AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**USO DA TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS (PET) PARA
IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE METÁSTASES E INVESTIGAÇÃO DA
EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA COMBINAÇÃO p19Arf E INTERFERON-
BETA EM MELANOMA MURINO**

MARIA RENATA VALENTE BRANDÃO FREIRE

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

Orientador:

Prof. Dr. Emerson Soares Bernardes

São Paulo

2017

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**USO DA TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS (PET) PARA
IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE METÁSTASES E INVESTIGAÇÃO DA
EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA COMBINAÇÃO p19Arf E INTERFERON-
BETA EM MELANOMA MURINO**

MARIA RENATA VALENTE BRANDÃO FREIRE

**Dissertação apresentada como parte
dos**

**requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:

Prof. Dr. Emerson Soares Bernardes

#

Versão Original

#

São Paulo

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Freire, Maria Renata Valente Brandão

USO DA TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS (PET) PARA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE METÁSTASES E INVESTIGAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA COMBINAÇÃO p19ARF E INTERFERON-BETA EM MELANOMA MURINO / Maria Renata Valente Brandão Freire; orientador Emerson Soares Bernardes. -- São Paulo, 2017. 140 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2017.

1. Melanoma. 2. Timidina quinase (HSV1-TK). 3. Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET). 4. Terapia Gênica. 5. [18F] FHBG. I. Bernardes, Emerson Soares, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Maria Renata Valente Brandão Freire

Título: USO DA TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS (PET) PARA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE METÁSTASES E INVESTIGAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA COMBINAÇÃO p19ARF E INTERFERON-BETA EM MELANOMA MURINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data:_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. :_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. :_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. :_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. :_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. :_____

Instituição:_____Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais Ruy e Cleusa.

EPÍGRAFE

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda humanidade.”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, irmã e filhos que sempre me apoiaram, incentivaram e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

À família Oliveira que é minha segunda família aqui, me recebeu, acolhe e ajuda muito com os cuidados com a minha pequena Gabriella e assim foi possível desenvolver este trabalho até o presente momento.

Gostaria de expressar o meu muito especial agradecimento à minha filha Gabriella, por apesar de muitas vezes sentir minha falta e não gostar da minha ausência, compreender, acompanhar e achar lindo o meu trabalho. Muito obrigada filha querida, pelo seu amor, pelo seu carinho e pelos seus ensinamentos de cuidados e total respeito ao tratamento com os animais.

Ao meu orientador prof. Dr. Emerson Soares Bernardes, pela oportunidade de iniciar as minhas atividades na pesquisa com o treinamento técnico em seu projeto FAPESP JP 2012/06875-6 e na sequência o desenvolvimento deste projeto de Mestrado. Agradeço, principalmente por toda amizade, paciência e compreensão com todas as dificuldades que tive, especialmente nos últimos meses.

Ao Dr. Bryan Eric Strauss pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho em parceria.

À Sofia Santos, pela amizade e por sempre ter me socorrido em todos os momentos de dificuldade pelos quais passei, por acreditar em mim e por todo o incentivo que vem me dando ao longo desta caminhada. Sem você, o desenvolvimento deste trabalho não teria sido possível! Muito obrigada por tudo!

À Walter Turato e Lorena Pozzo, por todo suporte e ajuda no microPET, com o imageamento que foi de fundamental importância na construção deste trabalho.

Agradeço aos integrantes e amigos dos grupos de pesquisa do Centro de Radiofarmácia e do Laboratório de Vetores Virais, por todo empenho, incentivo e ajuda para que os experimentos fossem realizados: Martha Sahylí Ortega Pijeira, Arian Perez Nario, Ruan Medrano, Aline Hunger, Marlous Lana e ao Jonathas Xavier da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Sem a parceria de vocês este trabalho não seria possível! Aprendi muito com todos! Muito obrigada!

Ao MSc. Jair Mengatti, pela contribuição no que foi necessário para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer a todos os servidores da instalação Aceleradores de Cíclotrons, especialmente à Décio, Enocles e Henrique, pela amizade sincera, por toda atenção e preocupação no preparo das amostras para a pesquisa.

À Edvaldo pela amizade, disposição e alegria nos muitos e muitos transportes que precisou realizar de amostras entre às instalações do Cíclotron e da Radiofarmácia e no carregamento das pesadas blindagens.

Às equipes de proteção radiológica das instalações Aceleradores de Cíclotrons e Centro de Radiofarmácia, em especial, Eduardo, Malvina e Olavo, por todo auxílio e ensinamentos nos trabalhos.

À equipe da produção da Radiofarmácia, em especial Bruzinga e Rosana, sempre muito atenciosos e dispostos a ajudar.

Ao pessoal da secretaria do Centro de Radiofarmácia: Neli, Fátima, Eli e Viviane, todos muito simpáticos e sempre dispostos a ajudar.

Ao pesquisador do Centro de Biotecnologia, Daniel Perez, por permitir utilizar a estrutura de seu laboratório para cultura de células.

Gostaria de agradecer por toda a amizade e todo o apoio recebido nos momentos de alegria e dificuldades compartilhadas, muito obrigada à Tânia, Daphne Said, Maria Ângela, Vanessa, Amanda, Marcelo Thaad, Danielle Seo, Érica, Ana Paula Funari, Ariel, Natanael, Soraya Kazuma, Jefferson, Raquel, Adriana, Cristian e Luíza.

À toda equipe do Biotério, Neide, Cecília, Ismária, Glaucie e prof. Nanci “in memorian”, pela atenção, fornecimento dos animais e auxílio nos cuidados com os mesmos.

À banca examinadora por aceitarem o convite.

Aos funcionários da pós-graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

À FAPESP pela bolsa concedida na época do treinamento técnico vinculado ao Projeto JP 2012/06875-6 do prof. Emerson Bernardes, onde tudo começou.

Agradeço também à Comissão Nacional de Energia Nuclear, CNEN, pela bolsa concedida durante o Mestrado.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2:

Figura 2.1 - O princípio básico da terapia gênica.

Figura 2.2 - Imagem da expressão do transgene.

CAPÍTULO 3:

Figura 3.1 - Capelas com exaustão, barreiras de chumbo e vidro plumbífero.

Figura 3.2 – Calibrador de dose Capintec.

Figura 3.3 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico.

Figura 3.4 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência para purificação.

Figura 3.5 - Bloco de alumínio, utilizado para aquecimento.

Figura 3.6 – Rota sintética para preparar o [^{18}F]-FHBG.

Figura 3.7– Perfil de análise por HPLC da mistura reacional.

A- Cromatograma UV correspondente ao precursor

B- Radiocromatograma correspondente ao intermediário.

Figura 3.8 - Análise por HPLC da obtenção do [^{18}F]-FHBG.

Figura 3.9 - Cromatograma do [^{18}F]-FHBG quente.

Figura 3.10 - Cromatograma do [^{18}F]-FHBG quente, após purificação por HPLC.

Figura 3.11A - Cromatograma UV do FHBG authentic produto frio padrão.

Figura 3.11B - Controle de qualidade do produto formulado [^{18}F]-FHBG.

Figura 3.11C - Cromatogramas sobrepostos da formulação final co-injetada com o FHBG authentic (padrão).

Figura 3.12 - Controle de qualidade do produto formulado [^{18}F]-FHBG por HPLC -Pureza Radioquímica da amostra injetada.

Figura 3.13 - Curva de calibração previamente obtida para determinação da atividade específica do radiofármaco.

CAPÍTULO 4:

Figura 4.1 - captação do [^{18}F] FHBG (substrato de TK)

Figura 4.2 – Transporte e metabolismo [^{18}F] FDG.

Figura 4.3 - Expressão relativa de RNAm de TK nas linhagens repórter B16-TK, B16-GFP, LLC-TK e LLC-GFP.

Figura 4.4 – Estudo de captação *in vitro* de [^{18}F]-FHBG nas células B16F10-TK e LLC-TK.

Figura 4.5 - Estudo de captação *in vitro* de [^{18}F]-FDG nas células B16F10-TK e LLC-TK.

Figura 4.6 - Gráfico apresentando a captação específica de FDG e FHBG nas células B16F10 e LLC transduzidas com o gene da tirosina quinase (TK) em comparação com as células controle (GFP).

CAPÍTULO 5:

Figura 5.1 – Mecanismo de tomografia por emissão de pósitrons (PET).

Figura 5.2 - Padronização da detecção de lesões metastáticas com [¹⁸F] FDG.

Figura 5.3 - Padronização da detecção de lesões metastáticas com [¹⁸F] FHBG.

Figura 5.4 - Imagens PET/CT representativas dos resultados do Modelo Profilático de Imunoterapia.

Figura 5.5 – Peso dos animais aos 21 e 29 dias de tratamento profilático.

Figura 5.6 - Imagens PET/CT-3D representativas dos resultados do Modelo Terapêutico de Imunoterapia.

Figura 5.7 - Contagem do número de lesões metastáticas no modelo de vacinação terapêutica.

Figura 5.8 - Peso dos animais aos 21 e 29 dias de tratamento terapêutico.

Figura 5.9 – Histologia do tecido pulmonar com coloração H&E em animais C57BL/6 inoculados intravenosamente com as células B16-TK.

Figura 5.10 – Quantificação do número de focos metastáticos por coloração H&E no tecido pulmonar de animais C57BL/6 inoculados intravenosamente com as células B16-TK.

Figura 5.11 – Coloração de Fontana-Masson do tecido pulmonar de animais C57BL/6 inoculados intravenosamente com as células B16-TK

Figura 5.12 - Quantificação do número de focos metastáticos por coloração de Fontana-Masson no tecido pulmonar de animais C57BL/6 inoculados intravenosamente com as células B16-TK.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3:

Tabela 3.1 - Soluções e reagentes utilizados na síntese manual do radiofármaco [^{18}F] FHBG

Tabela 3.1 - Materiais utilizados na síntese manual do radiofármaco [^{18}F] FHBG

Tabela 3.3 – Variação da atividade de ^{18}F - durante a reação e o rendimento de incorporação do ^{18}F - no precursor para formação do composto fluoro-intermediário.

Tabela 3.4- Resultados da matriz experimental executada com base em um desenho central composto rotacional para avaliar o grau de desproteção a diferentes valores de temperatura, tempo e volume de HCl 1M.

CAPÍTULO 4:

Tabela 4.1 – Primers para qPCR da TK

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µCi	Microcurie
µL	Microlitro
µmol	Micromol
¹⁸ F	Radioisótopo de flúor com número de massa 18
Bq	Bequerel
CB	Centro de Biotecnologia
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cpm	Contagens por minuto
DMEM	Eagle modificado por Dulbeco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
FDG ¹⁸ F	Fluodesoxiglicose (18)
FHBG ¹⁸ F	9- [4- ¹⁸ F-fluoro-3-hidroximetil-butil) guanina
FIG	Figura
g	Grama
GBq	Gigabecquerel
H	Horas
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
K222	Kryptofix
M	Molar
MC1R	Melanocortin 1 Receptor
MDM2	Murine double minute 2
mg	Miligrama
min	Minutos
n	Números
PBS	Tampão fosfato-salina
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
pH	Potencial hidrogeniônico

RCY	Rendimento radioquímico
RNA	Ácido ribonucleico
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SBF	Soro Fetal Bovino
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
$T_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TAB	Tabela
TK	Timidina quinase
T_R	Tempo de retenção
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta

RESUMO

FREIRE, M.R.V.B. ***Uso da Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) para identificação precoce de metástases e investigação da eficácia terapêutica da combinação p19arf e Interferon-Beta em melanoma murino.*** 2017. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

O melanoma maligno é um tipo de câncer com grande risco de produzir metástases e com altas taxas de mortalidade resultantes de diagnósticos tardios e falta de tratamentos eficazes. Ao longo dos últimos anos, a terapia gênica voltada para o câncer e o desenvolvimento de métodos capazes de visualizar processos moleculares e celulares ao longo da terapia, tem recebido especial atenção. Diante deste quadro, nossos objetivos foram utilizar o sistema de Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) para diagnosticar precocemente tumores e investigar a eficácia terapêutica de uma nova imunoterapia em um modelo animal de melanoma metastático. Visando atingir esses objetivos, padronizou-se a síntese e realizou-se o controle de qualidade do 9- [4- ^{18}F -fluoro-3-hidroximetil-butil) guanina, [^{18}F] FHBG, considerado o padrão-ouro em estudos clínicos, para acompanhamento de terapia gênica por PET. **Métodos:** Sintetizou-se o [^{18}F] FHBG, por substituição nucleofílica tipo 2 do precursor tosilato com [^{18}F] fluoreto de potássio /Kryptofix 2.2.2, seguido de desproteção com HCl 1 M e purificação por HPLC. A identidade química, pureza radioquímica e atividade específica do [^{18}F] FHBG foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Introduziu-se o gene de timidina quinase (TK) com o vetor retroviral pCL-TK nas linhagens B16F10 (melanoma murino) e LLC (carcinoma de pulmão murino). Os estudos de captação *in vitro* dos radiotraçadores [^{18}F] FHBG e [^{18}F] FDG foram realizados nas linhagens celulares tumorais murinas transduzidas ou não com a proteína TK. Para os estudos *in vivo*, camundongos C57BL6 previamente inoculados intravenosamente com células de melanoma expressando a enzima TK, foram imageados subsequentemente utilizando os radiotraçadores [^{18}F] FDG e [^{18}F] FHBG. A eficácia da imunoterapia foi testada em modelo profilático e terapêutico animal de melanoma metastático. **Resultados:** O tempo de síntese total do [^{18}F] FHBG variou entre 80-150 minutos. O rendimento radioquímico variou entre 1-4%, (n = 19) decaimento corrigido. A pureza radioquímica foi superior a 99% e a atividade

específica variou entre 0,14GBq/ μ mol-0,21GBq/ μ mol. Com a introdução do gene timidina quinase (TK), obtiveram-se as linhagens repórter B16F10-TK e LLC-TK, para os estudos *in vitro*. As células B16F10 e LLC, expressando GFP foram utilizadas como linhagens controles. Estudos *in vitro* com o [18 F] FHBG revelaram uma captação cerca de 4 vezes maior em células que expressam TK (B16-TK e LLC-TK) em comparação com as células controle GFP. O [18 F] FDG apenas captou cerca de duas vezes mais em células TK do que em células que expressam GFP. A detecção de tumores em modelo animal de metástase pulmonar com o [18 F] FDG ocorreu a partir de 15 dias do estabelecimento das lesões. No entanto, nos estudos *in vivo* com [18 F] FHBG, houve captação apenas na região intestinal, durante as três semanas em que os animais foram acompanhados. A imunoterapia com células tratadas pela combinação de p19Arf e IFN β , em camundongos C57BL6 com metástase pulmonar, conferiu redução do tamanho dos focos metastáticos aos animais tratados. **Conclusões:** Neste trabalho padronizou-se a síntese manual do [18 F] FHBG, o qual foi avaliado em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* confirmaram a especificidade do [18 F] FHBG no monitoramento da expressão de HSV1-tk em linhagens celulares. No entanto, o [18 F] FHBG não se acumulou nas lesões metastáticas *in vivo* e estudos posteriores serão necessários para uma melhor caracterização utilizando o [18 F] FHBG. O resultado do tratamento combinado de p19Arf e IFN β foi promissor para o tratamento de lesões metastáticas.

Palavras chave: Melanoma, Timidina quinase (HSV1-TK), Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), Terapia Gênica, [18 F] FHBG.

ABSTRACT

FREIRE, M.R.V.B. ***Positron Emission Tomography (PET) as a tool for early detection of metastases and evaluation of the therapeutic efficacy of the combination p19ARF and Interferon Beta using metastatic mouse model of melanoma.*** 2017. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Malignant melanoma is a type of cancer with a great risk of producing metastases and with high mortality rates resulting from late diagnosis and lack of effective treatments. Over the past few years, directed gene therapy for cancer and the development of methods to visualize molecular and cellular processes throughout therapy, have received special attention. In this context, our aim was to use the Positron Emission Tomography (PET) system, as a tool, for early detection of tumors and investigate the therapeutic efficacy of a new immunotherapy in an animal model of metastatic melanoma. To achieving these goals, the synthesis of [^{18}F] FHBG, the gold standard in clinical studies for monitoring gene therapy by PET, was standardized and the quality control was performed. We also present the results of *in vitro* uptake and *in vivo* evaluation of [^{18}F] FHBG, compared to [^{18}F] FDG, the most commonly used radiopharmaceutical for diagnosis in oncology by PET. The vaccine was derived from transduced B16F10-TK cells with the adenoviral vectors AdRGDPGp19Arf and AdRGDPGIFN β . **Methods:** [^{18}F] FHBG was synthesized by type 2 nucleophilic radiofluorination of a tosylate precursor with [^{18}F] potassium fluoride / Kryptofix 2.2.2, followed by deprotection with 1N HCl and purification by HPLC. The chemical identity, radiochemical purity and specific activity of [^{18}F] FHBG were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The thymidine kinase (TK) gene was introduced with the pCL-TK retroviral vector into the B16F10 (murine melanoma) and LLC (murine lung carcinoma) lines. *In vitro* uptake studies of [^{18}F] FHBG and [^{18}F] FDG were performed on cell lines transduced or not with TK protein. For *in vivo* studies, C57BL6 mice, previously injected with HSV1tk expressing tumors, were subsequently imaged using the [^{18}F] FDG and [^{18}F] FHBG radiotracers. The efficacy of immunotherapy was tested in a prophylactic and therapeutic animal model of metastatic melanoma.

Results: The total synthesis time of [^{18}F] FHBG ranged from 80-150 min. The radiochemical yield ranged from 1-4%, (n = 19) corrected decay. Radiochemical purity was greater than 99% and the specific activity ranged from 0.14GBq / μmol - 0.21GBq / μmol . With the introduction of the thymidine kinase (TK) gene, the B16F10-TK and LLC-TK reporter lines were obtained for *in vitro* studies, B16F10 cells and LLC, expressing GFP, were used as controls. In vitro studies with [^{18}F] FHBG revealed about 4-fold uptake in TK-expressing cells (B16-TK and LLC-TK) compared to GFP control cells. [^{18}F] FDG binds only about twice as much in TK cells as in cells expressing GFP. The detection of tumors in an animal model of pulmonary metastasis with [^{18}F] FDG occurred 15 days after lesion establishment. However, the *in vivo* studies with [^{18}F] FHBG, the uptake was only found in the intestinal region, over the 3 weeks in which the mice were followed. Immunotherapy with cells treated by the combination of p19Arf and IFN β , in C57BL6 mice with pulmonary metastasis, reduced the size of the metastatic foci in treated animals. **Conclusions:** In this study we demonstrate the standardization of [^{18}F] FHBG synthesis and its use in *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* studies have confirmed the specificity of [^{18}F] FHBG to monitor HSV1-tk expression in cell lines. However, [^{18}F] FHBG did not accumulate in the metastatic lesions *in vivo* and further studies will be required for a better characterization using [^{18}F] FHBG. The outcome of the combined treatment of p19Arf and IFN β was promising for the treatment of metastatic lesions.

Key Words: Melanoma, Thymidine kinase (HSV1-TK), Positron Emission Tomography (PET), Gene therapy, [^{18}F] FHBG.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Visão geral do trabalho e importância do problema levantado	21
1.2 Objetivo geral do trabalho	25
1.3 Justificativa.....	25
1.4 Esboço da Dissertação	26
1.5 Referências bibliográficas.....	27
 CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	 29
2.1 Melanoma maligno	29
2.2 Imunoterapias para melanoma.....	32
2.3 Imagem molecular	37
2.4 [¹⁸ F] FHBG do início às aplicações atuais.....	41
2.5 Referências bibliográficas.....	44
 CAPÍTULO 3: SÍNTESE E CONTROLE DE QUALIDADE DO [¹⁸F] FHBG ...	 49
3.1 Objetivos específicos.....	49
3.2 Revisão bibliográfica específica	49
3.3 Materiais e métodos	53
3.4 Resultados e discussões.....	59
3.5 Conclusões	71
3.6 Referências bibliográficas.....	72

CAPÍTULO 4: ESTUDOS *IN VITRO* DE CAPTAÇÃO [¹⁸F] FDG X [¹⁸F]

FHBG	75
4.1 Objetivos específicos.....	75
4.2 Revisão bibliográfica específica	76
4.3 Materiais e métodos	78
4.4 Resultados e discussões.....	84
4.5 Conclusões	89
4.6 Referências bibliográficas.....	89

CAPÍTULO 5: ESTUDOS *IN VIVO* IMAGEAMENTO [¹⁸F] FDG X [¹⁸F] FHBG E IMUNOTERAPIA

5.1 Objetivos específicos.....	93
5.2 Revisão bibliográfica específica	94
5.3 Materiais e métodos	96
5.4 Resultados e discussões.....	103
5.5 Conclusões	114
5.6 Referências bibliográficas.....	114

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

6.1 Conclusões finais.....	124
6.2 Sugestões para pesquisas futuras	125

ANEXO A: AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE BIOSSEGURANÇA – INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES.

ANEXO B: AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE BIOSSEGURANÇA – DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA E ONCOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

ANEXO C: AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 Visão geral do trabalho e importância do problema levantado

A incidência de melanoma metastático aumentou nas últimas três décadas e a taxa de mortalidade continua a aumentar mais rapidamente do que a taxa da maioria dos cânceres. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em todo o mundo há 66.000 mortes por ano de câncer de pele, com aproximadamente 80% devido ao melanoma (Hodi *et al.*, 2010). No Brasil, mesmo o câncer de pele sendo o mais frequente e corresponda a 30% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão, embora seja o mais grave devido a sua alta possibilidade de metástase (estimativa de casos em 2016 foram de 3 mil casos em homens e 2.670 casos em mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região sul (Inca, 2016).

O melanoma metastático continua a ser uma doença letal com uma taxa de remissão a longo prazo de menos de 10% (Agarwala, 2009). A sobrevivência média de pacientes, de acordo com o *American Joint Committee on Cancer stage IV* é inferior a 1 ano (Hodi *et al.*, 2010). Apesar de muitos anos de pesquisa, não houve um novo medicamento aprovado para esta doença em mais de duas décadas. O tratamento somente com quimioterapia em alguns pacientes é apenas paliativo e não foi observada vantagem do uso de quimioterapia combinada ou quimio-imunoterapia em ensaios randomizados. O uso de altas doses de IL-2, produz algumas remissões a longo prazo e está disponível somente para indivíduos altamente selecionados em centros especializados nos

EUA, mas não é prático para a maioria dos pacientes. Pesquisas estão em andamento na exploração de novas abordagens imunoterapêuticas para pacientes com melanoma metastático (Agarwala, 2009). A biologia do melanoma oferece várias oportunidades para o seu tratamento por abordagens de terapia gênica, bem como desafios. O alto potencial metastático do melanoma tardio representa um desses desafios. O melanoma é considerado um tumor imunogênico, abrindo a possibilidade de gerar células imunes reativas ao tumor com o auxílio da tecnologia de transferência de genes (Strauss and Costanzi-Strauss).

Dessa forma, a terapia gênica, representa um tratamento promissor para o melanoma em estágio avançado e a imagem da terapia gênica no melanoma metastático é essencial para avaliar o sucesso da estratégia terapêutica. A imagem molecular surgiu como uma tecnologia não-invasiva para mapear a expressão gênica *in vivo* e fornece ferramentas promissoras para o progresso da medicina molecular e terapia gênica (Larson *et al.*, 1997; Peñuelas *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004). A imagem *in vivo* por Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) pela combinação do gene repórter apropriado e o radiofármaco para PET, pode fornecer informações qualitativas e quantitativas inestimáveis na investigação da eficácia da terapia gênica. A imagem PET pode ser usada para definir parâmetros não disponíveis por outras técnicas que sejam de interesse substancial não apenas para a compreensão adequada do processo de terapia genética, mas também para seu desenvolvimento futuro e aplicação clínica em seres humanos. Diante deste cenário, este trabalho foca na base da biologia molecular da terapia gênica e da imagem molecular, utilizando os fundamentos da imagem de expressão gênica *in vivo* por PET e a aplicação de PET à terapia gênica em um modelo pré-clínico de melanoma metastático murino.

Visando atingir esses objetivos, parte deste trabalho foi desenvolvido no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo ICESP-FMUSP, no que diz respeito às metodologias para o preparo do vetor retroviral pCL-TK, das linhagens celulares repórter (B16F10-TK e LLC-TK), das linhagens controles (B16F10-GFP e LLC-GFP), dos vetores AdRGDPGp19Arf, AdRGDPGIFN β e da vacina antitumoral (derivada de células B16F10-TK transduzidas com os vetores

adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β). A outra parte do trabalho foi desenvolvida no Centro de Radiofarmácia do IPEN e consistiu na padronização da síntese radiofarmacêutica do [^{18}F] FHBG, incluindo sua avaliação pré-clínica *in vitro* e *in vivo* e comparação ao radiofármaco [^{18}F] FDG. A imunoterapia desenvolvida no ICESP também foi avaliada num modelo de melanoma metastático murino, pela primeira vez, no Centro de Radiofarmácia do IPEN.

