAN, B.; COURVALIN, P.; REVERDY, M.; ENRIGHT, M. C.; VANDENESCH, F.; ETIENNE J. Global Distribution of Panton-Valentine Leukocidin–positive Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Emerging Infectious Disease*, v. 13, Número 4, 2007.

TROUTNER, D. E.; VOLKERT, W. A.; HOLMES, R. A. Labeling of amine ligands with ^{99m}Tc in aqueous solutions by ligand exchange. *Int. Journal. Appl. Radiat. Isot.*, v. 33, p. 891-896, 1982.

VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMEE, M.; WAUTERS, G.; GALA, J-L. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 2864–67, 1995.

WALTHER, M.; FRIBE, A. A guide to diagnostic rapid test development. *1^a ed. GE Healthcare*, p. 5, 2008.

WARD, E. S.; GUSSOW, D.; GRIFFITHS, A. D.; JONES, P. T.; WINTER, G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, v. 341, p. 544-546, 1989.

WENDEL, K. A.; ARTHUR, J. C. Acute Meningoencephalitis in Chronic Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Putative Central Nervous System Escape of HIV Replication. *Clinical Infectious Diseases*, v. 37, f. 8, p. 1107-1111.

WILLIAMS, R.E.O. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol. Rev.*, v. 27, p. 56–71, 1963.

WU, H.; PFARR, D. S.; LOSONSKY, G. A.; KIENER, P. A. Immunoprophylaxis of RSV infection: advancing from RSV-IGIV to palivizumab and motavizumab. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 317; p. 103-23, 2008.

WU, S.W.; DE LENCASTRE, H.; TOMAZ, A. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v. 183, p. 2417–2424, 2001.

ZARAGOZA, O; RODRIGUES, M.L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHANG, Z. M.; BALLINGER, J. R.; SHELDON, K.; BOXEN, I. Evaluation of Reduction-mediated Labelling of Antibodies with Technetium-99m. *Nucl. Med. Biol.-Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B*, v. 19, p. 607-609, 1992.

ZOLLE, I. *Technetium-99m pharmaceuticals – preparation and quality control in nuclear medicine*. New York, N. Y.: Springer 2007. Capítulo 3: Stannous chloride in the preparation of ^{99m}Tc pharmaceuticals.