A associação da tecnologia PET à investigação da imunoterapia poderá ser utilizada futuramente em nosso laboratório de muitas maneiras diferentes, como por exemplo, aplicada para evitar procedimentos invasivos para monitoramento da imunoterapia, diagnosticar com precisão a patologia para um melhor planejamento da abordagem terapêutica, aplicada como uma maneira quantitativa não invasiva de monitorar a localização, a magnitude e a persistência da expressão gênica ao longo do tempo, e também ajudaria a uma melhor compreensão da biologia vetorial e da farmacologia dedicada ao desenvolvimento de vetores mais seguros e mais eficientes (Peñuelas *et al.*, 2004).

O grupo do Laboratório de Vetores Virais (LVV, ICESP-FMUSP) tem desenvolvido vetores virais para a transferência gênica de fatores antitumorais em células de melanoma. Trabalhos recentes do grupo vêm explorando o uso de vetores adenovirais responsivos a p53 (gene supressor de tumor) como veículo para a transferência simultânea de p19Arf e interferon-beta em células de melanoma. Com esta técnica, morte celular e ativação da resposta imunológica atuam ao mesmo tempo para eliminar o tumor. Nos trabalhos mencionados, foram observados resultados satisfatórios desta nova imunoterapia sendo utilizados como ferramentas de investigação ensaios como o de imunoabsorção enzimática ou do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) e imunofluorescência para verificação da transferência gênica.

Uma tecnologia fundamental do LVV, portanto, é o uso de um promotor responsivo a p53 para controlar expressão do transgene codificado pelo vetor. Hoje no LVV há três gerações de vetores com promotor responsivo a p53, incluindo vetores retrovirais (pCLPG), adenovirais (AdPG) e adenovírus adenoassociado (AAVPG) (Strauss and Costanzi-Strauss, 2004; Bajgelman and Strauss, 2008; Bajgelman *et al.*, 2013). Os vetores com promotor PG, responsivo

a p53, foram empregados para transferir cDNAs de interesse, como p19Arf. Foi observado em estudos, que o sistema de retroalimentação positiva facilita a expressão viral, e que p19Arf age inibindo MDM2 e ativando a proteína p53 endógena, tendo como resultado, inibição da proliferação de células tumorais (Merkel *et al.*, 2010).

Em seguida, o LVV testou a utilização do AdPG para transferência de ambos os genes terapêuticos (p19Arf e IFN β) para as células-alvo (Merkel *et al.*, 2013). A utilização de p19Arf, um supressor de tumor e inibidor da proteína murine double minute 2 (MDM2), como gene terapêutico, visa complementar as atividades do p53 celular endógeno e, como consequência, promover a expressão a partir do vetor e também inibir a proliferação de células tumorais. Porém, a transferência de p19Arf sozinho produziria efeito somente nas células que foram transduzidas, resultando num efeito limitado. Por este motivo, elaborou-se uma imunoterapia combinando p19Arf e IFN β , uma proteína secretada com funções anti-tumorais e que promove ativação da resposta imunológica, numa estratégia para garantir morte no tumor primário e eliminação das células metastáticas (Aline Hunger Ribeiro, dados de sua dissertação de Mestrado no LVV, ainda não publicados).

O LVV tem interesse no uso de imagem PET não invasiva para visualização dos processos de transferência gênica, eficiência da transdução, controle da expressão dos transgenes e atividade dos mesmos com o objetivo de comprovar a eficácia da nova imunoterapia utilizando p19arf e IFN β em melanoma metastático. O radiofármaco mais utilizado para diagnóstico em oncologia, e atualmente o único produzido no Brasil para PET, é o *Fluodesoxiglicose* (18) (^{18}F -FDG). Todavia, a acumulação do ^{18}F -FDG não é característica exclusiva de células tumorais, também pode estar presente em várias outras condições incluindo inflamações, infecções e outros processos benignos. Estudos recentes indicam que mesmo a combinação do ^{18}F -FDG-PET e Tomografia Computadorizada (CT) não são ainda suficientemente sensíveis para detectar com segurança a presença de metástases e diferenciá-las de outros processos inflamatórios ou infecciosos. Sendo assim, no Centro de Radiofarmácia do IPEN, foi padronizada a síntese do radiofármaco ^{18}F 9- [4- ^{18}F -fluoro-3-hidroximetil-butil) guanina, [^{18}F] FHBG, para identificar com precisão a presença de células

geneticamente modificadas para expressar a proteína timidina quinase (TK, derivado do *Herpes Simplex Virus*) e esta abordagem foi empregada para detectar metástases e futuramente monitorar o efeito terapêutico após ministração de uma imunoterapia.

1.2 Objetivo geral do trabalho

Usar o sistema PET para realizar imageamento não invasivo de animais portadores de tumores metastáticos e avaliar a eficácia de uma nova imunoterapia em um modelo de melanoma metastático murino.

1.3 Justificativa

O uso de imageamento não invasivo oferece o benefício de monitorar a progressão tumoral em tempo real, mesmo em tecidos profundos, ao longo do ensaio sem a necessidade de sacrificar o animal. Em particular, o sistema de imagem PET representa uma tecnologia com alta sensibilidade e relevância clínica. Mesmo assim, o uso desta tecnologia em modelos animais ainda se encontra em fase de desenvolvimento no Brasil. Este projeto apoiará tanto a linha de investigação biológica quanto a tecnológica. Nesta proposta, estão unidas a investigação de uma imunoterapia experimental com uma tecnologia de ponta que permitirá a avaliação da progressão tumoral mesmo em tecidos não acessíveis a paquímetro e de difícil imageamento por outras metodologias ou as que não apresentam relevância clínica.

1.4 Esboço da Dissertação

O radiofármaco [^{18}F] FHBG é considerado o padrão-ouro em estudos clínicos, para acompanhamento de terapia gênica por PET (Mešćić *et al.*, 2013). No **capítulo 1**, apresentamos o problema levantado, falta de opções de tratamentos eficazes para o tratamento de pacientes com melanoma em estágio avançado, cuja incidência vem aumentando nos últimas décadas com o envelhecimento da população e a necessidade de desenvolvimento de tecnologias avançadas para o diagnóstico preciso de metástases e acompanhamento do paciente durante o tratamento. Apresentamos também uma visão geral dos trabalhos desenvolvidos no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICESP) e no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), incluindo objetivo geral do trabalho e sua justificativa para ser desenvolvido.

No **capítulo 2**, é apresentada a revisão bibliográfica geral referente ao melanoma metastático, imunoterapias para melanoma em estágio avançado, imagem molecular e como o radiofármaco [^{18}F] FHBG vem sendo aplicado atualmente. No início dos capítulos subsequentes, serão apresentadas as revisões bibliográficas específicas pertinentes a cada um.

O **capítulo 3** trata dos aspectos gerais teóricos e descreve como foi realizada a parte prática em relação à preparação do radiofármaco marcado com o flúor-18, [^{18}F] FHBG. Primeiramente na parte teórica, o capítulo descreve aspectos da elaboração do flúor-18 e as formas mais comuns de radiomarcagem de um composto com um radioisótopo emissor de pósitrons. Na descrição da parte prática, cada etapa do processo foi cuidadosamente analisada e relatada, e ao final foram realizadas análises de controle de qualidade para: identificação química do produto obtido, pureza radioquímica, atividade específica e pH do produto formulado, de forma a se confirmar se o radiofármaco encontrava-se adequado, para aplicações em avaliações biológicas.

No **Capítulo 4** encontram-se a descrição dos trabalhos desenvolvidos no ICESSP para obtenção das linhagens celulares geneticamente modificadas e os

subsequentes estudos *in vitro* realizados com essas linhagens e os radiotraçadores no IPEN.

No **capítulo 5**, apresentamos as metodologias e resultados obtidos no uso e comparação dos radiotraçadores [^{18}F] FDG e [^{18}F] FHBG em detectar metástases num modelo de melanoma metastático murino e os resultados da eficácia de uma nova imunoterapia, testada em modelo profilático e terapêutico de melanoma metastático.

Por fim no **Capítulo 6**, apresentamos as conclusões finais do trabalho realizado e sugestões para pesquisas futuras.

1.5 Referências bibliográficas

BAJGELMAN, M. et al. AAVPG: A vigilant vector where transgene expression is induced by p53 **Virology**, v. In press, 2013.

BAJGELMAN, M. C.; STRAUSS, B. E. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 8-13, Feb 2008. ISSN 0042-6822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076963> >.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, v. 363, n. 8, p. 711-23, Aug 2010. ISSN 1533-4406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525992> >.

[HTTP://WWW.IARC.FR/](http://www.iarc.fr/). IARC

International Agency For Research On Cancer. World Health Organization 2010.

MERKEL, C. A. et al. Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. **BMC Cancer**, v. 10, p. 316, 2010. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20569441 >.

MERKEL, C. A. et al. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo. **Cancer Gene Ther**, v. 20, n. 5, p. 317-25, May 2013. ISSN 1476-5500 (Electronic) 0929-1903 (Linking).

STRAUSS, B. E.; COSTANZI-STRAUSS, E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. **Virology**, v. 321, n. 2, p. 165-72, Apr 10 2004. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15051377 >.

AGARWALA, S. S. Current systemic therapy for metastatic melanoma. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 9, n. 5, p. 587-95, May 2009. ISSN 1744-8328. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445576> >.

BAJGELMAN, M. et al. AAVPG: A vigilant vector where transgene expression is induced by p53 **Virology**, v. In press, 2013.

BAJGELMAN, M. C.; STRAUSS, B. E. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 8-13, Feb 2008. ISSN 0042-6822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076963> >.

INCA, B. M. D. S. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, 2016. Accessed on: 20.08.2017.

LARSON, S. M.; TJUVAJEV, J.; BLASBERG, R. Triumph over mischance: a role for nuclear medicine in gene therapy. **J Nucl Med**, v. 38, n. 8, p. 1230-3, Aug 1997. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9255156> >.

MERKEL, C. A. et al. Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. **BMC Cancer**, v. 10, p. 316, 2010. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20569441 >.

MERKEL, C. A. et al. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo. **Cancer Gene Ther**, v. 20, n. 5, p. 317-25, May 2013. ISSN 1476-5500 (Electronic) 0929-1903 (Linking).

PEÑUELAS, I. et al. Positron emission tomography and gene therapy: basic concepts and experimental approaches for in vivo gene expression imaging. **Mol Imaging Biol**, v. 6, n. 4, p. 225-38, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 1536-1632. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262238> >.

SHAH, K. et al. Molecular imaging of gene therapy for cancer. **Gene Ther**, v. 11, n. 15, p. 1175-87, Aug 2004. ISSN 0969-7128. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141158> >.

STRAUSS, B. E.; COSTANZI-STRAUSS, E. Gene Therapy for Melanoma: Progress and Perspectives. In: (Ed.). **Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**: INTECH chap. 12, p.283-317.

CAPÍTULO 2

REV. BIBLIOGRÁFICA GERAL

2.1 Melanoma maligno

O melanoma maligno é uma das neoplasias malignas mais agressivas em seres humanos e é responsável por quase 60% dos tumores de pele letais (Bandarchi *et al.*, 2010). É um tipo de câncer de pele, agressivo, histologicamente composto por melanócitos neoplásicos, atípicos. Desenvolve-se mais frequentemente na face, orelhas, cabeça, pescoço, parte superior das costas em homens e nos membros inferiores em mulheres ([Http://Www.larc.fr/](http://www.larc.fr/), 2010). É a forma mais rara de câncer de pele, mas é mais provável do que outros tipos de câncer de pele para formar metástases (Mckibbin, 2015).

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Sua incidência vem aumentando em populações brancas nas últimas duas décadas em todo o mundo e parece ser menor e estável em indivíduos de pele escura (africanos, americanos nativos, asiáticos e hispânicos) (MacIennan *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1999; Van Der Rhee *et al.*, 1999; Apalla *et al.*, 2017). O aumento da incidência de melanoma se deve parcialmente a sua detecção precoce e em parte ao aumento da expectativa de vida da população. Este fato torna o melanoma um desafio para a Saúde Pública (Kelly, 1998). A incidência de melanoma é igual para homens e mulheres e incomum em crianças, embora haja relatos de que a incidência pode ser maior em mulheres (Bandarchi *et al.*,

2010). Um paciente típico é geralmente um adulto caucasiano na 4^a década de vida com lesão nas costas (homens) e pernas (mulheres). Estudos revelaram que os locais mais comuns em ordem decrescente são o tronco (43,5%), extremidades (33,9%), locais acral (11,9%) e cabeça e pescoço (10,7%) (Radović-Kovacević *et al.*, 1997).

No Brasil, estima-se que 6000 novos casos ocorram a cada ano, resultando em 1300 óbitos. A população brasileira é composta por múltiplas raças, com muitas pessoas com mais de uma herança racial e, portanto, uma variedade de cores de pele. A população é frequentemente exposta à radiação UV. O acesso aos cuidados de saúde é muitas vezes difícil, especialmente para aqueles que vivem em áreas rurais (Vazquez *et al.*, 2015). Este estudo mostra que os pacientes brasileiros de melanoma apresentaram o menor índice de sobrevida do que a média mundial atual. A alta prevalência de casos avançados no Brasil reforça a importância de estratégias locais para diagnosticar melanomas nos estágios iniciais e tratá-lo definitivamente (Vazquez *et al.*, 2015).

2.1.2 FATORES DE RISCO

Existe uma complexa interação entre fatores ambientais (exógenos) e fatores endógenos, indivíduos sensíveis ao sol, crianças e indivíduos com um padrão intermitente de exposição solar, parecem ser muito vulneráveis à luz solar, no que diz respeito à formação de melanoma, e devem ser completamente protegidos da exposição solar. Cerca de 65% dos melanomas malignos estão relacionados com a exposição ao sol (Katsambas and Nicolaidou, 1996). O papel da exposição crônica ao sol é controverso. Alguns estudos sugeriram que a exposição acumulada total ao sol é um fator muito importante, enquanto que a exposição ocupacional a longo prazo realmente pode ser protetora (Bandarchi *et al.*, 2010). São muitos os fatores de risco no desenvolvimento de melanoma maligno e incluem: pele clara, cabelo loiro ou ruivo, numerosas sardas, exposição exagerada à radiação U.V. (especialmente durante a infância), história anterior de câncer de pele, presença de nevos displásicos congênitos e histórico familiar ([Http://Www.larc.fr/](http://www.larc.fr/), 2010).

2.1.3 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Os melanomas malignos típicos geralmente se apresentam de acordo com a regra "ABCD": assimetria, borda irregular, cores múltiplas, diâmetro superior a 6 mm (Bandarchi *et al.*, 2010).

2.1.4 BIOLOGIA E GENÉTICA DO MELANOMA MALIGNO

Descobriu-se que mutações em dois genes estão relacionadas com histórico familiar de melanoma: gene CDKN2A (p16) no cromossomo 9p21 e gene CDK4 no cromossomo 12. O gene CDKN2A atua como um gene supressor de tumor e desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular e na senescência. As mutações do gene CDKN2A conferem susceptibilidade ao melanoma familiar. A perda parcial ou completa da expressão de p16 também foi identificada em casos isolados de melanomas. Outros genes, como MC1R "Melanocortin 1 Receptor" e genes de reparo de DNA, provavelmente serão mais importantes na determinação da susceptibilidade ao melanoma na população geral. Embora nevos e melanomas compartilhem alterações genéticas como mutações oncogênicas em BRAF e NRAS, os melanomas geralmente apresentam padrões recorrentes de aberrações cromossômicas como perdas dos cromossomos 6q, 8p, 9p e 10q juntamente com ganhos nos cromossomos 1q, 6p, 7, 8q, 17q, e 20q, enquanto os nevos benignos tendem a não ter aberrações cromossômicas detectáveis por hibridação genômica comparativa (CGH) ou cariotipagem (Bandarchi *et al.*, 2010).

A alta taxa de mortalidade relacionada ao melanoma está amplamente ligada a resistência à quimioterapia e à radioterapia. A transformação de melanócitos em células de melanoma ainda não está clara. Uma combinação de "up regulation" ou "down regulation" de vários efetores que atuam em diferentes vias parece estar envolvida na progressão dos melanócitos normais para células malignas metastáticas (Uong and Zon, 2010)

O conceito de crescimento radial e vertical do melanoma maligno é fundamental para compreender a sua tendência a formar metástases. O crescimento radial indica crescimento de modo horizontal no interior das camadas epidérmica e dérmica superficial. Com o decorrer do tempo, o padrão de crescimento assume um componente vertical, para baixo, penetrando nas camadas dérmicas mais profundas na forma de uma massa em expansão, porém sem maturação celular. Esse evento é anunciado clinicamente pelo desenvolvimento de um nódulo na fase de crescimento radial relativamente plana e correlaciona-se com o aparecimento de um clone de células com verdadeiro potencial metastático (Cotran, 2000).

2.2 Imunoterapias para melanoma

Imunoterapia do câncer consiste no tratamento do mesmo através da estimulação do sistema imunológico por meio do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica. As reações imunológicas podem ser resultado da interação antígeno-anticorpo ou dos mecanismos envolvidos na imunidade mediada por células. A produção de anticorpos está relacionada com os linfócitos B, enquanto que a imunidade mediada por células se relaciona com os linfócitos T. Os monócitos e os macrófagos também são células efetoras de imunidade e facilitam a atividade dos linfócitos T e de modificadores da resposta biológica como a interleucina (Inca, 2016).

A imunoterapia é classificada de acordo com as substâncias utilizadas e os seus mecanismos de ação em ativa e passiva (ou adotiva). Na imunoterapia ativa, substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica (imunoterapia inespecífica) e as vacinas de células tumorais (imunoterapia específica) são administradas com a finalidade de intensificar a resistência ao crescimento tumoral. A imunoterapia específica pode ser autóloga ou heteróloga. Vacinas produzidas a partir de cultura de células tumorais coletadas do próprio paciente (imunoterapia autóloga) ou de outro paciente com neoplasia semelhante (imunoterapia heteróloga). Na imunoterapia passiva ou adotiva, anticorpos antitumorais ou células mononucleares exógenas são administradas,

visando proporcionar capacidade imunológica de combate à doença (Inca, 2016).

Imunoterapias para melanoma tem sido extensivamente estudadas, pois esses tumores têm um número elevado de mutações, proporcionando um alto potencial imunogênico. Além disso, os melanomas geralmente têm um número relativamente alto de linfócitos infiltrantes de tumores, ativados contra antígenos de melanoma (Mckibbin, 2015).

Atualmente na clínica, imunoterapias estão sendo utilizadas para pacientes com melanoma em estágio II-III como adjuvante, dos quais, apenas parte tem a doença disseminada, com o objetivo de prevenir a recidiva da doença, prolongar a sobrevida livre de recidiva e, idealmente, prolongar a sobrevida total. Para pacientes com a doença em estágio IV, há necessidade da utilização de terapias sistêmicas adequadas, pois a sobrevida média para este grupo de pacientes é de apenas 6-9 meses (Garbe *et al.*, 2011)

2.2.1 IMUNOTERAPIA ADJUVANTE PARA MELANOMA EM ESTÁGIO II E III

A imunoterapia utilizando moduladores inespecíficos tem uma longa tradição no tratamento adjuvante do melanoma em estágio II / III (Schadendorf *et al.*, 2012). No início dos anos 90, o uso de interferon- α (IFN- α) foi aprovado como adjuvante no tratamento de melanoma de alto risco com base em ensaios clínicos (Kirkwood *et al.*, 1996; Pehamberger *et al.*, 1998). O interferon mostrou um efeito consistente na sobrevida livre de recidivas independente da dose e duração do tratamento para pacientes com melanoma em estágio menos avançado (Schadendorf *et al.*, 2012). Os dois maiores ensaios clínicos realizados com IFN- α como adjuvante em melanoma, mostraram que o uso do mesmo, foi mais benéfico para pacientes com a doença em estágio menos avançado (Eggermont *et al.*, 2005; Eggermont *et al.*, 2008). O tratamento adjuvante com IFN- α mostrou efeitos limitados para pacientes com estágios de melanoma mais avançado (Schadendorf *et al.*, 2012).

2.2.2 IMUNOTERAPIA PARA MELANOMA EM ESTÁGIO IV

Na situação metastática, a interleucina-2 é o único agente imunoterapêutico aprovado pela agência *Food and Drug Administration* (USA) em 1998. Em combinação com interferon e/ou com vários agentes quimioterapêuticos, a IL-2 está associada a um efeito tóxico substancial e a uma fraca eficácia que não aumenta a sobrevida total (Schadendorf *et al.*, 2012).

Apesar da taxa de resposta com altas doses de IL-2 ser de cerca de 16%, quando uma resposta é provocada, tende a ser de longa duração. O uso de IL-2, no entanto, está limitado a pacientes saudáveis por causa dos graves efeitos adversos e às vezes toxicidade potencialmente fatal que pode resultar da terapia. Os pacientes devem estar em geral com boas condições físicas e devem ter boas funções cardíacas, pulmonares, hepáticas e renais. Alguns dos efeitos adversos associados a uma dose elevada de IL-2 incluem: pressão arterial baixa, ritmos cardíacos irregulares, acumulação de líquido nos pulmões, insuficiência renal, hepatotoxicidade e febre alta (Schadendorf *et al.*, 2012).

O ipilimumab é um anticorpo monoclonal que bloqueia o antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos (anticorpo anti-CTLA-4) e foi aprovado em março de 2011, pelo FDA para melanoma metastático com base em dois estudos randomizados de fase III independentes que demonstram uma melhora na taxa de sobrevida total após 1, 2 e 3 anos em comparação com o grupo de controle (Phan *et al.*, 2003; Hodi *et al.*, 2010; Wolchok *et al.*, 2010). O ipilimumab foi a primeira nova terapia aprovada para melanoma metastático em mais de uma década, e a segunda imunoterapia aprovada para a doença metastática. Baseado neste passo importante do tratamento do melanoma metastático, novas estratégias adjuvantes no estágio III e terapias combinadas com agentes direcionados no estágio IV estão atualmente sendo exploradas (Schadendorf *et al.*, 2012).

2.2.3 TERAPIA GÊNICA PARA MELANOMA

A terapia gênica representa uma nova e promissora modalidade terapêutica, a qual considera-se uma promessa significativa para o tratamento de diversas doenças humanas, incluindo o câncer. O objetivo principal da terapia

gênica baseia-se em controlar eficazmente a expressão de genes endógenos ou transgenes na célula alvo, a fim de gerar um efeito biológico benéfico como a cura, ou o retardo da progressão da doença. Dentre os desafios a serem enfrentados para a aplicação da terapia gênica em doenças humanas destacam-se: a escolha de um gene terapêutico relevante, a seleção apropriada de sequências promotoras e reguladoras que conduzam a expressão do transgene, as características do vetor utilizado para o transporte do transgene para as células-alvo, o desenvolvimento de sistemas de monitoramento clínico da expressão do gene nos órgãos-alvo (Vallabhajosula, 2009). O material genético usado para a terapia gênica precisa ser introduzido nas células alvo para exercer o efeito terapêutico desejado. O termo transdução refere-se à incorporação de um gene externo nas células alvo e à expressão do produto gênico correspondente (FIG. 2.1). Genes não penetram dentro das células facilmente; eles precisam ser transportados por vetores virais ou plasmídeos. O ideal é que esses vetores sejam capazes de acolher grandes sequências de DNA com alta eficiência de transdução, as quais permitam o controle e orientação da expressão gênica.

Figura 2.3 - O princípio básico da terapia gênica. Transdução de um gene terapêutico para o interior da célula alvo e subsequente expressão gênica (produto gênico) conduzindo a um efeito terapêutico.

Fonte: (Vallabhajosula, 2009).

O processo de expressão dos genes transfectados envolve a transcrição de um gene em RNA mensageiro, e subsequente tradução do mRNA em um produto gênico ou uma proteína (como um peptídeo, enzima, receptor, transportador de membrana). A transcrição de um gene, todavia, é controlada por regiões regulatórias (como promotores e potenciadores) que estão

codificados no DNA. Promotores universais permitem a expressão do transgene em todas as células transduzidas (Vallabhajosula, 2009). Com base nesses conhecimentos, as estratégias da terapia gênica contra o câncer são direcionadas a matar as células tumorais, o que pode ser conseguido introduzindo-se um gene que causa a morte celular diretamente ou que promova uma resposta imunológica contra as células tumorais. Atualmente, o grupo do Laboratório de Vetores Virais (LVV- ICESP-FMUSP), liderado pelo Dr. Bryan Strauss, está explorando a combinação dessas estratégias em células de melanoma (Tg and Terapiagenica.Net.Br, 2011).

O princípio da terapia gênica consiste na transferência terapêutica de informação genética para uma célula alvo e continua a ser uma alternativa promissora na luta contra o câncer. No caso do melanoma, o uso de um tratamento experimental é justificado, uma vez que esta doença é incurável em estágios avançados (Strauss and Costanzi-Strauss). No entanto, a incorporação de materiais genéticos em células alvo muitas vezes não pode ser facilmente alcançada sem a criação de veículos moleculares, chamados vetores de terapia gênica (Kay *et al.*, 2001; El-Aneed, 2004). Idealmente, esses vetores devem apresentar as seguintes características: devem ser capazes de abrigar grandes sequências de DNA, devem transferir ou transduzir material genético para células alvo de forma eficiente, devem permitir a expressão de genes de forma controlada e direcionada, devem ser seguros tanto para o paciente quanto para o meio ambiente e ser produzidos em uma quantidade adequada a um custo razoável. Atualmente, os vetores de terapia gênica mais amplamente utilizados são vírus que não replicam (Peñuelas, Haberkorn, *et al.*, 2005).

Uma vez de posse destas ferramentas de transferência de genes, podemos nos concentrar nas opções de gene terapêutico que será inserido no vetor. As estratégias para a terapia gênica do câncer são muitas, mas compartilham um objetivo em comum em inibir ou destruir as células tumorais. Isto pode ser conseguido através da utilização de genes pró-apoptóticos, genes supressores de tumores, genes suicidas ou genes imunomoduladores (entre muitas outras opções). De fato, a sequência terapêutica não precisa ser um gene, mas o sistema RNA de interferência (RNAi- sequências que são capazes de bloquear a expressão de genes) pode ser empregado para bloquear a

expressão de genes críticos que contribuem para a progressão tumoral. Além disso, a estratégia de terapia gênica não precisa ser realizada diretamente nas células tumorais, mas pode ser aplicada a componentes do sistema imune, tais como células T ou células dendríticas, as quais exercerão a atividade antitumoral (Strauss and Costanzi-Strauss).

Um crescente corpo de trabalho pré-clínico apoia a noção de que a terapia gênica pode ser uma estratégia valiosa para o tratamento do melanoma. Até à data, alguns ensaios clínicos de terapia gênica de melanoma foram realizados. Com os avanços na compreensão da tecnologia da terapia gênica e da biologia do melanoma, um número crescente dessas abordagens experimentais tende a chegar em ensaios de fase III e ser oferecido a um número crescente de pacientes que possuem opções terapêuticas tão limitadas (Strauss and Costanzi-Strauss).

2.3 Imagem molecular

2.3.1 IMAGEM MOLECULAR EM ONCOLOGIA

Técnicas de imagem molecular monitoram e registram em espaço e tempo real os processos biológicos *in vivo* ao nível molecular ou celular, através do uso de sondas (traçadores) de imagem específicos, e dessa forma podem ser definidas. Tais técnicas apresentam a sensibilidade e especificidade necessárias para o diagnóstico precoce em oncologia (Vallabhajosula, 2009).

Atualmente, as técnicas tomográficas de imagem molecular mais sensíveis são o SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography* – Tomografia computadorizada por emissão de fóton único) e o PET (*Positron Emission Tomography* – Tomografia por emissão de pósitron), as quais diferem, portanto, no tipo de radiação emitida pelo radiofármaco utilizado. Essas técnicas permitem construir imagens por meio da obtenção de imagens planares dos órgãos e tecidos em diferentes ângulos ao redor do paciente e posterior reconstrução das mesmas para formação da imagem tridimensional (Saha *et al.*, 1998).

O sistema PET, por sua vez, proporciona maior resolução espacial da imagem reconstruída do que a gerada pelo SPECT, devido à emissão dos raios gama coincidentes pelos radionuclídeos emissores de pósitrons e o uso de detectores posicionados em círculos. Nas imagens geradas por PET a resolução é somente afetada pela distância percorrida pelo pósitron antes da colisão com um elétron (aniquilação), fator dependente da energia do pósitron emitido pelo radionuclídeo (Pimlott and Sutherland, 2011).

Dentre os vários radionuclídeos emissores de pósitrons como: ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{68}Ga e ^{82}Rb , o ^{18}F (meia-vida de 110 minutos) é o que possui as características físicas mais favoráveis para imagem molecular devido à emissão de pósitrons de baixa energia (menor distância percorrida antes da aniquilação). Apesar de não ser comumente encontrado em biomoléculas, a substituição de um hidrogênio ou grupo hidroxila pelo ^{18}F acarreta apenas pequenas perturbações estéricas, se comparado aos agentes quelantes utilizados na química do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, atual radionuclídeo mais utilizado para obtenção de imagem pelo SPECT (Saha *et al.*, 1998).

2.3.2 IMAGEM MOLECULAR DIRECIONANDO A TERAPIA GÊNICA

O desenvolvimento de métodos de imagem molecular capazes de visualizar vetores virais, conseqüentemente a expressão de “transgenes” e formas não invasivas de acompanhar *in vivo* a eficácia do uso da terapia gênica contra o câncer, tem recebido particular atenção ao longo dos últimos anos. Tais métodos devem fornecer informações para muitas das questões relacionadas aos protocolos de terapia gênica como: se o vetor utilizado para transferência dos genes os transporta de maneira eficiente até o órgão/tecido alvo, se a transferência dos genes ocorre de modo eficiente, se ocorre expressão gênica para promover o efeito terapêutico desejado, e outras questões (Vallabhajosula, 2009).

A técnica PET tem sido muito utilizada para localizar a expressão de “transgenes” em ensaios clínicos e pré-clínicos envolvendo terapia gênica. A timidina quinase do vírus Herpes simples (HSV1-tk) tem sido estudada por mais

de 25 anos como gene suicida para o tratamento do câncer e, atualmente, como gene “repórter” empregando técnicas de imagem molecular (Serganova *et al.*, 2007).

Uma das estratégias utilizadas para visualizar a expressão gênica consiste na união de um gene terapêutico (TG) com um “gene repórter (RG)”, como o HSV1-tk e em seguida, o emprego de “radiotraçadores repórter (RP)” para PET ou SPECT.

O gene terapêutico e o “gene repórter” poderão ser ligados por um promotor comum e são inseridos (transferidos) para a célula tumoral alvo empregando-se, comumente, vetores virais com base no Herpes simples, lentivírus e adenovírus. Na sequência uma “sonda repórter” (RP) é usada para visualizar a expressão do “gene repórter”, o qual indiretamente proporcionará informação sobre a expressão do gene terapêutico (FIG. 2.2) (Vallabhajosula, 2009).

Figura 2.4 - Imagem da expressão do transgene. Imagem da expressão do transgene primeiro envolve a transdução de um vetor com ambos gene terapêutico e “gene repórter” (como HSV1-tk) para o interior da célula-alvo. Subsequente, imagem do produto gênico enzima HSV1, usando um radiotraçador repórter como [^{18}F] FHBG.

Fonte: (Vallabhajosula, 2009).

Como sondas (traçadores) radiomarcadas (RRP's), vários derivados de ^{18}F -acilguanossina e ^{18}F -pirimidina têm sido sintetizados e utilizados como substrato específico para HSV1-tk (Soghomonyan *et al.*, 2007). Nesse projeto, realizamos a síntese do derivado acilguanossina [^{18}F] FHBG (FIG. 2.3), cuja

produção permitiu uma maior interação com os grupos de pesquisa estabelecidos no ICESP (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo) e como já mencionado, desenvolvem uma linha de pesquisa ativa com uso de vetores virais. Além disso, possibilitará o uso de tais vetores na investigação pré-clínica de métodos alternativos de detecção precoce de tumores metastáticos e acompanhamento da eficácia de uma nova imunoterapia utilizando IFN-beta e a via p53/Arf em combinação para melanoma.

Figura 2.3 - 9-(4-¹⁸F-fluor-3-[hidroximetil]butil)guanine ou [¹⁸F]FHBG. É uma “sonda repórter” para o gene HSV1-tk, o qual é transfectado para células malignas numa terapia gênica.

Fonte:(Vallabhajosula, 2009).

2.4 [¹⁸F] FHBG do início às aplicações atuais

Os análogos de purina nucleosídeos radiomarcados para a imagem de expressão do gene HSV1-tk, incluem principalmente análogos de acicloguanosinas e apenas um composto com açúcar cíclico. Entre estes análogos, aciclovir, ganciclovir e penciclovir foram previamente desenvolvidos como agentes antivirais para o vírus do *Herpes simplex*. Com base na propriedade antiviral destes compostos, os análogos fluorados, bem como as suas versões radiomarcadas, foram desenvolvidos para imageamento da expressão do gene HSV1-tk por PET (Alauddin and Gelovani, 2008). O primeiro composto sintetizado deste grupo foi um análogo do ganciclovir, o FHPG e seu análogo radiomarcado o ¹⁸F- FHPG, foi reportado pela primeira vez por Alauddin et al (Alauddin *et al.*, 1996). Após a síntese de ¹⁸F-FHPG, o análogo de penciclovir 9- [4-¹⁸F-fluoro-3-hidroximetil-butil) guanina (¹⁸F-FHBG) também foi relatado pela primeira vez por Alauddin et al (Alauddin and Conti, 1998). Os compostos precursores (tosilatos) foram preparados a partir dos respectivos análogos nucleosídeos, ganciclovir e penciclovir, respectivamente, medicamentos de prateleira (Alauddin and Gelovani, 2008). A atividade específica para estes compostos foi estimada ser >2 Ci/μmol ao final da síntese automatizada.

Trabalhos preliminares demonstraram que o fluoro-análogo do penciclovir, FHBG, é obtido na forma fosforilada por HSV1-TK, com maior acumulação em células transduzidas em comparação com o fluoro-análogo do ganciclovir (Alauddin and Conti, 1998; Alauddin *et al.*, 1999). Devido à melhor eficácia do ¹⁸F-FHBG, a atenção voltou-se para este composto, e a radiosíntese do ¹⁸F-FHBG foi repetida por muitos outros grupos com pequenas modificações, incluindo um método simplificado de reação em um único frasco (Shiue *et al.*, 2001), o emprego de técnicas de purificação por dupla sep-pack, em lugar da purificação por HPLC (Wang *et al.*, 2003), síntese totalmente automatizada em um único frasco de reação (Peñuelas *et al.*, 2004), método rápido e reprodutível (Ponde *et al.*, 2004) e síntese robótica (Chang *et al.*, 2007). Todos esses métodos envolvem algumas modificações técnicas de uma maneira ou de outra; no entanto, nenhum desses métodos demonstrou uma melhoria significativa nos

rendimentos radioquímicos ou melhor qualidade do ^{18}F - FHBG obtido (Alauddin and Gelovani, 2008).

Em 2001, a segurança, farmacocinética e dosimetria do ^{18}F FHBG foram estudadas em cobaias como ratos, coelhos e também em voluntários humanos saudáveis, e a agência Food and Drug Administration (EUA) aprovou seu uso como novo medicamento de investigação em ensaios clínicos (IND nº 61880) (Yaghoubi *et al.*, 2001; Yaghoubi *et al.*, 2006). Doravante, a detecção não invasiva da expressão de HSV1-tk ou HSV1-sr39tk (versão mutante) com ^{18}F FHBG em terapia gênica em ensaios pré-clínicos e clínicos pode ser útil na otimização dessas estratégias terapêuticas e talvez evite eventos adversos futuramente. Originalmente estes genes “repórter” (HSV1-tk ou HSV1-sr39tk) foram projetados como genes suicidas na terapia do câncer, de modo que HSV1-tk seria entregue às células de câncer, e depois a administração de uma dose farmacológica de ganciclovir causaria a morte das células com expressão de HSV1-tk ou HSV1-sr39tk. No caso do ^{18}F FHBG, o mesmo vem sendo empregado para o monitoramento direto desses genes suicidas em ensaios pré-clínicos e clínicos (Yaghoubi *et al.*, 2006).

Como exemplo de empregabilidade em estudo clínico, o imageamento com ^{18}F FHBG e HSV1-tk adenoviralmente introduzido em tumores de pacientes com câncer hepatocelular foi recentemente demonstrado (Peñuelas, Mazzolini, *et al.*, 2005). Outro exemplo de emprego deste radiofármaco em estudo clínico foi na detecção não invasiva de células T citolíticas terapêuticas com ^{18}F FHBG por tomografia por emissão de pósitrons em um paciente com glioma, no qual resumidamente, um paciente diagnosticado com glioblastoma grau III / IV multiforme inscreveu-se em um teste de imunoterapia celular experimental e o ^{18}F FHBG, que normalmente não pode atravessar a barreira hematoencefálica, pôde se acumular dentro dos tumores de glioma e foi capaz de detectar HSV1-tk expressado em células terapêuticas dentro desses tumores. As células terapêuticas deste estudo foram geneticamente modificadas para expressar o gene da zetakina de interleucina-13 (gene terapêutico, codificando uma proteína receptora que alveja as células T às células tumorais) e o Herpes Simplex Gene de suicídio do vírus 1 timidina quinase (HSV1-tk) / gene repórter de tomografia por emissão de positrons (PET) (Yaghoubi *et al.*, 2009).

Um exemplo da utilidade do [^{18}F] FHBG em estudo pré-clínico foi o realizado por Martinez-Quintanilha *et al.*, em 2013, no qual a eficácia terapêutica e destino das células estaminais modificadas por via bimodal em tumores cerebrais malignos foi demonstrada em camundongos com imagens PET clinicamente relevantes e forneceram um mecanismo para eventualmente eliminar as células após a terapia do tumor. Este estudo tem implicações diretas na modificação de terapias baseadas em células-tronco em pacientes com câncer (Martinez-Quintanilla *et al.*, 2013). Outro exemplo de estudo pré-clínico com o [^{18}F] FHBG, foi o realizado por Kuruppu *et al.*, em 2014, no qual, a imagem por PET com [^{18}F] FHBG foi utilizada para identificar ciclos de replicação de vírus e para medições em tempo real dos níveis de vírus replicantes intratumorais. Esta abordagem de imagem não-invasiva mostra a potencial utilidade de monitorar a terapia por “*oncolise*” viral em pacientes (Kuruppu *et al.*, 2014).

2.5 Referências bibliográficas

ALAUDDIN, M. M.; CONTI, P. S. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG): a new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET. **Nucl Med Biol**, v. 25, n. 3, p. 175-80, Apr 1998. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620620> >.

ALAUDDIN, M. M. et al. 9-[(3-[18F]-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([18F]-FHPG): a potential imaging agent of viral infection and gene therapy using PET. **Nucl Med Biol**, v. 23, n. 6, p. 787-92, Aug 1996. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940722> >.

ALAUDDIN, M. M.; GELOVANI, J. G. Novel Reporter Probes for HSV1-tk Gene Expression. In: INFORMA HEALTHCARE USA, I. (Ed.). **Molecular Imaging in Oncology**. New York, 2008. chap. 26, p.405-428.

ALAUDDIN, M. M. et al. Evaluation of 9-[(3-18F-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([18F]-FHPG) in vitro and in vivo as a probe for PET imaging of gene incorporation and expression in tumors. **Nucl Med Biol**, v. 26, n. 4, p. 371-6, May 1999. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10382839> >.

APALLA, Z. et al. Epidemiological trends in skin cancer. **Dermatol Pract Concept**, v. 7, n. 2, p. 1-6, Apr 2017. ISSN 2160-9381. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28515985> >.

BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatol Res Pract**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-6113. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936153> >.

CHANG, C. W. et al. A high yield robotic synthesis of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG) and 9-[3-[18F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine([18F] FHPG) for gene expression imaging. **Appl Radiat Isot**, v. 65, n. 1, p. 57-63, Jan 2007. ISSN 0969-8043. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16916606> >.

COTRAN, R. **Fundamentos de Patologia** 2000.

EGGERMONT, A. M. et al. Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1189-96, Oct 2005. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198768> >.

_____. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. **Lancet**, v. 372, n. 9633, p. 117-26, Jul 2008. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620949> >.

EL-ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **J Control Release**, v. 94, n. 1, p. 1-14, Jan 2004. ISSN 0168-3659. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14684267> >.

GARBE, C. et al. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **Oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5-24, 2011. ISSN 1549-490X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212434> >.

HALL, H. I. et al. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. **J Am Acad Dermatol**, v. 40, n. 1, p. 35-42, Jan 1999. ISSN 0190-9622. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922010> >.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, v. 363, n. 8, p. 711-23, Aug 2010. ISSN 1533-4406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525992> >.

[HTTP://WWW.IARC.FR/](http://www.iarc.fr/). Iarc

International Agency For Research On Cancer. World Health Organization 2010.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil.**, Rio de Janeiro, 2016. Accessed on: 20.08.2017.

KATSAMBAS, A.; NICOLAIDOU, E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. **Arch Dermatol**, v. 132, n. 4, p. 444-50, Apr 1996. ISSN 0003-987X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8629849> >.

KAY, M. A.; GLORIOSO, J. C.; NALDINI, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nat Med**, v. 7, n. 1, p. 33-40, Jan 2001. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135613> >.

KELLY, J. W. Melanoma in the elderly--a neglected public health challenge. **Med J Aust**, v. 169, n. 8, p. 403-4, Oct 1998. ISSN 0025-729X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830382> >.

KIRKWOOD, J. M. et al. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 1, p. 7-17, Jan 1996. ISSN 0732-183X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558223> >.

KURUPPU, D. et al. Molecular imaging with bioluminescence and PET reveals viral oncolysis kinetics and tumor viability. **Cancer Res**, v. 74, n. 15, p. 4111-21,

Aug 2014. ISSN 1538-7445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876106> >.

MACLENNAN, R. et al. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. **J Natl Cancer Inst**, v. 84, n. 18, p. 1427-32, Sep 1992. ISSN 0027-8874. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1512795> >.

MARTINEZ-QUINTANILLA, J. et al. Therapeutic efficacy and fate of bimodal engineered stem cells in malignant brain tumors. **Stem Cells**, v. 31, n. 8, p. 1706-14, Aug 2013. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389839> >.

MCKIBBIN, T. Melanoma: understanding relevant molecular pathways as well as available and emerging therapies. **Am J Manag Care**, v. 21, n. 10 Suppl, p. S224-33, Sep 2015. ISSN 1936-2692. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26619296> >.

PEHAMBERGER, H. et al. Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 4, p. 1425-9, Apr 1998. ISSN 0732-183X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9552047> >.

PEÑUELAS, I. et al. Positron emission tomography and gene therapy: basic concepts and experimental approaches for in vivo gene expression imaging. **Mol Imaging Biol**, v. 6, n. 4, p. 225-38, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 1536-1632. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262238> >.

_____. Gene therapy imaging in patients for oncological applications. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 32 Suppl 2, p. S384-403, Dec 2005. ISSN 1619-7070. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16180032> >.

_____. Positron emission tomography imaging of adenoviral-mediated transgene expression in liver cancer patients. **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p. 1787-95, Jun 2005. ISSN 0016-5085. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15940613> >.

PHAN, G. Q. et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8372-7, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826605> >.

PIMLOTT, S. L.; SUTHERLAND, A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. **Chem Soc Rev**, v. 40, n. 1, p. 149-62, Jan 2011. ISSN 1460-4744. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818455> >.

PONDE, D. E. et al. Rapid and reproducible radiosynthesis of [18F] FHBG. **Nucl Med Biol**, v. 31, n. 1, p. 133-8, Jan 2004. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741578> >.

RADOVIĆ-KOVACEVIĆ, V. et al. [Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma]. **Srp Arh Celok Lek**, v. 125, n. 5-6, p. 132-7, 1997 May-Jun 1997. ISSN 0370-8179. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9265233> >.

SAHA; GOPAL; B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. Fourth edition 1998.

SCHADENDORF, D. et al. Advances and perspectives in immunotherapy of melanoma. **Ann Oncol**, v. 23 Suppl 10, p. x104-8, Sep 2012. ISSN 1569-8041. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987943> >.

SERGANOVA, I.; PONOMAREV, V.; BLASBERG, R. Human reporter genes: potential use in clinical studies. **Nucl Med Biol**, v. 34, n. 7, p. 791-807, Oct 2007. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17921031> >.

SHIUE, G. G. et al. A simplified one-pot synthesis of 9-[(3-[¹⁸F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([¹⁸F]FHPG) and 9-(4-[¹⁸F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([¹⁸F]FHBG) for gene therapy. **Nucl Med Biol**, v. 28, n. 7, p. 875-83, Oct 2001. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578910> >.

SOGHOMONYAN, S. et al. Molecular PET imaging of HSV1-tk reporter gene expression using [¹⁸F]FEAU. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 416-23, 2007. ISSN 1750-2799. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406603> >.

STRAUSS, B. E.; COSTANZI-STRAUSS, E. Gene Therapy for Melanoma: Progress and Perspectives. In: (Ed.). **Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**: INTECH chap. 12, p.283-317, 2013.

TG; TERAPIAGENICA.NET.BR. Laboratório de Vetores Virais Centro de Investigação Translacional em Oncologia Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. **Recursos Educacionais: Estratégias de terapia gênica voltadas para o câncer.**, São Paulo, 2011. Available at: < em: <http://www.terapiagenica.net.br/> >. Accessed on: 15.01.2015.

UONG, A.; ZON, L. I. Melanocytes in development and cancer. **J Cell Physiol**, v. 222, n. 1, p. 38-41, Jan 2010. ISSN 1097-4652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795394> >.

VALLABHAJOSULA, S. **Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT**. Berlin: 2009.

VAN DER RHEE, H. J. et al. Increase in and stabilization of incidence and mortality of primary cutaneous malignant melanoma in Western Netherlands, 1980-95. **Br J Dermatol**, v. 140, n. 3, p. 463-7, Mar 1999. ISSN 0007-0963. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233267> >.

VAZQUEZ, V. E. L. et al. Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 4, Jan 2015. ISSN 1756-0500. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592837> >.

WANG, J. Q. et al. Novel radiosynthesis of PET HSV-tk gene reporter probes [18F]FHPG and [18F]FHBG employing dual Sep-Pak SPE techniques. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, n. 22, p. 3933-8, Nov 2003. ISSN 0960-894X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592478> >.

WOLCHOK, J. D. et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 2, p. 155-64, Feb 2010. ISSN 1474-5488. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004617> >.

YAGHOUBI, S. et al. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [(18)F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. **J Nucl Med**, v. 42, n. 8, p. 1225-34, Aug 2001. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483684> >.

YAGHOUBI, S. S. et al. Preclinical safety evaluation of 18F-FHBG: a PET reporter probe for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk's expression. **J Nucl Med**, v. 47, n. 4, p. 706-15, Apr 2006. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595506> >.

_____. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with 18F-FHBG PET in a patient with glioma. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 6, n. 1, p. 53-8, Jan 2009. ISSN 1743-4262. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015650> >.

CAPÍTULO 3

Síntese e Controle de Qualidade do [^{18}F] FHBG

3.1 Objetivo específico

Sintetizar o radiofármaco [^{18}F]-FHBG com elevada pureza química e radioquímica de forma eficiente e reprodutível.

3.2 Revisão bibliográfica específica

Diversas rotas sintéticas de preparação de radiofármacos contendo emissores de pósitrons (β^+) têm sido desenvolvidas para o diagnóstico de condições patológicas pela tomografia por emissão de pósitrons (PET). A maioria destas rotas utiliza o flúor-18 por apresentar as propriedades físicas e nucleares mais favoráveis para a imagem PET. O flúor-18 tem um 97% de decaimento β^+ , uma baixa energia máxima do pósitron emitido (635 keV) e uma meia-vida relativamente curta de 109,7 min (JACOBSON et al. 2014). Dentro dos radiofármacos de ^{18}F utilizados na clínica até a data, o [^{18}F]-2-desoxi-2-flúor-D-glicose ([^{18}F]-FDG) tem sido o candidato mais utilizado para os estudos de metabolismo do tumor. No entanto, outros radiofármacos de ^{18}F têm sido desenvolvidos com base em outras características distintivas da célula tumoral, pois nem todos os tumores caracterizam-se pela captação aumentada de glucose. Por exemplo, o radiofármaco [^{18}F]-FHBG tem sido utilizado para monitorar a expressão do gene timidina quinase do vírus do herpes simples tipo 1 (do inglês, HSV1-tk) em pacientes com

carcinoma hepatocelular (Peñuelas et al, 2005). Este radiofármaco foi sintetizado utilizando uma reação de substituição nucleofílica tipo 2 (SN_2).

De forma geral, a síntese dos radiofármacos de ^{18}F por substituição nucleofílica envolve vários passos depois da produção do radionuclídeo num ciclotron. Estes passos são a concentração da solução de $[^{18}F]$ -fluoreto, sua secagem, a reação de marcação em meio anidro, a purificação e controle de qualidade. As reações de marcação podem ser a substituição direta do grupo abandonador na molécula desejada pelo $[^{18}F]$ -fluoreto, ou a preparação de um intermediário $[^{18}F]$ -fluorado reativo por substituição nucleofílica, seguido por uma segunda reação como uma alquilação (Elsinga *et al.*, 2002). Cada rota pode seguir com a remoção dos grupos protetores em meio básico ou ácido (Grierson and Shields, 2000; Alauddin, 2012). Os passos de purificação podem ocorrer durante ou após a preparação incluindo técnicas de extração em fase sólida ou cromatografia líquida de alta resolução (do inglês, HPLC) (Elsinga, 2002). Dentro dos parâmetros de controle de qualidade encontra-se, análise de identidade química do radiofármaco, determinação da pureza química e radioquímica, cálculo da atividade específica e medição do pH na formulação final.

3.2.1 PRODUÇÃO DE FLUORETO $[^{18}F]$

O ciclotron é um acelerador de partículas nucleares subatômicas capaz de irradiar materiais com feixe de prótons com intensidades de corrente de até 100 μA . O equipamento possui varias saídas de feixe acoplados os respectivos porta-alvos (dispositivos nos quais é confinado o material a ser irradiado), no caso, podem ser irradiados dois porta-alvos simultaneamente (Saha et al., 1998). A irradiação de água enriquecida em ^{18}O (alvo) através da reação nuclear (p, n), é a maneira mais eficaz e conveniente para produzir $[^{18}F]$ -fluoreto em grandes quantidades (35-70 GBq) (Guillaume M et al., 1991).

3.2.3 SECAGEM DO FLUORETO $[^{18}F]$

Após a irradiação, o $[^{18}F]$ -fluoreto é separado da água para obtenção do fluoreto reativo em um ambiente anidro e para recuperação da água enriquecida, pois é um material de alto custo (Elsinga, 2002). Os ânions de flúor são retidos em resinas de troca de ânions como as resinas de amônio quaternárias (QMA). Os cartuchos comerciáveis com resinas QMA retêm maior dos 95% do flúor quando condicionados com íons CO_3^{2-} , enquanto a água enriquecida é coletada como rejeito (Elsinga, 2002). O fluoreto é

eluído do cartucho com uma solução contendo K_2CO_3 e um catalisador de transferência de fase como o Kripofix 222 para favorecer a solubilidade do $K^{18}F$ no solvente orgânico adequado para a reação SN_2 (Elsinga, 2002). O $[^{18}F]$ -fluoreto torna-se reativo apenas em meios anidros, pois pequenas quantidades de água podem gerar solvatação do ânion (Elsinga, 2002). Portanto, após a eluição do cartucho QMA, a água residual na solução resultante evapora-se por destilações azeotrópicas sucessivas com acetonitrila anidra.

3.2.4 REAÇÃO DE MARCAÇÃO COM FLÚOR-18 POR SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA TIPO 2

A reação de marcação por substituição nucleofílica tipo 2 ocorre uma vez que o flúor $[^{18}F]$ está em meio totalmente anidro. De forma geral, e também no caso da síntese do $[^{18}F]$ -FHBG, as condições de reação de marcação envolvem temperaturas entre 80-160 °C, tempos de reação variando de 5 a 30 minutos, e solvente polar aprótico como acetonitrila e dimetilsulfóxido (DMSO) (Elsinga et al. 2002, Yaghoubi et al. 2001, Kang et al. 2009, Mešćić et al. 2013).

Acetonitrila é o solvente comumente utilizado, porém outras possibilidades são DMSO e dimetilformamida (DMF) (Elsinga, 2002). A acetonitrila tem a vantagem de poder ser facilmente removida por evaporação, o que não acontece com DMSO e DMF (Elsinga, 2002). A remoção do solvente é importante em muitos métodos de produção, pois a presença do mesmo dificulta a purificação por HPLC (Elsinga, 2002). Por outro lado, os solventes DMSO e DMF têm a vantagem de exercer pressão mais baixa em recipientes de reação fechados durante o aquecimento e, portanto, reduz problemas como vazamentos ou perdas do solvente e consequentemente da reação (Elsinga, 2002). Pode-se utilizar aquecimento convencional ou aquecimento por forno micro-ondas (Stone-Elander et al., 2007). A opção por sínteses mais rápidas e reações mais curtas aumenta os rendimentos radioquímicos (Shiue et al., 2001; Ponde et al., 2004).

Para a substituição direta do grupo abandonador pelo $[^{18}F]$ -fluoreto, a molécula precursora deve conter um grupo abandonador na posição onde a entrada do radioisótopo ^{18}F é desejada (Elsinga, 2002). Existem vários grupos abandonadores os quais podem ser utilizados como triflatos, tosilatos, mesilatos e nosilatos (Elsinga, 2002). A escolha por um grupo abandonador particular é determinada pela sua reatividade, estabilidade e facilidade de incorporação em um determinado precursor (Elsinga, 2002).

3.2.5 PUREZA RADIOQUÍMICA

A pureza radioquímica é um dos parâmetros mais importantes do controle de qualidade dos radiofármacos. É definida como a percentagem do total da radioatividade que se encontra na forma radioquímica desejada. As impurezas radioquímicas resultam da decomposição devido à ação do solvente, mudança de temperatura ou pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores, radiólise. A presença de impurezas radioquímicas em um radiofármaco resulta em imagens de baixa qualidade devido a atividade de fundo no entorno de tecidos e sangue, dificultando a interpretação nos estudos *in vivo* (Gopal et al., 1998). A estabilidade de um composto é dependente do tempo de exposição à luz, mudança de temperatura e radiólise. Quanto mais um composto estiver exposto a essas condições, tenderá à degradação. Muitas preparações são armazenadas protegidas da exposição à luz e sob refrigeração para diminuir a degradação do material. O HPLC é o método mais eficiente na análise de amostras de radiofármacos, pois proporciona separação de componentes com alta resolução. Alta resolução, velocidade de separação e alta recuperação de solutos são as vantagens importantes do HPLC (Gopal et al., 1998).

3.2.5 ATIVIDADE ESPECIFICA

Por outro lado, a atividade específica é definida como a quantidade de radioatividade por unidade de massa de um composto, expressa em Gigabecquerels por micromole (GBq/μmol). É geralmente calculada a partir da análise por HPLC do radiofármaco e do seu composto padrão. Várias amostras do padrão com diferentes concentrações são analisadas por HPLC, e a área registrada em função da concentração injetada utiliza-se para construir uma curva de calibração. Com a curva de calibração determina-se a quantidade de massa fria contida no radiofármaco, após correlacionar a área do sinal no UV obtida da análise por HPLC do composto marcado. Atividade específica calcula-se como a divisão de atividade injetada (GBq) pela quantidade de massa fria (μmol).

A seguir descrevemos a infraestrutura, materiais, métodos, resultados, discussões e conclusões referentes à síntese e controle de qualidade do radiofármaco [¹⁸F]-FHBG, obtido no Centro de Radiofarmácia do IPEN para avaliação biológica.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 INFRAESTRUTURA E PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA

As soluções de flúor-18, preparadas na Instalação de Aceleradores Cíclotron, foram devidamente transportadas para os laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia onde foram realizadas as sínteses manuais radioativas e o controle de qualidade do radiofármaco. Todas as operações com materiais radioativos foram realizadas em laboratórios apropriados, equipados com sistemas de proteção individual e coletiva (capela de exaustão, barreiras de chumbo e vidro plumbífero) (FIG. 3.1). A exposição ao material radioativo foi registrada e monitorada por dosímetros individuais. As duas instalações ficam localizadas dentro da área do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN.

Figura 3.1 - Capelas com exaustão, barreiras de chumbo e vidro plumbífero para manipulação de substâncias radioativas, laboratórios de Pesquisa do Centro de Radiofarmácia, IPEN.

Fonte: autora da dissertação

3.3.2 MATERIAIS

O flúor-18 foi cedido pela Instalação de Aceleradores Cíclotrondo IPEN. O composto padrão *FHBG authentic* e o precursor *Tosyl-FHBG* foram adquiridos da empresa FutureChem (Seul, Coréia do Sul). K_2CO_3 , Kryptofix, DMSO anidro e acetonitrila anidra foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Brasil. Os cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak de troca aniônica (Light, Accell Plus QMA) e de sílica-gel derivatizada com C18 (Plus C18) foram obtidos da Waters (Brasil). A TAB. 3.1 resume os principais reagentes e soluções utilizados com suas respectivas funções.

Tabela 3.1 - Soluções e reagentes utilizados na síntese manual do radiofármaco [^{18}F] FHBG.

Reagente	Função
FHBG authentic	Padrão de referência
Tosyl-FHBG	Precursor do [^{18}F]FHBG
Kryptofix, ACN, K_2CO_3 , Água ultrapura	Solução eluente de [^{18}F]-fluoreto
Acetonitrila anidra	Destilação azeotrópica (secagem do [^{18}F]-fluoreto)
DMSO anidro	Solvente da reação de marcação
Ácido Clorídrico 1M	Desprotetor
Hidróxido de sódio 1M	Neutralizador do produto final
PBS e Etanol (92;8, v/v)	Fase móvel de purificação
Água ultrapura + 0,1% TFA	Fase móvel analítica
Etanol grau HPLC	Fase móvel de purificação
Dihidrogenofosfato de sódio	Fase móvel de purificação
Hidrogenofosfatodissódico	Fase móvel de purificação

Os principais equipamentos e materiais utilizados com suas respectivas funções nos experimentos foram listados na TAB. 3.2. Um calibrador de atividade CRMTM-35R (Capintec, EUA) foi utilizado para medição da atividade de ^{18}F (FIG. 3.2). As análises de controle de qualidade e purificação do [^{18}F] FHBG foram realizadas em Cromatógrafos líquidos de alta eficiência (FIGURAS 3.3 e 3.4) 1260 Infinity HPLC system, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA; sendo um com detector de arranjo de diodo e um com detector VL de múltiplo comprimento de onda, e ambos equipados com detectores de cintilação, marca Raytest. As colunas utilizadas para controle de qualidade (ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical 4,6 x 250 mm, 5 μm) e purificação (ZORBAX ODS 9,8 mm x 250 mm, 5 μm) foram adquiridas da Agilent Technologies Brasil. A preparação do radiofármaco foi realizada com o auxílio de um bloco de alumínio para aquecimento durante as etapas de reação, localizado no interior de capela blindada (FIG 3.5).

Tabela 3.2 - Materiais utilizados na síntese manual do radiofármaco [^{18}F] FHBG.

Material	Função
Cartucho <i>LightQMA Sep-Pak</i> ®	Concentração dos íons $^{18}\text{F}^-$
Cartucho <i>Sep-Pak</i> ® C18	Purificação do intermediário de [^{18}F]-FHBG
Bloco de alumínio	Aquecimento
Frascos de fundo cônico Wheaton	Reação de marcação
Filtro MILLEX®- GV 0.22µm	Filtração para injeção no HPLC
HPLC analítico e semi-preparativo	Análise e purificação de amostras
Calibrador de atividade CRMTM-35R	Medições de atividade de ^{18}F
Coluna de fase reversa ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical 4,6 x 250 mm, 5 µm) (Agilent Technologies Brasil).	Análise por HPLC
Coluna semi-preparativa (ZORBAX ODS 9,8 mm x 250 mm, 5 µm) (Agilent Technologies Brasil).	Purificação por HPLC
Viais e inserts Agilent Technologies	Amostras para análises por HPLC

Figura 3.2 – Calibrador de dose Capintec utilizado para medição da atividade de ^{18}F .

Fonte: autora da dissertação

Figura 3.3 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico utilizado no controle de qualidade do radiofármaco.

Fonte: autora da dissertação

Figura 3.4 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência para purificação do radiofármaco.

Fonte: autora da dissertação

Figura 3.5 - Bloco de alumínio localizado em interior de capela, utilizado para aquecimento durante as reações de marcação e desproteção, e concentração da solução final do radiofármaco.

Fonte: autora da dissertação.

3.3.3 MÉTODOS

3.3.3.1 PRÉ-CONDICIONAMENTO DOS CARTUCHOS SEP-PAK LIGHT QMA E PLUS C18

Os cartuchos QMA foram pré-condicionados com 10 mL de carbonato de potássio 0,5 M, seguido de 20 mL de água ultrapura e secados com ar. Os cartuchos de fase reversa Plus C18 foram pré-condicionados com 5mL de metanol e 10mL de água ultrapura.

3.3.3.2 PRODUÇÃO DO ^{18}F -

O flúor-18, obtido na forma de fluoreto-18 em solução aquosa, foi produzido em cíclotrons de 18 MeV ou de 30 MeV, ambos fabricados pela IBA (*Ion Beam Applications - Bélgica*), e localizados na Instalação de Aceleradores Cíclotrons do IPEN. O fluoreto-18 foi produzido através da reação nuclear $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$, utilizando água enriquecida em oxigênio-18 (^{18}O) como alvo.

3.3.3.3 CONCENTRAÇÃO E SECAGEM DO ^{18}F -FLUORETO

A solução de ^{18}F (5,55 - 22,94 GBq = 150 - 620 mCi / 1,5 mL) foi passada por uma cartucho de troca aniônica QMA pré-condicionado. O ^{18}F -fluoreto retido foi eluído com 0,6 mL de uma mistura contendo: 11,0 mg (29,22 μmol) de Kryptofix 2.2.2 em 0,3 mL de acetonitrila e 2,2 mg (15,92 μmol) de K_2CO_3 em 0,3 mL de água ultrapura (Kang et al., 2009). A seguir, a solução resultante foi nitrogenada e aquecida a 100 °C. Para facilitar a remoção total da água residual, a solução foi submetida a três ciclos de destilação azeotrópica com acetonitrila anidra (0.5 mL) a 100 °C.

3.3.3.4 SÍNTESE DO ^{18}F -FHBG

A síntese manual do ^{18}F -FHBG foi realizada de acordo com as metodologias descritas por (Kang et al., 2009), com algumas modificações. A síntese foi realizada variando temperatura de marcação (130 e 160 °C), a quantidade do precursor (2 – 4 mg), a atividade de ^{18}F (1,85 – 9,25 GBq / 50 – 250 mCi) e o método de aquecimento (convencional ou forno micro-ondas). As condições da reação de desproteção: temperatura (80-160 °C), tempo (1 – 10 min) e volume de HCl 1 M (0,2 – 0,6 ml), foram

avaliadas com base na matriz experimental de um desenho central composto rotacional. O protocolo que gerou o melhor resultado descreve-se a continuação.

Após a etapa de secagem, uma solução do precursor tosil-FHBG com 2,6 mg (2,73 μmol) em 500 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado ao frasco contendo o [^{18}F]-fluoreto (4,23GBq/ 114,4 mCi). A mistura foi aquecida por 20 minutos a 160 °C sob agitação. Após resfriamento, a mistura reacional foi diluída com 8 mL de água ultrapura e passada através de um cartucho Plus C18. Para remoção do ^{18}F -fluoreto livre, o cartucho C18 foi lavado com 16 mL de água ultrapura, e o produto foi eluído com 2 mL de metanol. Na sequência, o intermediário do [^{18}F]-FHBG foi desprotegido pela adição de HCl 1M (0.4 mL) à 103°C por 10 min e sob atmosfera de nitrogênio. Aguardou-se 3 min para resfriamento do frasco e a seguir, foi acrescentado 0,4 mL de NaOH 1M para neutralização da solução. O produto bruto foi purificado por HPLC com as condições: coluna semi-preparativa C-18 (ZORBAX ODS 9,8 mm x 250 mm, 5 μm), fase móvel isocrática composta por tampão PBS (2,76 g de dihidrogenofosfato de sódio monohidratado mais 0,14 g de hidrogenofosfatodissódico em 1 L de água ultrapura): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: = 92:8, 4 mL / min, 30 min (Kang et al, 2009). O [^{18}F]-FHBG purificado encontrou-se em solução adequada para os ensaios biológicos. Dessa forma, não foi necessário concentrar a amostra, reduzindo o tempo total de síntese.

3.3.3.5 CONTROLE DE QUALIDADE

As análises para confirmar a identidade química do radiofármaco, determinar a pureza química e radioquímica da formulação final, e calcular a atividade específica foram realizadas em equipamento HPLC. As condições de análise foram: coluna analítica ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 x 250 mm, 5 μm - Agilent Technologies; gradiente 0 – 30 % de acetonitrila em água (0,1% TFA), 1 mL / min, 30 min, 254 nm. A identidade química foi confirmada por co-injeção do radiofármaco com seu padrão. A pureza química e radioquímica foram determinadas pelo cromatograma UV (245 nm) e radiocromatograma, respectivamente, resultantes da análise de uma alíquota da formulação final. Baseado nesta mesma análise, a atividade específica foi calculada a partir da atividade injetada no equipamento HPLC e o número de moles correspondente à massa fria no radiofármaco obtidos com a curva de calibração. A curva de calibração correlaciona os números de moles com a área do sinal correspondente no cromatograma UV (254 nm).

A avaliação do pH foi realizada utilizando papel de pH, uma vez que um valor de pH aproximado é aceitável (Hung, 2004). De acordo com a literatura o pH ideal de um radiofármaco deve ser de 7,4 (pH do sangue), embora possa variar entre 2 e 9 devido à alta capacidade de tamponamento do sangue (Gopal et al., 1998).

3.3.3.6 ANÁLISE ETATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada por intermédio do programa GraphPad Prism 5.0® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3.4 Resultados e discussão

Nesta parte do trabalho, apresentamos todos os resultados obtidos passo a passo, em cada etapa do processo, desde a secagem do fluoreto [^{18}F], radiossíntese, purificação do [^{18}F]-FHBG e as análises de controle de qualidade efetuadas. Os resultados do produto formulado que obtivemos, foram comparados com dados da literatura em cada etapa.

3.4.1 SÍNTESE RADIOQUÍMICA DO [^{18}F] FHBG

A figura 3.6 representa a rota sintética de dois passos para obter o ^{18}F -FHBG.

Figura 3.6 – Rota sintética para preparar o [^{18}F]-FHBG. (1) precursor tosil-FHBG, (2) composto fluoro-intermediário e (3) [^{18}F] FHBG.

O primeiro passo padronizado foi a [^{18}F]-radiofluoração do precursor N2-(p-Anisyl)diphenylmethyl)-9-[(4-(p-toluenesulfonyl-oxy))-3-p-anisyl)diphenyl methoxymethylbutyl] guanine (1) para obtenção do composto fluoro-intermediário (2). A formação do composto fluoro-intermediário (2) ocorreu apenas com as condições de reação: aquecimento convencional a 160°C por 20 min utilizando DMSO como solvente. Para analisar o rendimento de incorporação do [^{18}F]-fluoreto no precursor tosionato nesta etapa, comparar com dados da literatura e confirmar a obtenção do composto fluoro intermediário (2), foram injetadas alíquota do precursor frio (1) e alíquota da mistura reacional ao final do preparo do composto fluoro-intermediário (2). Sob as mesmas condições de análise, determinou-se o tempo de retenção do precursor frio (1), verificou-se sua integridade e comparou-se com o tempo de retenção do composto fluoro-intermediário quente (2). O tempo de retenção do precursor (1) foi de 22 minutos (FIG 3.7A), enquanto que o tempo de retenção do composto fluoro- intermediário (2) foi de 25 min com 77% de incorporação do íon fluoreto ao precursor (FIG 3.7B).

Figura 3.7– Perfil de análise por HPLC da mistura reacional com as condições: Coluna Analítica C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μm , 100 Å., fase móvel: solvente A: água (0,1%TFA) e B Acetonitrila, gradiente 20% de A por 20 min. e 100% de B até 30 min, fluxo 1 mL/min.

A- Cromatograma UV correspondente ao precursor, tempo de retenção 22 min. **B-** Radiocromatograma correspondente ao intermediário (2, 77 %), tempo de retenção 25 min.

Fonte: autora da dissertação.

Ótimos rendimentos de incorporação do [^{18}F]-fluoreto foram obtidos na maior parte das vezes em que incubou-se 2,6 mg do precursor em 500 μL de DMSO a 160°C por 20 min, com atividade do ^{18}F seco acima de 4,2 GBq/114,4 mCi (TAB. 3.3).

Na maioria das sínteses em que trabalhamos com atividades do $^{18}\text{F}^{-}$ seco menores que 3,7GBq/100mCi, obtivemos o composto fluoro intermediário (2) com rendimento de incorporação < 20%, (TAB. 3.3). Os baixos rendimentos de incorporação do $^{18}\text{F}^{-}$ e rendimento radioquímico total também são reportados na literatura por (Ponde *et al.*, 2004), o qual, relatou obter 4-5 % de incorporação ao utilizar aquecimento convencional, e um aumento para 30-40 % ao substituir o aquecimento convencional por micro-ondas. Os baixos rendimentos de incorporação do ^{18}F são atribuídos ao fato do tosil- FHBG, apresentar grupos muito volumosos na sua estrutura (a) e (b), o que dificulta a substituição do grupo OTs pelo $^{18}\text{F}^{-}$.

Como tentativa para aumentar o rendimento de formação do composto fluoro-intermediário, foi providenciado um micro-ondas doméstico para substituir o aquecimento convencional, conforme descrito por (Ponde *et al.*, 2004). No entanto, não houve sucesso na obtenção do produto desejado, com o equipamento adquirido, pois a temperatura de reação no micro-ondas atingiu o máximo 120°C e com essa temperatura não houve reação com o $^{18}\text{F}^{-}$. Outros autores (Wang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009), também reportam baixo rendimento radioquímico ao final da síntese e purificação do [^{18}F]-FHBG.

Tabela 3.3 – Variação da atividade de ^{18}F - durante a reação e o rendimento de incorporação do ^{18}F - no precursor para formação do composto fluoro-intermediário.

No. Exp.	A (^{18}F) na reação (mCi / GBq)	Rendimento Incorporação ^{18}F (%)	Pureza Radioquímica (%)	Rendimento Radioquímico (%) [*]	Média Rend. Incorporação do ^{18}F (%)
1	50,0/1,85	5,0%	> 99%	<1,0%	19,76± 0,25
2	34,5/1,28	3,9%	> 99%	<1,0%	
3	20,0/0,74	4,9%	> 99%	2,9%	
4	55,7/2,06	12,0%	> 99%	1,45%	
5	46,7/1,73	1,3%	> 90%	<1,0%	
6	152,0/5,62	18,5%	> 70%	2,34%	
7	77,3/2,86	19,0%	> 99%	1,40%	
8	31,4/1,16	8,5%	> 99%	1,64%	
9	76,1/2,82	14,0%	> 99%	3,8%	
10	114,4/4,2	76,97%	> 99%	1,12%	
11	61,0/2,3	4,5%	> 99%	1,3%	
12	43,0/1,6	5,1%	> 99%	1,5%	
13	50,0/1,85	4,1%	> 99%	<1,0%	
14	47,0/1,7	4,6%	> 99%	1,8%	
15	63,0/2,3	5,5%	> 99%	1,3%	
16	36,3/1,3	4,0%	> 99%	<1,0%	
17	218,0/8,1	51,5%	> 99%	1,8%	
18	221,0/8,2	53,1%	> 99%	1,5%	
19	199,6/7,4	78,9%	> 99%	2,92%	

*Decaimento corrigido
 Fonte: dados da pesquisa

O segundo passo padronizado, consistiu no isolamento do composto fluoro-intermediário (2), utilizando um cartucho Sep-Pak C18, e obtenção do produto de interesse, [^{18}F]-FHBG (3). O composto fluoro-intermediário (2), foi eluído com 2mL de metanol do cartucho Sep-Pak C18, seguido por desproteção dos grupos (a) e (b) com HCl 1 M a 103 ° C, sob fluxo de nitrogênio, durante 10 minutos.

Dezesseis experimentos diferentes foram realizados para avaliar o grau de desproteção em função da variação da temperatura (80-160 °C), tempo (1 – 10 min) e o volume de HCl 1 M (0,2 – 0,6 ml). A tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos da matriz experimental executada. O grau de desproteção foi obtido do perfil da análise por HPLC da mistura reacional após finalizar o tempo de desproteção. O experimento a 120 °C por 6 minutos e utilizando 0,4 mL de HCl 1 M foi repetido 3 vezes para calcular o desvio padrão experimental. O maior grau de desproteção ($75 \pm 5 \%$) foi atingido com a condição experimental: 144 °C, 6 minutos e 0,4 mL de HCl 1 M (No.Exp. 10).

A análise de variância mostrou que a variação simultânea do tempo e da temperatura tem uma influência estatisticamente significativa ($P = 0,0057 < 0,005$) e negativa sobre o grau de desproteção. Isto significa que a influência positiva do tempo vai depender do valor da temperatura, ou vice-versa. Portanto, a temperaturas altas (144 °C) durante tempos menores (6 min), ou temperaturas menores como 103 °C durante tempos maiores como 10 min, pode-se obter um grau de desproteção médio de 70% ($75 \pm 5 \%$ e $65 \pm 5\%$, respectivamente). O volume de HCl não teve influência estatisticamente significativa ($P = 0,9680 > 0,05$), mais foi fixado em 0,4 mL na síntese do [^{18}F]-FHBG em concordância com a literatura (Yaghoubi et al 2001).

Tabela 3.4- Resultados da matriz experimental executada com base em um desenho central composto rotacional para avaliar o grau de desproteção a diferentes valores de temperatura, tempo e volume de HCl 1M.

No. Exp.	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Volume de HCl 1M (mL)	Percentagem de desproteção (%)
1	80	1	0,2	0
2	160	1	0,2	18
3	80	10	0,2	44
4	160	10	0,2	0
5	80	1	0,6	2
6	160	1	0,6	14
7	80	10	0,6	44
8	160	10	0,6	0
9	96	6	0,4	49
10	144	6	0,4	75
11	120	3	0,4	42
12	120	8	0,4	73
13	120	6	0,28	62
14	120	6	0,52	68
15	120	6	0,4	60
16	120	6	0,4	69
17	120	6	0,4	68
18	103	10	0,4	65

Desvio padrão experimental: 5

Fonte: dados da pesquisa

Após desproteção e resfriamento, a mistura reacional foi neutralizada com NaOH 1M e a obtenção do [^{18}F]-FHBG, também pôde ser confirmada por HPLC analítico assim como a presença de impurezas na amostra ao fim desta etapa. No cromatograma a seguir pode-se observar além do [^{18}F]-FHBG, o produto de interesse, a presença de ^{18}F -livre que não reagiu e, parte do composto fluoro-intermediário que não terminou a desproteção (FIG 3.8).

Figura 3.8 - Análise por HPLC da obtenção do [^{18}F]-FHBG e presença de impurezas na amostra. Fase estacionária: Agilent C18, fase móvel: solvente (A) água ultrapura + 0,1%TFA e solvente (B) 100% Acetonitrila. O gradiente utilizado foi de 0 a 30% de Acetonitrila em 30 min., sob um fluxo de 1 mL/min. O pico número (1) corresponde ao ^{18}F -livre, o pico número (2) ao [^{18}F] FHBG (0,55MBq-15 μCi) e o pico número (3) ao composto intermediário que não terminou a desproteção.

Fonte: resultado obtido no Laboratório de Pesquisa do Centro de Radiofarmácia, IPEN.

A amostra bruta obtida foi purificada por HPLC, de acordo com a metodologia descrita por (Kang *et al.*, 2009), com algumas modificações. Com a finalidade de aumentar o rendimento radioquímico global, diminuir o tempo de síntese, e evitar a realização de outros passos após coleta por HPLC como aquecimento e concentração da amostra, testamos a substituição da fase móvel de purificação. Inicialmente a purificação era realizada de acordo com a metodologia descrita por (Wu and Haitao), utilizando-se uma fase móvel isocrática composta por 50 mM NH_4OAc : CH_3CN : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: 90: 8: 2. A fração coletada do produto era então concentrada por um cartucho C18 (Waters SepPak[®]) e eluída do mesmo com 2 mL de etanol para um novo frasco, o qual era aquecido brandamente, sob fluxo de gás nitrogênio até completa evaporação da solução. O produto de interesse final era reconstituído com salina para poder ser administrado intravenosamente em camundongos portadores de metástase pulmonar.

Muitas desvantagens foram observadas ao seguir a metodologia descrita como, aumento do tempo para aprontar a amostra para injetar, diminuição do rendimento radioquímico global e degradação do [^{18}F] FHBG com o processo final. Dessa forma, a fase móvel de purificação foi substituída por tampão PBS (2,76 g de dihidrogenofosfato de sódio mono-hidratado mais 0,14 g de hidrogenofosfatodissódico em 1 L de água ultrapura): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: = 92:8 e o pico radioativo com o [^{18}F]-FHBG em veículo adequado para injeção intravenosa, coletado com um tempo de retenção em torno de 9.09 min., como mostra o cromatograma (FIG. 3.9).

A obtenção do [^{18}F]-FHBG após purificação, foi confirmado por HPLC analítico, assim como a pureza radioquímica > 99% (FIG. 3.10). O rendimento radioquímico desde a incorporação do $^{18}\text{F}^-$ no precursor, até obtenção do produto final após purificação foi de 1,12%, nesta síntese (Corrigido para decaimento). O tempo de síntese foi de 80 min desde a chegada da solução com o íon $^{18}\text{F}^-$ ao laboratório de pesquisa, até obtenção do [^{18}F]-FHBG, incluindo a purificação por HPLC.

Figura 3.9 - Cromatograma do [^{18}F]-FHBG quente. O pico coletado foi o de tempo de retenção de 9.09 min. A fase móvel utilizada foi isocrática composta por tampão PBS: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: = 92:8 por 30 min monitorado por detector de radioatividade, sob fluxo de 4 mL / min.

Fonte: resultado obtido no Laboratório de Pesquisa do Centro de Radiofarmácia, IPEN.

Figura 3.10 - Cromatograma do [^{18}F]-FHBG quente, obtido após purificação por HPLC. O gradiente utilizado foi de 0 a 30% de Acetonitrila em 30 min., sob um fluxo de 1 mL/min. O pico com tempo de retenção de 11.298 min. corresponde ao [^{18}F]-FHBG (0,48MBq-13 μCi) obtido com pureza radioquímica > 99%.

Fonte: resultado obtido no Laboratório de Pesquisa do Centro de Radiofarmácia, IPEN.

Nas sínteses manuais utilizaram-se diferentes valores de atividade de ^{18}F . No frasco da reação a atividade do ^{18}F anidro, variou entre 8,2 GBq - 221 mCi e 0,74 GBq- 20mCi, para reagir em média com 2,5 mg do precursor em 500 μL de DMSO. A atividade das amostras do íon ^{18}F -Fluoreto em solução aquosa (provenientes do Cíclotron), variou entre 22,94 GBq a 5,55 GBq (620 a 150mCi). Porém, na maior parte das sínteses o cartucho QMA reteve apenas uma parte desta atividade, a qual correspondia realmente ao íon ^{18}F -Fluoreto, parte considerável da atividade equivalia a impurezas da amostra com outros radionuclídeos. (Yaghoubi *et al.*, 2001), relata que, chegam ao final da purificação, com o produto pronto para injetar em torno de 555 a 1.147 MBq (15 a 0,031mCi), começando tipicamente com 18.500 MBq (0,5Ci) ^{18}F íon fluoreto purificado. (Alauddin and Conti, 1998) relatam que obtiveram 12, 11, 33 e 18,5 mCi de ^{18}F -FHBG em quatro sínteses, iniciando as operações de purificação por HPLC com injeções de 315, 305, 550 e 200 mCi respectivamente.

Em resumo, a média do rendimento de incorporação do ^{18}F no precursor tosyl-FHBG foi de $19,76\% \pm 0,25$, enquanto que o rendimento radioquímico geral variou entre 1-4%, ($n = 19$) decaimento corrigido. O tempo de síntese total foi reduzido 210 para 80 minutos quando se substituiu a fase móvel de purificação para tampão PBS/Etanol = 92:8. O ^{18}F -FHBG obtido com pureza $> 99\%$ foi utilizado para realização de estudos *in vitro* e aquisição de imagens pulmonares em camundongos C57Bl/6 previamente infectados com o gene repórter Timidina Kinase do tipo 1 do vírus Herpes simplex (HSV1-tk).

3.4.2 CONTROLE DE QUALIDADE DO [^{18}F]-FHBG

A co-injeção no HPLC analítico do padrão FHBG authentic com uma alíquota da formulação final contendo o [^{18}F]-FHBG confirmou a identidade química do composto marcado (FIG 3.11A, 3.11B e 3.11C).

Figura 3.11A - Controle de qualidade do produto formulado [^{18}F]-FHBG por HPLC analítico. A) Cromatograma UV do FHBG authentic produto frio padrão. Espectro UV registrado a 254 nm. Coluna: Agilent C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μM , 100 Å., fase móvel: solvente (A) água ultrapura + 0,1%TFA e solvente (B) 100% Acetonitrila, o gradiente utilizado foi de 0% a 30% de Acetonitrila em 30 min. de corrida. sob um fluxo de 1 mL/min. O tempo de retenção do FHBG padrão de referência, foi de 11,102 min (injeção de 5 μg em 10 μl).

Fonte: autora da dissertação.

Figura 3.11B - Controle de qualidade do produto formulado [^{18}F]-FHBG por HPLC analítico. Cromatograma Radioativo e UV do produto formulado [^{18}F]-FHBG. Espectro UV registrado a 254 nm. Coluna: Agilent C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μM , 100 Å, fase móvel: solvente (A) água ultrapura + 0,1%TFA e solvente (B) 100% Acetonitrila, o gradiente utilizado foi de 0% a 30% de Acetonitrila em 30 min. de corrida. sob um fluxo de 1 mL/min. O tempo de retenção do [^{18}F]-FHBG quente, foi de 11,592 min, no UV o tempo de retenção foi registrado a 11,375 min.

Fonte: autora da dissertação.

Figura 3.11C - Controle de qualidade do produto formulado [^{18}F]-FHBG por HPLC analítico. C) Cromatogramas sobrepostos da formulação final co-injetada com o FHBG authentic (padrão). Espectro UV registrado a 254 nm. Coluna: Agilent C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μM , 100 Å, fase móvel: solvente (A) água ultrapura + 0,1%TFA e solvente (B) 100% Acetonitrila, o gradiente utilizado foi de 0% a 30% de Acetonitrila em 30 min. de corrida. sob um fluxo de 1 mL/min. O tempo de retenção do [^{18}F]-FHBG quente, foi de 11,339 min, enquanto que do FHBG authentic foi de 11,219 min.

Fonte: autora da dissertação.

A pureza química do [^{18}F]-FHBG foi sempre > 99%. Um resultado típico do controle de qualidade da formulação contendo o produto marcado é representado na FIG. 3.12

Figura 3.12 - Controle de qualidade do produto formulado [^{18}F]-FHBG por HPLC analítico. C) Cromatogramas sobrepostos da formulação final co-injetada com o FHBG authentic (padrão). Espectro UV registrado a 254 nm. Coluna: Agilent C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μM , 100 Å., fase móvel: solvente (A) água ultrapura + 0,1%TFA e solvente (B) 100% Acetonitrila, o gradiente utilizado foi de 0% a 30% de Acetonitrila em 30 min. de corrida. sob um fluxo de 1 mL/min. O tempo de retenção do [^{18}F]-FHBG, foi de 11,339 min. Na tabela pode-se observar a área aos 11.339min de 100% (Pureza Radioquímica da amostra injetada).

Fonte: autora da dissertação.

A atividade específica variou entre 0,14GBq/ μmol a 0,21GBq/ μmol , nas sínteses realizadas. A FIG 3.13 representa a curva de calibração utilizada no cálculo da atividade específica.

Figura 3.13 - Curva de calibração previamente obtida para determinação da atividade específica do radiofármaco. A curva padrão foi construída relacionando massas conhecidas ou número de moles em nmols conhecidos do FHBG authentic, com as respectivas áreas U.V (254nm) dos cromatogramas frios obtidos.

Fonte: autora da dissertação.

Por ultimo o pH do produto formulado variou de 5,0 a 5,5 (n = 19)

3.5 Conclusões

- A radiossíntese manual do [^{18}F]-FHBG foi padronizada, porém ainda pode ser otimizada visando aumentar o rendimento radioquímico total.
- Atualmente o [^{18}F]-FHBG pode ser obtido de forma manual com pureza radioquímica > 99% em 80-150min, de forma reprodutível nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia do IPEN.

- Com os níveis de atividade com as quais foi possível trabalhar manualmente com segurança, o produto radiomarcado foi obtido em quantidade e formulado adequadamente para realizar estudos *in vitro* e avaliação *in vivo*. A obtenção do produto de interesse pôde ser confirmada através da co injeção com o padrão de referência. A pureza radioquímica foi superior à 99% na maioria das sínteses, a atividade específica variou entre 0,14GBq/μmol a 0,21GBq/μmol e pH da formulação final variou de 5,0 a 5,5, dentro da faixa permitida.
- Futuramente automatizar a obtenção do [¹⁸F]-FHBG é essencial para aplicações pré-clínicas e clínicas para reduzir a exposição à radiação durante o preparo e para oferecer uma produção deste radiofármaco de meia vida curta com níveis mais altos de atividade.

3.6 Referências bibliográficas

ALAUDDIN, M. M. Positron emission tomography (PET) imaging with (18)F-based radiotracers. **Am J Nucl Med Mol Imaging**, v. 2, n. 1, p. 55-76, 2012. ISSN 2160-8407. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133802>>.

ALAUDDIN, M. M.; CONTI, P. S. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG): a new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET. **Nucl Med Biol**, v. 25, n. 3, p. 175-80, Apr 1998. ISSN 0969-8051. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620620>>.

CHANG, C. W. et al. A high yield robotic synthesis of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG) and 9-[3-[18F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine([18F] FHPG) for gene expression imaging. **Appl Radiat Isot**, v. 65, n. 1, p. 57-63, Jan 2007. ISSN 0969-8043. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16916606>>.

ELSINGA, P. H. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. **Methods Academic Press**, v. 27, p. 208–217, 2002.

GOPAL; B.; SAHA. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. Fourth edition. 1998.

GRIERSON, J. R.; SHIELDS, A. F. Radiosynthesis of 3'-deoxy-3'-[(18F)fluorothymidine: [(18F)FLT for imaging of cellular proliferation in vivo. **Nucl Med Biol**, v. 27, n. 2, p. 143-56, Feb 2000. ISSN 0969-8051. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773543>>.

GUILLAUME M et al. Recommendations for F-18 production. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 42, p. 749–762, 1991.

JACOBSON, O., D. O. KIESEWETTER AND X. CHEN. "Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes." **Bioconjugate chemistry**, v. 26, n.1, p.1-18, 2014 Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>.

KANG, S. H. et al. Comparison of two full automatic synthesis methods of 9-(4-[(18F)fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine using different chemistry modules. **Appl Radiat Isot**, v. 67, n. 10, p. 1758-63, Oct 2009. ISSN 1872-9800. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553130>>.

MEŠČIĆ, A., BETZEL, T., MÜLLER, A., SLAVIK, R., ČERMAK, S., RAIĆ-MALIĆ, S., & AMETAMEY, S. M. Synthesis and Biological Evaluation of a New Acyclic Pyrimidine Derivative as a Probe for Imaging Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase Gene Expression. **Molecules**, v.18, n.7, p.8535-49, 2013 Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>.

NIEDERMOSER, S. et al. Evaluation of an automated double-synthesis module: efficiency and reliability of subsequent radiosyntheses of FHBG and FLT. **Nucl Med Biol**, v. 39, n. 4, p. 586-92, May 2012. ISSN 1872-9614. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22172393>>.

PEÑUELAS, I., MAZZOLINI, G., BOÁN, J. F., SANGRO, B., MARTÍ-CLIMENT, J., RUIZ, M., ... & PHELPS, M. E. Positron emission tomography imaging of adenoviral-mediated transgene expression in liver cancer patients. **Gastroenterology**, v.31, n.7, p.1787-1795, 2005 .Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>.

PONDE, D. E. et al. Rapid and reproducible radiosynthesis of [18F] FHBG. **Nucl Med Biol**, v. 31, n. 1, p. 133-8, Jan 2004. ISSN 0969-8051. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741578>>.

SAHA; GOPAL; B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. Fourth edition 1998.

SATYAMURTHY, N. et al. No-carrier-added 3-(2'-[18F]fluoroethyl)spiperone, a new dopamine receptor-binding tracer for positron emission tomography. **Int J Rad Appl Instrum B**, v. 13, n. 6, p. 617-24, 1986. ISSN 0883-2897. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3494003>>.

SHIUE, G. G. et al. A simplified one-pot synthesis of 9-[(3-[18F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([18F]FHPG) and 9-(4-[18F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG) for gene therapy. **Nucl Med Biol**, v.

28, n. 7, p. 875-83, Oct 2001. ISSN 0969-8051. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578910>>.

STONE-ELANDER, S. et al. Microwaving in F-18 chemistry: quirks and tweaks. **Ernst Schering Res Found Workshop**, n. 62, p. 243-69, 2007. ISSN 0947-6075. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172158>>.

WANG, J. Q. et al. Novel radiosynthesis of PET HSV-tk gene reporter probes [18F]FHPG and [18F]FHBG employing dual Sep-Pak SPE techniques. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, n. 22, p. 3933-8, Nov 2003. ISSN 0960-894X. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592478>>.

WU; HAITAO. **Radiosynthesis of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)-guanine ([18F]FHBG)**. FALGUNI, B. Rockville.

YAGHOUBI, S. et al. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [(18)F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. **J Nucl Med**, v. 42, n. 8, p. 1225-34, Aug 2001. ISSN 0161-5505. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483684>>.

CAPÍTULO 4

ESTUDOS *IN VITRO* DE CAPTAÇÃO [^{18}F] FDG X [^{18}F] FHBG

4.1 Objetivos específicos

- Introduzir o gene de timidina quinase (TK, do inglês thymidine kinase) nas linhagens B16F10 (melanoma murino) e LLC (carcinoma Lewis de pulmão murino) para obtenção das linhagens repórter B16F10-TK e LLC-TK.
- Verificar a expressão gênica do transgene HSV1-tk nas linhagens celulares geneticamente modificadas.
- Realizar os ensaios de captação *in vitro* dos radiotraçadores [^{18}F] FHBG e [^{18}F] FDG e compará-los quanto à sensibilidade e especificidade para detectar a expressão do transgene HSV1-tk nas linhagens celulares geneticamente modificadas.

4.2 Revisão bibliográfica específica

A TIMIDINA QUINASE DO VÍRUS HERPES SIMPLES (HSV1-TK) COMO GENE REPÓRTER DE RADIOFÁRMACOS

Os artigos iniciais de (Tjuvajev *et al.*, 1995; Tjuvajev *et al.*, 1996; Tjuvajev *et al.*, 1998) descrevem pela primeira vez um modelo para estudos e pesquisas relacionadas a imagem não invasiva de expressão de transgene, a qual requer a combinação adequada de um gene repórter e um substrato ou radiotraçador repórter. Este paradigma relacionado à imagem não invasiva de expressão de transgenes corresponde essencialmente a uma enzima radiotraçadora para ensaios *in vivo*, onde o produto do gene repórter (uma enzima) converte seletivamente um radiotraçador para um metabolito que é preso dentro da célula transduzida. Várias combinações radiotraçador/gene repórter para o HSV1-tk e suas versões mutantes têm sido estudadas, estabelecidas e validadas em ensaios experimentais *in vitro* e em modelos animais, como por exemplo as combinações: 9 - [(2-hidroxi-1- (hidroximetil) etoxi) metil] guanina (GCV) (radiotraçador)/HSV1-tk (gene repórter) (Gambhir *et al.*, 1998; Haberkorn *et al.*, 1998), 9- [4-hidroxi-3- (hidroximetil) butil] guanina (PCV) (radiotraçador)/HSV1-tk (gene repórter) (Gambhir *et al.*, 1998; Haberkorn *et al.*, 1998; Namavari *et al.*, 2000; Iyer *et al.*, 2001) e outros análogos de aciclooguanosina marcados com ^{18}F , tais como 8-fluoro-9 - [(2-hidroxi-1- (hidroximetil) etoxi) metil] guanina (FGCV) (radiotraçador)/HSV1-tk (gene repórter) (Gambhir *et al.*, 1999; Namavari *et al.*, 2000), 8-fluoro-9- [4-hidroxi-3- (hidroximetil) Butil] guanina (FPCV) (radiotraçador)/ HSV1-sr39tk (gene repórter-mutante) (Gambhir *et al.*, 2000; Iyer *et al.*, 2001), 9- [3-fluoro-1-Hidroxi-2-propoximetil] guanina (FHPG) (radiotraçador)/HSV1-tk (gene repórter) (Alauddin *et al.*, 1996; Alauddin *et al.*, 1999) e 9- [4-fluoro-3- (hidroximetil) butil] guanina (FHBG) (radiotraçador)/HSV1-tk (gene repórter) (Alauddin and Conti, 1998; Alauddin *et al.*, 2001). O radiotraçador mais estudado para o gene do vírus do herpes simplex tipo 1 timidina quinase (HSV1-tk) é o 9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanina [^{18}F] FHBG (Tjuvajev *et al.*, 2002).

CAPTAÇÃO [^{18}F] FHBG (substrato de TK)

[^{18}F] FHBG é um radiotraçador derivado da droga antiviral penciclovir, uma pró-droga que é ativada por fosforilação pela enzima timidina quinase HSV (HSVtk). O HSVtk só é expresso por vírus ativos replicantes. Nas células onde o HSV-1 ativo está presente, o [^{18}F] FHBG será fosforilado pelo HSVtk, resultando no aprisionamento deste radiotraçador dentro da célula (FIG 4.2). O [^{18}F] FHBG não é fosforilado por timidina quinase inata humana ou de roedor, portanto o acúmulo do radiotraçador representa a presença de HSV-1 ativo nas células transduzidas e o radiotraçador aprisionado, pode ser detectado por imagem PET (Yaghoubi *et al.*, 2012)

Figura 4.3 - captação do [^{18}F] FHBG (substrato de TK).

Fonte: (Yaghoubi *et al.*, 2012)

CAPTAÇÃO [^{18}F] FDG (metabolismo de glicose)

A escolha do [^{18}F] FDG como radiotraçador para PET para medir o metabolismo local da glicose baseou-se em uma série de observações que começaram com estudos sobre metabolismo de carboidratos em 1954 por Sols e Crane (Sols and Crane, 1954). O [^{18}F] FDG é um análogo de glicose o qual é

ativamente transportado para o meio intracelular por transportadores de glicose, onde é fosforilado pela enzima hexoquinase para fluodesoxiglicose (^{18}F)-6-fosfato. A fluodesoxiglicose (^{18}F)-6-fosfato é um substrato inferior na próxima etapa metabólica da glicose ficando aprisionada dentro da célula na mesma proporção que sua taxa glicolítica (FIG. 4.1) (Gallagher *et al.*, 1978).

Figura 4.4 – Transporte e metabolismo [^{18}F] FDG.

Fonte:(Gallagher *et al.*, 1978).

Nesta etapa do trabalho pretendemos comparar a captação de dois radiotraçadores [^{18}F] FHBG e [^{18}F] FDG pelas linhagens celulares B16-TK e LLC-TK *in vitro*.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 INFRAESTRUTURA E BIOSSEGURANÇA

As linhagens celulares transduzidas com o vetor retroviral pCL-TK (contendo o gene da timidina kinase) ou pCL-GFP (contendo GFP-proteína fluorescente verde) para gerar as linhagens repórter de interesse, foram preparadas no Laboratório de Vetores Virais (LVV), liderado pelo Dr. Bryan Strauss, localizado no oitavo andar do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICESP-FMUSP). A manipulação das linhagens celulares envolvendo organismos geneticamente modificados (OGMs), ocorreu em área certificada para trabalho em contenção NB-2. A área possui ante-sala, para paramentação e desparamentação e duas salas de cultura classificadas como Nível de Biossegurança-2 (NB-2). Em todas as áreas, as bancadas são impermeáveis a água e resistentes a ácidos, álcalis,

solventes e calor moderado e são facilmente acessadas para limpeza. Os Organismos Geneticamente Modificados foram manipulados em cabines de segurança biológicas, tipo II, classe A, as quais foram irradiadas com Luz UV antes e após os procedimentos. Todos os experimentos foram previamente aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança CQB:0084/98 do Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

É importante ressaltar que depois de prontos os OGMs do presente trabalho (Linhagens repórter- células B16F10-TK e LLC-TK- livre de partículas virais) não apresentavam riscos, o vírus não replicava, não tinha expressão de genes virais e que o gene de interesse não apresentava perigo, assim justificando, os trabalhos *in vitro* da expressão e atividade de TK e plaqueamento das linhagens repórter para os ensaios *in vitro* com os radiotraçadores na sala 103 (NB-1) do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), CQB 0067/98. A quantificação da captação dos radiotraçadores foi realizada das dependências do Centro de Radiofarmácia do IPEN. Todos os experimentos foram previamente aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança (002/2015-IPEN/SP).

4.3.2 MATERIAIS

Os principais materiais e equipamentos utilizados nestas etapas do trabalho foram:

- Radiotraçador [^{18}F] FHBG;
- Radiotraçador [^{18}F] FDG;
- Linhagens celulares de carcinoma Lewis de pulmão murino LLC1 (ATCC® CRL-1642™) transduzidas com o vetor retroviral pCL-TK;
- Linhagens celulares melanoma murino B16F10 (ATCC® CRL-6475™) transduzidas com o vetor retroviral pCL-TK;
- Como controles, foram utilizadas as linhagens B16F10-GFP e LLC- GFP (GFP-proteína fluorescente verde);
- Solução NaOH 2M;
- PBS (Phosphate-buffered saline)

- Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)- (Gibco, Life Technologies, MD, USA)
- Meio de cultura (RPMI)- (Gibco, Life Technologies, MD, USA)
- Soro Fetal Bovino- (Gibco, Life Technologies, MD, USA)
- Tripsina- LGC BIO
- Antibiótico e antimicótico- (Gibco, Life Technologies, MD, USA)
- Tri-Reagent (Sigma)
- Garrafa T175- JET BIO- FIL
- Garrafa T 75- JET BIO- FIL
- Placa de 6 poços- JET BIO- FIL
- Ponteiras de 1 mL, 200µL e 10µL com filtro- BIOPOINTE
- Pipetas sorológicas de 5mL, 10mL e 25mL-- JET BIO- FIL
- Tubos Falcon de 15mL e 50mL- JET BIO- FIL
- Micropipetas automáticas
- Azul de Tripan
- Microscópio
- Estufa incubadora de CO₂
- Capela de fluxo laminar
- Cabines de segurança biológicas, tipo II, classe A
- Contador automático tipo poço com cristais NaI(Tl) (D5002 Cobrall Packard Camberra);
- Calibrador de atividade (CRMTM- 35R- Capintec[®])

4.3.3 CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens celulares utilizadas foram: células de carcinoma Lewis de pulmão murino LLC1 (ATCC[®] CRL-1642TM) e células melanoma murino B16F10 (ATCC[®] CRL-6475TM), transduzidas com o vetor retroviral pCL-TK (contendo o gene da timidina kinase) ou um vetor controle pCL-GFP (Green Fluorescent Protein). As células geradas LLC-TK e LLC-GFP foram cultivadas em meio de cultura DMEM com alta glicose (Gibco, Life technologies, MD, USA), e as células B16F10-TK e B16F10-GFP foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Gibco,

Life technologies, MD, USA). Todas as linhagens foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Life technologies, MD, USA) e 50µg/mL de gentamicina (Gibco, Life technologies, MD, USA) e cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂.

4.3.4 MÉTODOS

4.3.4.1 PREPARAÇÃO DOS VETORES: pCL-TK e pCL-GFP

A preparação do vetor pCL-TK ou GFP (Green Fluorescent Protein) foi realizada por Marcio Bajgelman durante seu doutoramento no LVV (Bajgelman *et al.*, 2003). Para o vetor pCL-TK, um fragmento de 1,1 kb contendo o gene da timidina kinase (TK) foi isolado do vetor pSHTK (fornecido pelo Dr Armando Ventura – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – Brasil), através de digestão com a enzima *EcoRI*. O inserto foi clonado no sítio de *EcoRI* do vetor pCL, previamente cortado com *EcoRI* e tratado com CIAP, originando o vetor pCL-TK, com 8,7 Kb.

4.3.4.2 PREPARAÇÃO DAS LINHAGENS REPÓRTER B16F10-TK e LLC-TK

Células B16F10 e LLC1 foram transduzidas com M.O.I. (*multiplicity of infection*) igual a 0,5 com o vetor retroviral pCL-TK ou GFP na presença de polibreno, 8,0 µg/ml em RPMI. No dia seguinte foi iniciada a seleção com o antibiótico geneticina (G418, Life Technologies), 800 µg/ml. Após 7 dias de seleção, células contendo o vetor pCL-TK ou GFP proliferaram, enquanto que, houve a morte total de células controle (não transduzidas). As células contendo o vetor pCL-TK ou GFP foram expandidas e mantidas na presença de 400 µg/ml G418 e posteriormente crio-preservadas em Nitrogênio Líquido.

4.3.4.3 TESTE *IN VITRO* DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE TK

O RNA total das linhagens celulares foi isolado com 1 mL de Tri-Reagent (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit High capacity cDNA RT da Applied Biosystems, de acordo com as instruções e protocolo do fabricante. O PCR quantitativo foi realizado em triplicata utilizando o kit SensiMix SYBR No-ROX da Bioline e em um medidor de fluorescência ABI Prism 7000. A quantificação relativa foi realizada pelo método $\Delta\Delta C_t$ normalizado com a expressão de β -actina (Livak and Schmittgen, 2001). Os primers utilizados encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Primers para qPCR da TK

Primer	Forward 5'–3'	Reverse 5'–3'
TK	CAATCGCGAACATCTACACC	GATATGAGGAGCCAGAACGG
β -ACTINA	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA

4.3.4.4 ENSAIO DE CAPTAÇÃO *IN VITRO* DO RADIOTRAÇADOR [^{18}F] FDG NAS LINHAGENS REPÓRTER B16F10-TK E LLC-TK

A avaliação *in vitro* da captação das linhagens repórter B16F10-TK e LLC-TK, com o radiofármaco [^{18}F] FDG, fornecido pelo Centro de radiofarmácia do IPEN, foi baseado no protocolo experimental descrito por (Maschauer *et al.*, 2004), com algumas modificações. Nos estudos com o [^{18}F] FDG, foi utilizado como controle glicose não marcada na concentração 100mM (competidor). As linhagens celulares foram plaqueadas no dia anterior ao ensaio, em triplicata, em 4 placas de 6 poços (2×10^5 células por poço). No dia seguinte, foi removido o meio de cultura das células e realizadas duas lavagens com PBS 1X (1mL) de forma a remover todos os traços de meio de cultura, em seguida, as células foram incubadas com 2mL de PBS 1X por três horas para privação de glicose das células, antes de adicionar o radiofármaco [^{18}F] FDG. Como o [^{18}F] FDG é

um análogo de glicose e caso as células fossem incubadas com este análogo em meio com alta concentração de glicose, haveria competição entre [^{18}F] FDG e a glicose o que causaria baixa captação do radiotraçador. Após este intervalo, as células de duas placas receberam o composto radioativo [^{18}F] FDG (0,31 MBq/poço ou 8,5 μCi /poço), enquanto que as células das outras duas placas receberam o composto radioativo [^{18}F] FDG (0,31 MBq/poço ou 8,5 μCi /poço) + competidor glicose na concentração de 100mM e foram incubadas por 1 hora e meia a temperatura ambiente. Após esse intervalo, foi removida a solução radioativa adicionada e as células foram lavadas (2x) com PBS (1 mL) para remover o excesso do radiotraçador, não fosforilado. Na sequência, foi efetuada a lise das células ao adicionar 1.5 mL/poço de uma solução de NaOH 2N. O lisado celular, unido as duas lavagens do poço com 1 mL de PBS, foram recolhidos para tubos apropriados para análise em contador gama (Cobra II Auto-Gamma, Packard). A atividade foi calculada, para quantificar a captação de [^{18}F] FDG.

4.3.4.5 ENSAIO DE CAPTAÇÃO *IN VITRO* DO RADIOTRAÇADOR [^{18}F] FHBG NAS LINHAGENS REPÓRTER B16F10-TK E LLC-TK

A avaliação *in vitro* com o radiofármaco [^{18}F] FHBG, sintetizado manualmente no laboratório de pesquisa do Centro de radiofarmácia do IPEN, foi baseado nos protocolos experimentais descritos por (Liu *et al.*, 2012) e (Najjar *et al.*, 2009), com algumas modificações. As linhagens celulares foram plaqueadas no dia anterior ao ensaio, em triplicata, em placas de 6 poços (2 X 10^5 células por poço). No dia seguinte, foi removido o meio de cultura das células e realizadas duas lavagens com PBS 1X (1mL) de forma a remover todos os traços de meio de cultura. Em seguida, as células receberam o composto radioativo [^{18}F] FHBG (0,37 MBq/poço ou 10 μCi /poço) e foram incubadas por 2 horas a 37°C. Após esse intervalo, foi removida a solução radioativa adicionada e as células foram lavadas (2x) com PBS (1 mL) para remover o excesso do radiotraçador, não fosforilado. Na sequência, foi efetuada a lise das células ao adicionar 1.5 mL/poço de uma solução de NaOH 2N. O lisado celular, unido às

duas lavagens do poço com 1 mL de PBS, foram recolhidos para tubos apropriados para análise em contador gama (Cobra II Auto-Gamma, Packard). A atividade foi calculada, para quantificar a captação de [^{18}F] FHBG.

4.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por intermédio do programa GraphPad Prism 5.00[®]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados quantitativos encontram-se expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão. Quando aplicável, a média foi comparada usando os testes t-test, ANOVA ou TWO-way ANOVA. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.4 Resultados e discussões

4.4.1 TESTE *IN VITRO* DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE TK

Inicialmente as células B16F10 e LLC1 foram transduzidas com o vetor viral pCL-TK de forma a super-expressar a enzima TK. Como controle, as células B16F10 e LLC1 foram transduzidas com um vetor viral contendo GFP (Green Fluorescent Protein). Pela análise do RNAm da enzima TK observou-se que as células B16-TK e LLC-TK expressam significativamente níveis mais elevados de TK que as células controle B16-GFP e LLC-GFP, respectivamente (FIG 4.3). Além do mais, verificou-se que as células B16-TK expressam maiores níveis de TK que as células LLC-TK (FIG. 4.3). As linhagens geradas foram utilizadas nos estudos subsequentes.

Figura 4.3 - Expressão relativa de RNAm de TK nas linhagens repórter B16-TK, B16-GFP, LLC-TK e LLC-GFP. O RNA total foi extraído das linhagens em cultura e o níveis de RNAm de TK foram avaliados usando a técnica de PCR em tempo real. A quantificação relativa foi realizada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizada com a expressão de β -actina. Os resultados encontram-se expressos como a média $\pm$ desvio padrão, n=3, ****p<0.0001.

Fonte: autora da dissertação.

4.4.2 ENSAIO DE CAPTAÇÃO *IN VITRO* DOS RADIOTRAÇADORES [^{18}F] FDG X [^{18}F] FHBG

Com o objetivo de avaliar a especificidade do radiotraçador [^{18}F] FHBG para a enzima TK, em seguida, foram realizados estudos *in vitro* com as células B16 e LLC que superexpressam ou não a TK. Brevemente, as células B16-TK ou -GFP, LLC-TK ou -GFP foram plaqueadas em placa de 6 poços e posteriormente incubadas por duas horas com o radiofármaco [^{18}F] FHBG. Na FIG 4.4 podemos observar que as linhagens que superexpressam a enzima TK (B16-TK e LLC-TK) captaram mais [^{18}F] FHBG do que as respectivas linhagens controle (B16-GFP e LLC-GFP). Este dado indica que o radiofármaco [^{18}F] FHBG é capaz de ligar seletivamente às células que expressam a enzima TK diferenciando-as das células tumorais controle (GFP), nas quais pouca ligação é observada.

Figure 4.4 – Estudo de captação *in vitro* de [^{18}F]-FHBG nas células B16F10 e LLC. 2×10^5 células B16-TK, B16-LLC, LLC-TK e LLC-GFP foram plaqueadas no dia anterior ao ensaio em placas de 6 poços. No dia seguinte, as células foram tratadas com $10 \mu\text{Ci}$ [^{18}F]-FHBG por poço, por um período de 2 horas. No final do ensaio as células foram recolhidas e a atividade (CPM) nas células avaliada num contador gama. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão, $n=3$. ** $p>0,01$, *** $p>0,001$.

Fonte: autora da dissertação.

O radiofármaco comumente utilizado na clínica, [^{18}F] FDG, também foi utilizado nos ensaios *in vitro* com a finalidade de comparar a especificidade de captação entre as linhagens que expressam ou não a enzima TK. Pela observação da FIG 4.5 podemos observar que as células que expressam TK (B16-TK e LLC-TK) apresentam uma maior captação de [^{18}F] FDG do que as células controle B16-GFP e LLC-GFP. No entanto, e diferentemente do radiofármaco [^{18}F] FHBG, as células controle (GFP) apresentam um nível basal de captação pelo [^{18}F] FDG mais alto que o radiofármaco [^{18}F] FHBG. Em ambas linhagens, a incubação prévia com glicose 100 mM inibiu a captação por [^{18}F] FDG.

Figura 4.5 - Estudo de captação *in vitro* de [^{18}F]-FDG nas células B16F10 e LLC. 2×10^5 células B16-TK, B16-LLC, LLC-TK e LLC-GFP foram plaqueadas no dia anterior ao ensaio em placas de 6 poços. No dia seguinte, as células foram privadas de glicose por 2 horas antes da adição de $10 \mu\text{Ci}$ de [^{18}F]-FDG por poço. No final do ensaio as células foram recolhidas e a atividade (CPM) nas células avaliada num contador gama. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão, $n=3$. ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$.

Fonte: autora da dissertação.

Por fim, foi analisada a taxa de captação do [^{18}F] FHBG e do [^{18}F] FDG entre as células que expressam a enzima TK em relação às células controle GFP. Foi verificado que o [^{18}F] FHBG é um radiofármaco mais seletivo que o [^{18}F] FDG para células que expressam TK, FIG 4.6. Isto é, o [^{18}F] FHBG liga cerca de 4 vezes mais em células que expressam TK (B16-TK e LLC-TK) em comparação com as células controle GFP. Por seu lado, o [^{18}F] FDG apenas liga cerca de duas vezes mais em células TK do que em células que expressam GFP.

Figure 4.6 - Gráfico apresentando a captação específica de FDG e FHBG nas células B16 e LLC transduzidas com o gene da tirosina quinase (TK) em comparação com as células controle (GFP). Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão, n=3.

Fonte: autora da dissertação.

Os dados obtidos até aqui indicam que o [^{18}F] FHBG é mais seletivo do que o [^{18}F] FDG para distinguir células que expressam a enzima TK. De fato, a maior taxa de incorporação do [^{18}F] FHBG em células transduzidas com o gene da TK pode dever-se à fosforilação seletiva por HSV TK e acumulação nas mesmas. Dessa forma, o [^{18}F] FHBG aparenta também ser mais adequado para efeitos de imagiologia de infecção viral em células transduzidas com a proteína TK, em terapia gênica. Segundo (Yaghoubi and Gambhir, 2006a), o nível de acumulação específica de radiotraçadores como o [^{18}F] FHBG (substrato de TK), depende do nível de atividade enzimática de TK nas células. De acordo com (Su *et al.*, 2004), a taxa de absorção de [^{18}F] FHBG é equivalente entre as diferentes linhagens celulares. Os derivados de guanosina entram e saem das células via mesmos mecanismos nucleobase e / ou transportadores de nucleotídeos, portanto, os mecanismos de transporte não limitam o fluxo de [^{18}F] FHBG. Em contraste, a retenção celular da forma fosforilada de [^{18}F] FHBG é um evento limitante, que por sua vez é principalmente dependente do nível da expressão de HSV-TK. Nossos dados mostram que a linhagem B16-TK apresenta uma maior expressão do RNAm da TK em comparação com a linhagem LLC-TK. No entanto, a

linhagem LLC-TK sempre apresentou níveis de captação de [^{18}F] FHBG mais elevados que as células B16-TK. Apesar de contraditório, estes resultados sugerem que nem sempre os níveis de RNAm se encontram positivamente correlacionados com a expressão proteica. De fato, diversos relatos têm demonstrado que apesar de útil, a técnica de PCR em tempo real está longe de ser perfeita quanto à capacidade de prever os níveis proteicos de determinadas proteínas (Guo *et al.*, 2008; Maier *et al.*, 2009).

4.5 Conclusões

- Os estudos *in vitro* indicaram maior potencial em utilizar o [^{18}F] FHBG em comparação ao [^{18}F] FDG como radiotraçador PET para monitorar a expressão de HSV1-tk *in vivo*.

4.6 Referências bibliográficas

ALAUDDIN, M. M.; CONTI, P. S. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[^{18}F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([^{18}F]FHBG): a new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET. **Nucl Med Biol**, v. 25, n. 3, p. 175-80, Apr 1998. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620620> >.

ALAUDDIN, M. M. et al. 9-[(3-[^{18}F]-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([^{18}F]-FHPG): a potential imaging agent of viral infection and gene therapy using PET. **Nucl Med Biol**, v. 23, n. 6, p. 787-92, Aug 1996. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940722> >.

ALAUDDIN, M. M. et al.. Preclinical evaluation of the penciclovir analog 9-(4-[^{18}F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine for in vivo measurement of suicide gene expression with PET. **J Nucl Med**, v. 42, n. 11, p. 1682-90, Nov 2001. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696640> >.

ALAUDDIN, M. M. et al.. Evaluation of 9-[(3-[^{18}F]-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([^{18}F]-FHPG) in vitro and in vivo as a probe for PET imaging of gene incorporation and expression in tumors. **Nucl Med Biol**, v. 26, n. 4, p. 371-6, May 1999. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10382839> >.

BAJGELMAN, M. C.; COSTANZI-STRAUSS, E.; STRAUSS, B. E. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. **J Biotechnol**, v. 103, n. 2, p. 97-106, Jun 2003. ISSN 0168-1656. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814868> >.

GALLAGHER, B. M. et al. Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. **J Nucl Med**, v. 19, n. 10, p. 1154-61, Oct 1978. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/214528> >.

GAMBHIR, S. S. et al. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 5, p. 2333-8, Mar 1999. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10051642> >.

GAMBHIR, S. S. et al. Imaging of adenoviral-directed herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene expression in mice with radiolabeled ganciclovir. **J Nucl Med**, v. 39, n. 11, p. 2003-11, Nov 1998. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829598> >.

GAMBHIR, S. S. et al. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 6, p. 2785-90, Mar 2000. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716999> >.

GUO, Y. et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 40, n. 5, p. 426-36, May 2008. ISSN 1745-7270. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18465028> >.

HABERKORN, U. et al. Ganciclovir uptake in human mammary carcinoma cells expressing herpes simplex virus thymidine kinase. **Nucl Med Biol**, v. 25, n. 4, p. 367-73, May 1998. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639298> >.

IYER, M. et al. 8-[18F]Fluoropenciclovir: an improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET. **J Nucl Med**, v. 42, n. 1, p. 96-105, Jan 2001. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11197989> >.

LIU, J. et al. Early stem cell engraftment predicts late cardiac functional recovery: preclinical insights from molecular imaging. **Circ Cardiovasc Imaging**, v. 5, n. 4, p. 481-90, Jul 2012. ISSN 1942-0080. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22565608> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**,

v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Lett**, v. 583, n. 24, p. 3966-73, Dec 2009. ISSN 1873-3468. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850042> >.

MASCHAUER, S. et al. Characterization of 18F-FDG uptake in human endothelial cells in vitro. **J Nucl Med**, v. 45, n. 3, p. 455-60, Mar 2004. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001687> >.

NAJJAR, A. M. et al. Molecular-genetic PET imaging using an HSV1-tk mutant reporter gene with enhanced specificity to acycloguanosine nucleoside analogs. **J Nucl Med**, v. 50, n. 3, p. 409-16, Mar 2009. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223410> >.

NAMAVARI, M. et al. Synthesis of 8-[(18)F]fluoroguanine derivatives: in vivo probes for imaging gene expression with positron emission tomography. **Nucl Med Biol**, v. 27, n. 2, p. 157-62, Feb 2000. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773544> >.

SOLS, A.; CRANE, R. K. Substrate specificity of brain hexokinase. **J Biol Chem**, v. 210, n. 2, p. 581-95, Oct 1954. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13211595> >.

SU, H. et al. Quantitation of cell number by a positron emission tomography reporter gene strategy. **Mol Imaging Biol**, v. 6, n. 3, p. 139-48, 2004 May-Jun 2004. ISSN 1536-1632. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193248> >.

TJUVAJEV, J. G. et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. **Cancer Res**, v. 58, n. 19, p. 4333-41, Oct 1998. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766661> >.

TJUVAJEV, J. G. et al. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression. **J Nucl Med**, v. 43, n. 8, p. 1072-83, Aug 2002. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163634> >.

TJUVAJEV, J. G. et al. Noninvasive imaging of herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method for monitoring clinical gene therapy. **Cancer Res**, v. 56, n. 18, p. 4087-95, Sep 1996. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797571> >.

TJUVAJEV, J. G. et al. Imaging the expression of transfected genes in vivo. **Cancer Res**, v. 55, n. 24, p. 6126-32, Dec 1995. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521403> >.

YAGHOUBI, S. S. et al. Positron emission tomography reporter genes and reporter probes: gene and cell therapy applications. **Theranostics**, v. 2, n. 4, p. 374-91, 2012. ISSN 1838-7640. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509201> >.

YAGHOUBI, S. S.; GAMBHIR, S. S. Measuring herpes simplex virus thymidine kinase reporter gene expression in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 2137-42, 2006. ISSN 1750-2799. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17487205> >.

CAPÍTULO 5

Estudos *in vivo* imageamento

[¹⁸F] FDG x [¹⁸F] FHBG e

imunoterapia

5.1 Objetivos específicos

- Preparo da vacina derivada de células B16F10-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β .
- Padronização da detecção por imagem de metástase pulmonar em camundongo com os radiofármacos [¹⁸F] FDG (metabolismo de glicose) e [¹⁸F] FHBG (substrato de TK).
- Tratamento profilático e terapêutico de metástase pulmonar em camundongo utilizando a vacina derivada de células B16F10-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β .

5.2 Revisão bibliográfica específica

A imagem com radionuclídeos em Oncologia foi originalmente aplicada para detecção de tumores, mas sua aplicação foi ampliada para monitorar a eficácia da terapia. Procedimentos de imagem molecular baseados em processos metabólicos, tais como o PET estão cada vez mais ganhando aceitação como os procedimentos mais adequados para avaliar a resposta à terapia em substituição à imagens anatômicas como Tomografia Computadorizada (CT) ou Imagem de Ressonância Magnética (MRI) (Peñuelas, Haberkorn, *et al.*, 2005).

A Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) é uma ferramenta de imagem analítica em que compostos marcados com radionuclídeos emissores de pósitrons são usados para medir processos biológicos. Essas moléculas marcadas com radionuclídeos emissores de pósitrons após injetadas por via intravenosa, são retidas em tecidos como resultado da ligação a um receptor, aprisionamento celular devido à conversão catalisada por enzimas, ou captura intracelular através de um transportador. Imagens tomográficas da distribuição da radioatividade dentro do corpo podem ser geradas e avaliadas quantitativamente (FIG. 5.1) (Gambhir, 2002; Yaghoubi *et al.*, 2012).

Figura 5.1 – Mecanismo de tomografia por emissão de pósitrons (PET). O PET é uma modalidade de imagem molecular utilizada em estudos pré-clínicos e imagem clínica de eventos moleculares *in vivo*. A imagem PET envolve um radiotraçador marcado por radioisótopos emissores de pósitrons e instrumentação capaz de detectar, de maneira coincidente, a radiação emitida quando os pósitrons emitidos pelo radiotraçador colidem com elétrons. Desta forma, as câmeras PET adquirem dados sobre a localização precisa dos radiotraçadores dentro do organismo vivo e a quantidade do radiotraçador acumulado em cada local. Os radiotraçadores PET geralmente se acumulam em um local por meio de moléculas receptoras, interação com uma enzima ou um mecanismo de transporte celular (Yaghoubi *et al.*, 2012).

Fonte: (Yaghoubi *et al.*, 2012)

Técnicas de imagem molecular de monitoramento de expressão gênica estão sendo desenvolvidas e usadas com sucesso em modelos animais, e posteriormente sua sensibilidade e reprodutibilidade precisam ser testadas e validadas em estudos humanos (Peñuelas, Haberkorn, *et al.*, 2005).

O 18F- Fluorodeoxiglucose (FDG), radiofármaco para PET, já foi utilizado em pacientes com câncer para avaliar a resposta à radio ou quimioterapia (Ishimori *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2004), e, em muitos casos, o FDG-PET mostrou-se superior à tomografia computadorizada (TC) e imagem por ressonância magnética (MRI) em prever a resposta à terapia. No entanto, uma das principais limitações para a aplicação da imagem FDG- PET na rotina para monitoramento de terapia gênica é que pouca informação está disponível sobre como a própria terapia gênica pode alterar a absorção de radiofármacos como [^{18}F] FDG, e isso é algo que tem que ser cuidadosamente considerado. Mudanças metabólicas induzidas nas células transduzidas podem modificar o padrão de absorção do radiofármaco na lesão, dando assim resultados falsos

positivos ou falsos negativos. Vários radiotraçadores marcados com pósitrons seletivos para o repórter gene, HSV1-TK, foram projetados e testados em cultura celular e em animais de laboratório (Haberkorn *et al.*, 1997; Min *et al.*, 2003) e dois deles estão sendo utilizados em estudos em voluntários saudáveis (Jacobs, Bräunlich, *et al.*, 2001; Yaghoubi *et al.*, 2001) e pacientes com câncer (Jacobs, Voges, *et al.*, 2001; Peñuelas, Mazzolini, *et al.*, 2005): o penciclovir marcado com ^{18}F derivado 9- (4- [^{18}F] fluoro-3-hidroximetilbutil) - Guanina ([^{18}F] FHBG) e o derivado de uracil marcado com ^{124}I 5- [^{124}I] iodo-2'-fluoro-2'-desoxi-1-p-D-arabinofuranosil-5- Iodouracil ([^{124}I] FIAU).

Atualmente, é de grande interesse que a avaliação da resposta à terapia genética ocorra o mais precocemente possível. Nesta parte do trabalho, apresentamos os materiais, infraestrutura, metodologias e resultados obtidos no uso e comparação dos radiotraçadores [^{18}F] FDG e [^{18}F] FHBG em detectar metástases num modelo de melanoma metastático murino e os resultados da eficácia de uma nova imunoterapia, testada em modelo profilático e terapêutico animal de melanoma metastático. Futuramente pretende-se utilizar pela primeira vez esses radiotraçadores para o acompanhamento *in vivo* e sem a necessidade de sacrificar os animais a eficácia desta nova imunoterapia.

5.3 Materiais e métodos

5.3.1 INFRAESTRUTURA

Os preparos das células e vacina envolvendo Organismos Geneticamente Modificados foram realizados no Laboratório de Vetores Virais (LVV), no oitavo andar do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICESP-FMUSP). Os trabalhos com o preparo das células para injeção e ensaios *in vivo* em camundongos C57BL/6, ocorreram na sala 103 (NB-1) do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), CQB 0067/98. Os camundongos C57BL/6 ficaram alojados no Biotério do IPEN e os estudos de imagem foram realizados no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia do mesmo Instituto.

As análises Hematoxilina e **Eosina** simples (H&E) e histoquímica Fontana-Masson foram realizadas no Laboratório de Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ - Brasil

5.3.2 MATERIAIS

Os principais materiais e equipamentos utilizados nos estudos *in vivo* foram:

- Radiotraçador [¹⁸F] FHBG;
- Radiotraçador [¹⁸F] FDG;
- Linhagens celulares melanoma murino B16F10 (ATCC® CRL-6475™) transduzidas com o vetor retroviral pCL-TK;
- PBS;
- Meio de cultura (RPMI)- (Gibco, Life technologies, MD, USA);
- Soro Fetal Bovino- (Gibco, Life technologies, MD, USA);
- Tripsina- LGC BIO;
- Antibiótico e antimicótico- (Gibco, Life technologies, MD, USA);
- Garrafa T175- JET BIO- FIL;
- Garrafa T 75- JET BIO- FIL;
- Ponteiras de 1 mL, 200µL e 10µL com filtro- BIOPOINTE;
- Pipetas sorológicas de 5mL, 10mL e 25mL-- JET BIO- FIL;
- Tubos Falcon de 15mL e 50mL- JET BIO- FIL;
- Micropipetas automáticas;
- Azul de Tripan;
- Microscópio;
- Estufa incubadora de CO₂;
- Capela de fluxo laminar;
- Calibrador de atividade (CRM™- 35R- Capintec®);
- Isoflurano em oxigênio;
- micro- SPECT/PET/CT (Albira micro PET, Bruker Inc);
- PMOD software (PMOD Technologies, Zurich, CH);

5.3.3 CÉLULAS

As linhagens repórter B16F10-TK foram cultivadas no Centro de Biotecnologia do IPEN conforme descrito no capítulo 4 seção 4.3.4.2. As células foram tripsinizadas e depois ressuspensas em solução e concentrações conforme os ensaios realizados.

5.3.4 VACINA

Os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β foram construídos previamente no LVV (Ribeiro, 2011; Medrano, 2013). O vetor pENTR-PG-IFN β , já existente no LVV, foi recombinação com o vetor pADRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PG-IFN β . O vetor pENTR-PG-p19Arf, já existente no LVV, foi recombinação com o vetor pADRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PG-p19Arf. Como controle, foi empregado o vetor AdRGDPGeGFP, também construído previamente no LVV. O vetor pENTR-PGeGFP, já existente no laboratório, foi recombinação com o vetor pADRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PGeGFP.

Preparação da vacina:

Na primeira etapa, células B16F10-TK foram transduzidas com a combinação de AdRGDPGIFN β e AdRGDPGp19 (M.O.I 50 cada) e mantidas em cultura por 48 horas. As células transduzidas pelos vetores foram ressuspensas em 100 μ L de PBS1x. Estas condições foram derivadas das estabelecidas previamente no LVV (Medrano, 2013).

5.3.5 ANIMAIS

Fêmeas de camundongos, C57BL/6, utilizadas neste trabalho, com sete a oito semanas de idade e 20 a 25 gramas de peso, n=5 animais/grupo, foram fornecidas pelo biotério do IPEN - CNEN/SP (São Paulo, SP, Brasil). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN (Projeto N°153/15/CEUA-IPEN/SP) e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Os animais foram mantidos no biotério nas seguintes condições de criação: temperatura ambiente: $22 \pm 2^\circ \text{C}$; iluminação artificial com ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de escuridão; receberam ração e água *ad libitum* (exceto quando foi realizado o protocolo experimental para o [^{18}F] FDG). A condição de jejum envolveu a retenção de alimentos 12 horas antes da injeção do [^{18}F] FDG, entretanto, os camundongos tiveram livre acesso a água *ad libitum* em todos os momentos. Os camundongos foram aquecidos pelo menos 30 minutos antes da injeção [^{18}F] FDG e mantidos assim até a captação da imagem. Nos ensaios com o [^{18}F] FHBG, não houve necessidade de manter os animais em jejum, 12 horas antes da administração.

5.3.6 MÉTODOS

5.3.6.1 PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE LESÕES METASTÁTICAS COM [^{18}F] FDG (METABOLISMO DE GLICOSE)

Este protocolo foi montado baseado nos estudos de (Winkelmann *et al.*, 2006). Como modelo de lesões metastáticas, 5×10^5 células B16F10-TK /animal foram injetadas, intravenosamente, em camundongos C57BL/6 fêmeas, em volume total de 100 μl de PBS (n=3 animais/grupo). Ao final de 7, 14 e 27 dias, os animais foram submetidos a imageamento PET, com [^{18}F] FDG.

Os animais foram anestesiados com Isoflurano em oxigênio medicinal e receberam no intervalo de 22,2MBq-600 μCi a 29,6MBq-800 μCi do [^{18}F] FDG por via endovenosa. Ainda sob efeito de anestesia, foram feitas as aquisições de

imagem por Tomografia por Emissão de Pósitrons- PET (Albira micro PET, Bruker Inc), seguido de Tomografia Computadorizada (CT) no mesmo equipamento. Imagens adquiridas foram reconstruídas e posteriormente analisadas com o software PMOD (PMOD Technologies, Zurich, CH) quanto a presença de metástases, em diferentes órgãos, mas principalmente nos pulmões.

5.3.6.2 PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE LESÕES METASTÁTICAS COM [¹⁸F] FHBG (SUBSTRATO DE TK)

Este protocolo foi montado baseado nos estudos de (Yaghoubi and Gambhir, 2006b). Como modelo de lesões metastáticas, 5×10^5 células B16F10-TK /animal foram injetadas, intravenosamente, em camundongos C57BL/6 fêmeas, em volume total de 100 µl de PBS (n=5 animais/grupo). Ao final de 9, 17 e 22 dias, os animais foram submetidos a imageamento PET, com [¹⁸F] FHBG.

Os animais foram anestesiados com Isoflurano em oxigênio medicinal e receberam no intervalo de 3,51MBq-95µCi a 4,96MBq-134µCi do [¹⁸F] FHBG por via endovenosa. Ainda sob efeito de anestesia, foram feitas as aquisições de imagem por Tomografia por Emissão de Pósitrons- PET (Albira micro PET, Bruker Inc), seguido de Tomografia Computadorizada (CT) no mesmo equipamento. Imagens adquiridas foram reconstruídas e posteriormente analisadas com o software PMOD (PMOD Technologies, Zurich, CH) quanto a presença de metástases, em diferentes órgãos, mas principalmente nos pulmões.

5.3.6.3 MODELO PROFILÁTICO DE IMUNOTERAPIA

O protocolo dos modelos profilático e terapêutico foram desenvolvidos a partir de resultados da dissertação de Mestrado de Ruan Felipe Vieira Medrano, obtidos no Laboratório de Vetores Virais, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Medrano, 2013). No modelo profilático, a vacina foi aplicada uma única

vez, 7 dias antes da administração intravenosa de células B16F10-TK. Neste caso, a vacina derivada de células B16F10-TK transduzidas com a combinação p19arf e interferon β (3×10^5 células em 100 μ L), foi administrada subcutâneamente (s.c) no flanco de camundongos C57BL/6 fêmeas, n=5/grupo, no dia 1 do protocolo, neste mesmo dia, o grupo controle, n=5/grupo recebeu 100 μ L de PBS 1X, subcutâneo, também no flanco. No dia 7 do protocolo, todos os 10 animais receberam 5×10^5 células B16F10-TK, injetadas intravenosamente em 100 μ l de PBS 1X. Os animais foram monitorados por imageamento com [18 F] FDG, 15, 21 e 29 dias após receberem a vacina.

No dia 29 do protocolo, alguns animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o tecido de interesse, pulmão, foi isolado e fotografado para registro dos focos metastáticos.

5.3.6.4 MODELO TERAPÊUTICO DE IMUNOTERAPIA

Neste modelo as lesões metastáticas foram estabelecidas no dia 1 do protocolo e posteriormente a vacina foi aplicada, como tratamento, nos dias 3 e 10 do protocolo. Portanto, no dia 1 do protocolo, 10 camundongos C57BL/6 fêmeas foram injetados i.v (veia caudal), com 5×10^5 células B16F10-TK, em 100 μ l de PBS. No dia 3, a vacina derivada de 3×10^5 células foi administrada subcutâneamente no flanco de camundongos C57BL/6, n=5/grupo, enquanto que, o grupo controle, n=5/grupo recebeu PBS 1X. No dia 10, a vacina derivada de 3×10^5 células foi administrada no mesmo local. O imageamento, com 18 F-FDG foi iniciado no dia 8 e novamente no dia 16. No dia 8 do protocolo, 2 animais tratados e 2 animais controle foram eutanasiados após imageamento com 18 F-FDG e os tecidos de interesse (especialmente o pulmão) isolados e fotografados. Foi realizada a contagem do número de focos metastáticos (contagem manual a partir do tecido molhado visualizado em lupa) e após, os pulmões foram coletados e transferidos para tubos contendo solução de paraformaldeído 4% para serem encaminhados para avaliação histopatológica em laboratório no Rio de Janeiro. No dia 16 do protocolo, os demais animais, 3 animais tratados e 3 animais controle, foram eutanasiados e os tecidos examinados e coletados conforme descrito anteriormente.

5.3.6.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS PULMÕES

O protocolo de análise morfológica dos pulmões foi realizado de acordo com os estudos de (Cachin *et al.*, 2014), com algumas modificações. A análise morfológica foi realizada nos pulmões de três animais de cada grupo (PBS e vacinados) ao final de 1 e 2 semanas pós-inoculação das células B16-TK intravenosamente em animais C57/bl6. Os pulmões foram fixados em solução tamponada de paraformaldeído 4%, processados segundo procedimentos de rotina e incluídos em parafina. As amostras foram cortadas em micrômetro com espessura de 4 µm, posteriormente os cortes foram aderidos a lâminas de vidro com 0,1% de poly-L-lysina (Sigma, St. Lois, MO). Os cortes histológicos foram inicialmente incubados em xilol para remoção de parafina e rehidratados em concentrações decrescentes de etanol, até chegar em 70%. Subsequentemente, os cortes histológicos foram lavados com PBS. Para a coloração de Hematoxilina Eosina, o corante Hematoxilina de Harris (6%) foi adicionado por 2 minutos seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos. Subsequentemente, os cortes foram incubados em Eosina (2%) por mais 2 minutos e lavados rapidamente em água destilada. Para a coloração de Fontana - Masson, os cortes foram incubados à 56 °C por 45 minutos em Nitrato de Prata a 5% seguido de lavagem em PBS e incubação por 2 minutos em Tiosulfato de Sódio a 2%. Subsequentemente, os cortes foram incubados por 3 minutos em Vermelho Neutro a 1% e lavados em água corrente por 5 minutos (Fontana Masson, Abcam). Após a lavagem, as lâminas processadas tanto para Hematoxilina Eosina quanto para Fontana Masson foram novamente desidratadas em concentrações crescentes de etanol, incubadas em xilol e as lâminas permanentes montadas com Etellan (EMS). Os cortes histológicos foram analisados e as imagens foram capturadas com microscópio Nikon Eclipse E600 acoplado com câmera digital Nikon DP-72 (Nikon, Japan). A quantificação da marcação foi feita através do programa Image J. Para as lâminas provenientes da coloração de Hematoxilina Eosina, nódulos representativos foram selecionados por um observador e suas áreas foram quantificadas. Para a coloração de Fontana-Masson para melanina, 5 campos aleatórios foram

selecionadas com o aumento de 5x e a quantidade de nódulos foi avaliada para a presença de marcação para melanina, que corresponde à fração de área preta em percentagem da imagem.

5.3.6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por intermédio do programa GraphPad Prism 5.00[®]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados quantitativos encontram-se expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.4 Resultados e discussões

5.4.1 PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE LESÕES METASTÁTICAS COM [¹⁸F] FDG (metabolismo de glicose)

Estes estudos foram realizados antes de iniciar o acompanhamento da eficácia da imunoterapia para melanoma metastático, com a finalidade de padronizar o tempo de detecção da metástase pulmonar com o [¹⁸F] FDG e futuramente comparar com a detecção por [¹⁸F] FHBG.

Para padronizar a detecção de lesões metastáticas no pulmão, 5×10^5 células B16-TK foram injetadas intravenosamente em animais C57BL/6. A cada 7 dias, os animais foram injetados intravenosamente com [¹⁸F] FDG e submetidos a imageamento com o μ PET/CT a fim de se avaliar a presença de metástase nos pulmões. Na FIG 5.2. Podemos observar que as lesões pulmonares apenas são detectadas no dia 27, não se observando nenhuma captação com [¹⁸F] FDG nos dias anteriores, 7 e 14. A partir deste experimento, observámos que o [¹⁸F] FDG somente detecta metástases a partir de 15 dias do estabelecimento das lesões.

Figura 5.2 - Padronização da detecção de lesões metastáticas com $[^{18}\text{F}]$ FDG. Animais C57BL/6 previamente inoculados intravenosamente com 5×10^5 B16F10-TK foram injetados via intravenosa com 22,2MBq de $[^{18}\text{F}]$ FDG ao final de 7, 14 e 27 dias. 60 minutos após a injeção do $[^{18}\text{F}]$ FDG os animais foram anestesiados com isoflurano, colocados na câmara de escaneamento e analisados no $\mu\text{PET}/\text{CT}$ (μPET Albira). A figura apresenta a sobreposição da imagem obtida por PET e CT (em cima) e a imagem apenas por CT (em baixo). N=3 por grupo.

Fonte: autora da dissertação.

5.4.2 PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE LESÕES METASTÁTICAS COM $[^{18}\text{F}]$ FHBG (substrato de TK)

Estes estudos foram realizados com a finalidade de comparar o tempo de detecção de metástases pulmonar por $[^{18}\text{F}]$ FHBG sintetizado manualmente, com os estudos realizados com o radiotraçador $[^{18}\text{F}]$ FDG, uma vez que, os resultados dos estudos *in vitro*, se mostraram promissores por uma detecção mais específica de células que expressam a enzima TK como é o caso das células B16F10-TK.

Para isso, 5×10^5 células B16F10-TK foram injetadas intravenosamente em animais C57BL/6. Ao final de 9, 17 e 22 dias, os animais foram injetados

intravenosamente com [^{18}F] FHBG e submetidos a imageamento com o $\mu\text{PET}/\text{CT}$ a fim de se avaliar a presença de metástase nos pulmões. Como observado na FIG 5.3, utilizando o radiofármaco [^{18}F] FHBG, não conseguimos verificar nenhuma captação nos pulmões durante as três semanas de acompanhamento, após estabelecimento das metástases. As imagens PET/CT mostram no entanto, captação no intestino e bexiga dos animais monitorados.

Figura 5.3 - Padronização da detecção de lesões metastáticas com [^{18}F] FHBG. Animais C57BL/6 previamente inoculados intravenosamente com 5×10^5 B16F10-TK foram injetados via intravenosa com 3,5MBq de [^{18}F] FHBG ao final de 9, 17 e 22 dias. 60 minutos após a injeção do [^{18}F] FHBG os animais foram anestesiados com isoflurano por inalação, colocados na câmara de escaneamento e analisados no microPET/CT (microPET Albira). A figura apresenta a sobreposição da imagem obtida por PET e CT (cinza). N=3 por grupo.

Fonte: autora da dissertação.

5.4.3 MODELO PROFILÁTICO DE IMUNOTERAPIA

No modelo de imunoterapia profilática utilizou-se uma vacina que consistiu de células B16F10-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β . Como controle, em vez da vacina, os animais receberam PBS. A vacina ou o PBS foram administrados subcutâneamente no flanco direito dos camundongos 7 dias antes da administração intravenosa de 5×10^5 células B16F10-TK. A eficácia da vacinação no crescimento de metástase pulmonares foi avaliada por imageamento no

μ PET/CT com uso do radiofármaco [^{18}F] FDG. Na FIG. 5.4. podemos verificar que, tal como nos resultados anteriores, a captação de [^{18}F] FDG nas lesões pulmonares apenas são observáveis a partir da terceira semana de experimento (dia 29). Além do mais, podemos verificar que a captação de [^{18}F] FDG se encontra ligeiramente reduzida nos animais que foram previamente vacinados com as células B16F10-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β em comparação aos animais controle (PBS) aos 29 dias. Ao realizar a necropsia de um camundongo controle aos 29 dias, observamos que o tumor estava disseminado por todo o pulmão (FIG 5.4.). Nos dias 15 e 21, observamos captação de [^{18}F] FDG na bexiga, cérebro e, em alguns animais, na mandíbula, independente do tratamento com a vacina.

Figura 5.4 - Imagens PET/CT representativas dos resultados do Modelo Profilático de Imunoterapia. Animais C57BL/6 previamente vacinados com as células B16 transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β ou, controle (PBS), e inoculados intravenosamente com 5×10^5 células B16F10-TK, foram administrados via i.v. com 22,2MBq de [^{18}F] FDG ao final de 15, 21 e 29 dias. 60 minutos após a injeção do [^{18}F] FDG os animais foram anestesiados com isoflurano, colocados na câmara de escaneamento e analisados no microPET/CT (microPET Albira). A figura apresenta a sobreposição da imagem obtida por PET e CT (cinza) nos dias 15, 21 e 29. No dia 29 é apresentada uma foto do pulmão representativo do grupo controle. N=3 por grupo.

Fonte: autora da dissertação.

O peso dos animais também foi acompanhado ao longo do experimento. Não se verificaram diferenças significativas entre a perda de peso dos grupos controle e vacinados aos 21 e 29 dias pós inoculação das células tumorais B16F10-TK (FIG. 5.5).

Figura 5.5 – Peso dos animais aos 21 e 29 dias de tratamento profilático. Animais C57BL/6 previamente vacinados com as células B16 transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β ou, controle (PBS), e, inoculados intravenosamente com 5×10^5 células B16F10-TK, foram pesados após 21 e 29 dias. O gráfico apresenta a média $\pm$ desvio padrão, n=5.

Fonte: autora da dissertação.

Concluiu-se que a administração de apenas 1 dose da vacina, levou apenas a uma pequena redução do crescimento metastático de células de melanoma murino.

5.4.4 MODELO TERAPÊUTICO DE IMUNOTERAPIA

O modelo de imunoterapia terapêutica iniciou-se pela administração de 5×10^5 células B16F10-TK por via intravenosa em animais C57BL/6. Ao final de 3 e 10 dias, os animais foram inoculados subcutâneamente com as células B16F10-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β . A eficácia do tratamento no crescimento de metástase pulmonares foi avaliada por imageamento no μ PET/CT com uso do radiofármaco [18 F]-FDG e pela contagem dos nódulos tumorais no pulmão após necropsia dos animais. Na FIG 5.6, verificamos que o [18 F] FDG não foi capaz de detectar

precocemente as lesões metastáticas no pulmão dos animais controle e tratados com a vacina (dia 8). Ao final de 8 e 16 dias os animais tratados com a vacina ou controle foram eutanasiados e foi realizada a necropsia dos mesmos. O número de lesões metastáticas nos pulmões foi contado visualmente com lupa e pudemos verificar um aumento significativo de lesões tumorais (aos 16 dias) nos animais controle (PBS) em comparação com os animais que receberam o tratamento com a vacina contendo os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β (FIG. 5.6. e 5.7.). Foi também interessante observar um aumento no tamanho do timo dos animais que receberam a vacina (FIG. 5.6.). Além do mais, foi possível notar a presença de metástases no fígado dos animais controle e um baço ligeiramente aumentado e mais escuro em comparação com os animais tratados com a vacina (dados não mostrados). O peso dos animais também foi acompanhado ao longo do tratamento tendo-se verificado uma diminuição do peso dos animais tratados ao final de 16 dias em comparação com os animais controle (FIG 5.8). Conclui-se assim que o modelo terapêutico apresentou resultados promissores na verificação da eficácia da vacina em estimular o sistema imunológico na eliminação das células tumorais e em conter a progressão da doença.

Figura 5.6 - Imagens PET/CT-3D representativas dos resultados do Modelo Terapêutico de Imunoterapia. Animais C57BL/6 que previamente foram inoculados intravenosamente com 5×10^5 células B16F10-TK e após receberem ou não tratamento, foram administrados via i.v. com 22,2MBq de [^{18}F] FDG ao final de 8 e 16 dias. 60 minutos após a injeção do [^{18}F] FDG os animais foram anestesiados com isoflurano por inalação, colocados na câmara de escaneamento e analisados no microPET/CT (microPET Albira). A figura apresenta a sobreposição da imagem obtida por PET e CT (cinza) no dia 8. No dia 8 e 16 são apresentadas fotos representativas do pulmão e timo dos grupo controle e vacinados. N=4 por grupo.

Fonte: autora da dissertação.

Figura 5.7 - Contagem do número de lesões metastáticas no modelo de vacinação terapêutica. 5×10^5 células B16-TK foram administradas intravenosamente em animais C57bl/6. 3 e 10 dias após, as células B16 transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β ou PBS (controle) foram inoculadas subcutaneamente nesses mesmos camundongos. Após 8 dias e 16 dias, os animais foram sacrificados, os pulmões removidos e número de nódulos metastáticos contados. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão, n=3. *p>0,05.

Fonte: autora da dissertação.

Figura 5.8 - Peso dos animais aos 21 e 29 dias de tratamento terapêutico.

Animais C57BL/6 previamente inoculados com as células B16-TK foram vacinados subcutâneamente com as células B16-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β ou, controle (PBS). No final de 8 e 16 dias os animais foram pesados. O gráfico apresenta a média $\pm$ desvio padrão, n=3. *p>0,05.

Fonte: autora da dissertação.

5.4.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS PULMÕES

De forma a confirmar os dados obtidos anteriormente em relação à eficácia da vacina terapêutica, os pulmões excisados dos animais ao final de 8 e 16 dias de tratamento foram analisados histopatologicamente.

Nas análises por H&E podemos observar que ao final de 8 dias o pulmão dos animais controle (PBS) apresentaram um parênquima pulmonar parcialmente preservado (FIG 5.9A). Estes pequenos focos tumorais apresentaram células pleomórficas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e raras figuras de mitose (*). O tecido pulmonar apresentou-se reativo com espessamento de septos, infiltrado inflamatório e descontinuidade de alvéolos. Por outro lado, ao final de 8 dias de tratamento com a vacina das células B16-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β (FIG. 5.9B), o parênquima pulmonar encontrou-se mais preservado com a presença de colônias tumorais metastáticas mais difundidas pelas zonas peribronquiolares. O tecido pulmonar apresentou-se reativo com espessamento de septos e infiltrado inflamatório.

Ao final de 16 dias (duas semanas), o parênquima pulmonar dos animais controle (FIG. 5.9C) encontrou-se amplamente infiltrado por diversos focos metastáticos de tamanhos irregulares (*). O tecido pulmonar apresentou-se reativo com espessamento de septos, infiltrado inflamatório, descontinuidade de alvéolos e raras zonas hemorrágicas no espaço alveolar. Na presença da vacina terapêutica (FIG. 5.9D), o pulmão apresentou massas pontuais tumorais metastáticas (*). O tecido pulmonar apresentou-se pouco reativo e com pouca descontinuidade de alvéolos.

Figura 5.9 – Histologia do tecido pulmonar com coloração H&E em animais C57BL/6 inoculados intravenosamente com as células B16-TK e vacinados terapeuticamente com as células B16-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β ou, controle (PBS) ao final de 1 ou 2 semanas. Imagens representativas são apresentadas.

Fonte: autora da dissertação.

A quantificação do número de massas metastáticas por campo observadas por H&E demonstrou que os camundongos que receberam a vacina terapêutica apresentaram um menor número de metástases que os animais controle (PBS) (FIG. 5.10.).

Figura 5.10 – Quantificação do número de focos metastáticos por com coloração H&E no tecido pulmonar de animais C57BL/6 inoculados intravenosamente com as células B16-TK e vacinados terapeuticamente com as células B16-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β ou, controle (PBS) ao final de 1 ou 2 semanas. O gráfico apresenta a média $\pm$ desvio padrão, n=3. *p>0,05.

Fonte: autora da dissertação.

Nas análises histoquímicas, a melanina presente no tecido pulmonar foi evidenciada com a coloração de Fontana-Masson, a qual variou de marrom-escura a negra (FIG 5.11.). Podemos observar que ao final de 8 dias o pulmão dos animais controle (PBS) apresentam pequenas massas tumorais com pigmento melânico (*) (FIG 5.11A). No caso de animais tratados por 8 dias com a vacina das células B16F10-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β (FIG. 5.11B), o tecido pulmonar evidencia pouquíssimos pigmentos melânicos. Ao final de 16 dias (duas semanas), o parênquima pulmonar dos animais controle (FIG. 5.11C) apresentou uma intensa presença de pigmento melânico por campo (*). Na presença da vacina terapêutica (FIG. 5.11D), o tecido pulmonar continha pigmento melânico em quantidade moderada por campo (*). A quantificação da percentagem de melanina revelou que os camundongos tratados com a vacina das células B16-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β reduziram a quantidade de células tumorais presentes no tecido pulmonar em comparação com o controle (PBS) (FIG 5.12.).

Figura 5.11 – Coloração de Fontana-Masson do tecido pulmonar de animais C57BL/6 inoculados intravenosamente com as células B16F10-TK e vacinados terapeuticamente com as células B16F10-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β ou, controle (PBS) ao final de 1 ou 2 semanas. Os asteriscos amarelos chamam atenção para os focos tumorais.

Fonte: autora da dissertação.

Figura 5.12 - Quantificação do número de focos metastáticos por com coloração de Fontana-Masson no tecido pulmonar de animais C57BL/6 inoculados intravenosamente com as células B16-TK e vacinados terapeuticamente com as células B16-TK transduzidas com os vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β ou, controle (PBS) ao final de 1 ou 2 semanas. O gráfico apresenta a média $\pm$ desvio padrão, n=3. * $p > 0.05$, *** $p > 0.001$.

Fonte: autora da dissertação.

5.5 Conclusões

Pôde-se avaliar a eficácia da vacina no modelo de metástase, observando-se o número de lesões metastáticas nos pulmões dos animais. O modelo terapêutico, com a administração de duas doses da vacina e iniciando o tratamento precocemente, apresentou resultados promissores na verificação da eficácia da vacina em estimular o sistema imunológico na eliminação das células tumorais e em conter a progressão da doença.

5.6 Referências bibliográficas

AGARWALA, S. S. Current systemic therapy for metastatic melanoma. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 9, n. 5, p. 587-95, May 2009. ISSN 1744-8328. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445576> >.

ALAUDDIN, M. M. Positron emission tomography (PET) imaging with (18)F-based radiotracers. **Am J Nucl Med Mol Imaging**, v. 2, n. 1, p. 55-76, 2012. ISSN 2160-8407. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133802> >.

ALAUDDIN, M. M.; CONTI, P. S. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG): a new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET. **Nucl Med Biol**, v. 25, n. 3, p. 175-80, Apr 1998. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620620> >.

ALAUDDIN, M. M. et al. 9-[(3-[18F]-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([18F]-FHPG): a potential imaging agent of viral infection and gene therapy using PET. **Nucl Med Biol**, v. 23, n. 6, p. 787-92, Aug 1996. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940722> >.

ALAUDDIN, M. M.; GELOVANI, J. G. Novel Reporter Probes for HSV1-tk Gene Expression. In: INFORMA HEALTHCARE USA, I. (Ed.). **Molecular Imaging in Oncology**. New York, 2008. chap. 26, p.405-428.

ALAUDDIN, M. M. et al. Preclinical evaluation of the penciclovir analog 9-(4-[(18)F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine for in vivo measurement of suicide gene expression with PET. **J Nucl Med**, v. 42, n. 11, p. 1682-90, Nov 2001. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696640> >.

_____. Evaluation of 9-[(3-¹⁸F-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([¹⁸F]-FHPG) in vitro and in vivo as a probe for PET imaging of gene incorporation and expression in tumors. **Nucl Med Biol**, v. 26, n. 4, p. 371-6, May 1999. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10382839> >.

APALLA, Z. et al. Epidemiological trends in skin cancer. **Dermatol Pract Concept**, v. 7, n. 2, p. 1-6, Apr 2017. ISSN 2160-9381. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28515985> >.

BAJGELMAN, M. et al. AAVPG: A vigilant vector where transgene expression is induced by p53 **Virology**, v. In press, 2013.

BAJGELMAN, M. C.; COSTANZI-STRAUSS, E.; STRAUSS, B. E. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. **J Biotechnol**, v. 103, n. 2, p. 97-106, Jun 2003. ISSN 0168-1656. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814868> >.

BAJGELMAN, M. C.; STRAUSS, B. E. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 8-13, Feb 2008. ISSN 0042-6822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076963> >.

BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatol Res Pract**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-6113. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936153> >.

CACHIN, F. et al. (123)I-BZA2 as a melanin-targeted radiotracer for the identification of melanoma metastases: results and perspectives of a multicenter phase III clinical trial. **J Nucl Med**, v. 55, n. 1, p. 15-22, Jan 2014. ISSN 1535-5667. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263087> >.

CHANG, C. W. et al. A high yield robotic synthesis of 9-(4-[¹⁸F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([¹⁸F]FHBG) and 9-[3-[¹⁸F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine([¹⁸F] FHPG) for gene expression imaging. **Appl Radiat Isot**, v. 65, n. 1, p. 57-63, Jan 2007. ISSN 0969-8043. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16916606> >.

COTRAN, R. **Fundamentos de Patologia** 2000.

EGGERMONT, A. M. et al. Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1189-96, Oct 2005. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198768> >.

_____. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. **Lancet**, v. 372, n. 9633, p. 117-26, Jul 2008. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620949> >.

EL-ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **J Control Release**, v. 94, n. 1, p. 1-14, Jan 2004. ISSN 0168-3659. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14684267> >.

ELSINGA, P. H. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. **Methods Academic Press**, v. 27, p. 208–217, 2002.

ELSINGA, P. H. et al. Synthesis and evaluation of [18F]fluoroethyl SA4503 as a PET ligand for the sigma receptor. **Synapse**, v. 43, n. 4, p. 259-67, Mar 2002. ISSN 0887-4476. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835521> >.

GALLAGHER, B. M. et al. Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. **J Nucl Med**, v. 19, n. 10, p. 1154-61, Oct 1978. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/214528> >.

GAMBHIR, S. S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 9, p. 683-93, Sep 2002. ISSN 1474-175X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209157> >.

GAMBHIR, S. S. et al. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 5, p. 2333-8, Mar 1999. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10051642> >.

_____. Imaging of adenoviral-directed herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene expression in mice with radiolabeled ganciclovir. **J Nucl Med**, v. 39, n. 11, p. 2003-11, Nov 1998. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829598> >.

_____. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 6, p. 2785-90, Mar 2000. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716999> >.

GARBE, C. et al. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **Oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5-24, 2011. ISSN 1549-490X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212434> >.

GOPAL; B.; SAHA. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. Fourth edition. 1998.

GRIERSON, J. R.; SHIELDS, A. F. Radiosynthesis of 3'-deoxy-3'-[(18F]fluorothymidine: [(18F]FLT for imaging of cellular proliferation in vivo. **Nucl Med Biol**, v. 27, n. 2, p. 143-56, Feb 2000. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773543> >.

GUO, Y. et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 40, n. 5, p. 426-36, May 2008. ISSN 1745-7270. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18465028> >.

HABERKORN, U. et al. Monitoring gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase in hepatoma cells: uptake of specific substrates. **J Nucl Med**, v. 38, n. 2, p. 287-94, Feb 1997. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9025757> >.

_____. Ganciclovir uptake in human mammary carcinoma cells expressing herpes simplex virus thymidine kinase. **Nucl Med Biol**, v. 25, n. 4, p. 367-73, May 1998. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639298> >.

HALL, H. I. et al. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. **J Am Acad Dermatol**, v. 40, n. 1, p. 35-42, Jan 1999. ISSN 0190-9622. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922010> >.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, v. 363, n. 8, p. 711-23, Aug 2010. ISSN 1533-4406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525992> >.

[HTTP://WWW.IARC.FR/](http://www.iarc.fr/). IARC

International Agency For Research On Cancer. World Health Organization 2010.

INCA, B. M. D. S. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil.**, Rio de Janeiro, 2016. Accessed on: 20.08.2017.

ISHIMORI, T. et al. 18F-FDG and 11C-methionine PET for evaluation of treatment response of lung cancer after stereotactic radiotherapy. **Ann Nucl Med**, v. 18, n. 8, p. 669-74, Dec 2004. ISSN 0914-7187. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15682847> >.

IYER, M. et al. 8-[18F]Fluoropenciclovir: an improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET. **J Nucl Med**, v. 42, n. 1, p. 96-105, Jan 2001. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11197989> >.

JACOBS, A. et al. Quantitative kinetics of [124I]FIAU in cat and man. **J Nucl Med**, v. 42, n. 3, p. 467-75, Mar 2001. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337525> >.

_____. Positron-emission tomography of vector-mediated gene expression in gene therapy for gliomas. **Lancet**, v. 358, n. 9283, p. 727-9, Sep 2001. ISSN 0140-6736. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11551583> >.

KANG, S. H. et al. Comparison of two full automatic synthesis methods of 9-(4-[(18)F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine using different chemistry modules. **Appl Radiat Isot**, v. 67, n. 10, p. 1758-63, Oct 2009. ISSN 1872-9800. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553130> >.

KATSAMBAS, A.; NICOLAIDOU, E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. **Arch Dermatol**, v. 132, n. 4, p. 444-50, Apr 1996. ISSN 0003-987X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8629849> >.

KAY, M. A.; GLORIOSO, J. C.; NALDINI, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nat Med**, v. 7, n. 1, p. 33-40, Jan 2001. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135613> >.

KELLY, J. W. Melanoma in the elderly--a neglected public health challenge. **Med J Aust**, v. 169, n. 8, p. 403-4, Oct 1998. ISSN 0025-729X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830382> >.

KIRKWOOD, J. M. et al. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 1, p. 7-17, Jan 1996. ISSN 0732-183X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558223> >.

KUMAR, R. et al. 18F-FDG PET for evaluation of the treatment response in patients with gastrointestinal tract lymphomas. **J Nucl Med**, v. 45, n. 11, p. 1796-803, Nov 2004. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534046> >.

KURUPPU, D. et al. Molecular imaging with bioluminescence and PET reveals viral oncolysis kinetics and tumor viability. **Cancer Res**, v. 74, n. 15, p. 4111-21, Aug 2014. ISSN 1538-7445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876106> >.

LARSON, S. M.; TJUVAJEV, J.; BLASBERG, R. Triumph over mischance: a role for nuclear medicine in gene therapy. **J Nucl Med**, v. 38, n. 8, p. 1230-3, Aug 1997. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9255156> >.

LIU, J. et al. Early stem cell engraftment predicts late cardiac functional recovery: preclinical insights from molecular imaging. **Circ Cardiovasc Imaging**, v. 5, n. 4, p. 481-90, Jul 2012. ISSN 1942-0080. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22565608> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

MACLENNAN, R. et al. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. **J Natl Cancer Inst**, v. 84, n. 18, p. 1427-32, Sep 1992. ISSN 0027-8874. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1512795> >.

MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Lett**, v. 583, n. 24, p. 3966-73, Dec 2009. ISSN 1873-3468. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850042> >.

MARTINEZ-QUINTANILLA, J. et al. Therapeutic efficacy and fate of bimodal engineered stem cells in malignant brain tumors. **Stem Cells**, v. 31, n. 8, p. 1706-14, Aug 2013. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389839> >.

MASCHAUER, S. et al. Characterization of 18F-FDG uptake in human endothelial cells in vitro. **J Nucl Med**, v. 45, n. 3, p. 455-60, Mar 2004. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001687> >.

MCKIBBIN, T. Melanoma: understanding relevant molecular pathways as well as available and emerging therapies. **Am J Manag Care**, v. 21, n. 10 Suppl, p. S224-33, Sep 2015. ISSN 1936-2692. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26619296> >.

MEDRANO, R. F. V. **Investigação da resposta imunológica antitumoral induzida por células B16F10 tratadas pela combinação p19Arf e Interferon-beta em um modelo de vacinação profilático para melanoma murino**. 2013. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências., Universidade de São Paulo

MERKEL, C. A. et al. Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. **BMC Cancer**, v. 10, p. 316, 2010. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20569441 >.

_____. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo. **Cancer Gene Ther**, v. 20, n. 5, p. 317-25, May 2013. ISSN 1476-5500 (Electronic) 0929-1903 (Linking).

MEŠČIĆ, A. et al. Synthesis and biological evaluation of a new acyclic pyrimidine derivative as a probe for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8535-49, Jul 2013. ISSN 1420-3049. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877048> >.

MIN, J. J.; IYER, M.; GAMBHIR, S. S. Comparison of [18F]FHBG and [14C]FIAU for imaging of HSV1-tk reporter gene expression: adenoviral infection vs stable transfection. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 30, n. 11, p. 1547-60, Nov 2003.

ISSN 1619-7070. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14579096>>.

NAJJAR, A. M. et al. Molecular-genetic PET imaging using an HSV1-tk mutant reporter gene with enhanced specificity to acycloguanosine nucleoside analogs. **J Nucl Med**, v. 50, n. 3, p. 409-16, Mar 2009. ISSN 0161-5505. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223410>>.

NAMAVARI, M. et al. Synthesis of 8-[(18)F]fluoroguanine derivatives: in vivo probes for imaging gene expression with positron emission tomography. **Nucl Med Biol**, v. 27, n. 2, p. 157-62, Feb 2000. ISSN 0969-8051. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773544>>.

PEHAMBERGER, H. et al. Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 4, p. 1425-9, Apr 1998. ISSN 0732-183X. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9552047>>.

PEÑUELAS, I. et al. Positron emission tomography and gene therapy: basic concepts and experimental approaches for in vivo gene expression imaging. **Mol Imaging Biol**, v. 6, n. 4, p. 225-38, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 1536-1632. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262238>>.

_____. Gene therapy imaging in patients for oncological applications. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 32 Suppl 2, p. S384-403, Dec 2005. ISSN 1619-7070. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16180032>>.

_____. Positron emission tomography imaging of adenoviral-mediated transgene expression in liver cancer patients. **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p. 1787-95, Jun 2005. ISSN 0016-5085. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15940613>>.

PHAN, G. Q. et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8372-7, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826605>>.

PIMLOTT, S. L.; SUTHERLAND, A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. **Chem Soc Rev**, v. 40, n. 1, p. 149-62, Jan 2011. ISSN 1460-4744. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818455>>.

PONDE, D. E. et al. Rapid and reproducible radiosynthesis of [18F] FHBG. **Nucl Med Biol**, v. 31, n. 1, p. 133-8, Jan 2004. ISSN 0969-8051. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741578>>.

RADOVIĆ-KOVACEVIĆ, V. et al. [Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma]. **Srp Arh Celok Lek**, v. 125, n. 5-6, p. 132-7, 1997 May-Jun 1997. ISSN 0370-8179. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9265233>>.

RIBEIRO, A. H. **Transferência gênica de p19Arf e interferon-B em células de melanoma**. 2011. (Mestrado). Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia., Universidade de São Paulo

SAHA; GOPAL; B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. Fourth edition 1998.

SCHADENDORF, D. et al. Advances and perspectives in immunotherapy of melanoma. **Ann Oncol**, v. 23 Supl 10, p. x104-8, Sep 2012. ISSN 1569-8041. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987943> >.

SERGANOVA, I.; PONOMAREV, V.; BLASBERG, R. Human reporter genes: potential use in clinical studies. **Nucl Med Biol**, v. 34, n. 7, p. 791-807, Oct 2007. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17921031> >.

SHAH, K. et al. Molecular imaging of gene therapy for cancer. **Gene Ther**, v. 11, n. 15, p. 1175-87, Aug 2004. ISSN 0969-7128. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141158> >.

SHIUE, G. G. et al. A simplified one-pot synthesis of 9-[(3-[18F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([18F]FHPG) and 9-(4-[18F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG) for gene therapy. **Nucl Med Biol**, v. 28, n. 7, p. 875-83, Oct 2001. ISSN 0969-8051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578910> >.

SOGHOMONYAN, S. et al. Molecular PET imaging of HSV1-tk reporter gene expression using [18F]FEAU. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 416-23, 2007. ISSN 1750-2799. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406603> >.

SOLS, A.; CRANE, R. K. Substrate specificity of brain hexokinase. **J Biol Chem**, v. 210, n. 2, p. 581-95, Oct 1954. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13211595> >.

STONE-ELANDER, S. et al. Microwaving in F-18 chemistry: quirks and tweaks. **Ernst Schering Res Found Workshop**, n. 62, p. 243-69, 2007. ISSN 0947-6075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172158> >.

STRAUSS, B. E.; COSTANZI-STRAUSS, E. Gene Therapy for Melanoma: Progress and Perspectives. In: (Ed.). **Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**: INTECH chap. 12, p.283-317.

_____. pCLPG: a p53-driven retroviral system. **Virology**, v. 321, n. 2, p. 165-72, Apr 10 2004. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15051377 >.

SU, H. et al. Quantitation of cell number by a positron emission tomography reporter gene strategy. **Mol Imaging Biol**, v. 6, n. 3, p. 139-48, 2004 May-Jun

2004. ISSN 1536-1632. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193248> >.

TG; TERAPIAGENICA.NET.BR. Laboratório de Vetores Virais Centro de Investigação Translacional em Oncologia Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. **Recursos Educacionais: Estratégias de terapia gênica voltadas para o câncer.**, São Paulo, 2011. Available at: < <http://www.terapiagenica.net.br/> >. Accessed on: 15.01.2015.

TJUVAJEV, J. G. et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. **Cancer Res**, v. 58, n. 19, p. 4333-41, Oct 1998. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766661> >.

_____. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression. **J Nucl Med**, v. 43, n. 8, p. 1072-83, Aug 2002. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163634> >.

_____. Noninvasive imaging of herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method for monitoring clinical gene therapy. **Cancer Res**, v. 56, n. 18, p. 4087-95, Sep 1996. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797571> >.

_____. Imaging the expression of transfected genes in vivo. **Cancer Res**, v. 55, n. 24, p. 6126-32, Dec 1995. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521403> >.

TSENG, J. et al. 18F-FDG kinetics in locally advanced breast cancer: correlation with tumor blood flow and changes in response to neoadjuvant chemotherapy. **J Nucl Med**, v. 45, n. 11, p. 1829-37, Nov 2004. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534051> >.

UONG, A.; ZON, L. I. Melanocytes in development and cancer. **J Cell Physiol**, v. 222, n. 1, p. 38-41, Jan 2010. ISSN 1097-4652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795394> >.

VALLABHAJOSULA, S. **Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT**. Berlin: 2009.

VAN DER RHEE, H. J. et al. Increase in and stabilization of incidence and mortality of primary cutaneous malignant melanoma in Western Netherlands, 1980-95. **Br J Dermatol**, v. 140, n. 3, p. 463-7, Mar 1999. ISSN 0007-0963. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233267> >.

VAZQUEZ, V. E. L. et al. Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 4, Jan 2015. ISSN 1756-0500. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592837> >.

WANG, J. Q. et al. Novel radiosynthesis of PET HSV-tk gene reporter probes [18F]FHPG and [18F]FHBG employing dual Sep-Pak SPE techniques. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, n. 22, p. 3933-8, Nov 2003. ISSN 0960-894X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592478> >.

WINKELMANN, C. T. et al. Microimaging characterization of a B16-F10 melanoma metastasis mouse model. **Mol Imaging**, v. 5, n. 2, p. 105-14, 2006 Apr-Jun 2006. ISSN 1535-3508. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954024> >.

WOLCHOK, J. D. et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 2, p. 155-64, Feb 2010. ISSN 1474-5488. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004617> >.

WU; HAITAO. **Radiosynthesis of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)-guanine ([18F]FHBG)**. FALGUNI, B. Rockville.

YAGHOUBI, S. et al. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [(18)F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. **J Nucl Med**, v. 42, n. 8, p. 1225-34, Aug 2001. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483684> >.

YAGHOUBI, S. S. et al. Positron emission tomography reporter genes and reporter probes: gene and cell therapy applications. **Theranostics**, v. 2, n. 4, p. 374-91, 2012. ISSN 1838-7640. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509201> >.

_____. Preclinical safety evaluation of 18F-FHBG: a PET reporter probe for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk's expression. **J Nucl Med**, v. 47, n. 4, p. 706-15, Apr 2006. ISSN 0161-5505. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595506> >.

YAGHOUBI, S. S.; GAMBHIR, S. S. Measuring herpes simplex virus thymidine kinase reporter gene expression in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 2137-42, 2006a. ISSN 1750-2799. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17487205> >.

_____. PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk reporter gene expression in mice and humans using [18F]FHBG. **Nat Protoc**, v. 1, n. 6, p. 3069-75, 2006b. ISSN 1750-2799. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406570> >.

YAGHOUBI, S. S. et al. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with 18F-FHBG PET in a patient with glioma. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 6, n. 1, p. 53-8, Jan 2009. ISSN 1743-4262. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015650> >.

CAPÍTULO 6

Conclusões finais e sugestões para pesquisas futuras

6.1 Conclusões finais

- Uma síntese radioquímica manual conveniente do radiofármaco [^{18}F] FHBG foi padronizada. A síntese radioquímica produziu FHBG marcado com flúor-18 em quantidades e pureza radioquímica adequada para os estudos *in vitro* e *in vivo* por Tomografia por Emissão de Pósitrons. O radiofármaco formulado, adequado para injeção, com uma atividade específica entre 0,14GBq/ μmol - 0,21GBq/ μmol , foi obtido em um tempo de síntese que variou entre 80- 150 min, incluindo a etapa de purificação.
- Estudos de captação *in vitro* com o [^{18}F] FHBG, revelaram uma acumulação de radioatividade cerca de 4 vezes maior em células que expressam TK (B16-TK e LLC-TK) em comparação com as células controle GFP. O [^{18}F] FDG apenas acumulou cerca de duas vezes mais radioatividade em células TK do que em células que expressam GFP. Quando os dois radiofármacos foram comparados os resultados indicaram que o [^{18}F] FHBG é mais seletivo do que o [^{18}F] FDG para distinguir células que expressam a enzima TK, desta forma, o [^{18}F] FHBG

mostrou-se também ser mais adequado para imageamento de infecção viral em células transduzidas com a proteína TK, em terapia gênica.

- A detecção de tumores em modelo animal de metástase pulmonar com o [^{18}F] FDG ocorreu a partir de 15 dias do estabelecimento das lesões. No entanto, nos estudos *in vivo* com [^{18}F] FHBG, houve captação apenas na região intestinal, durante as três semanas em que os animais foram acompanhados. Possivelmente o [^{18}F] FHBG sintetizado com a atividade com a qual foi possível trabalhar manualmente não foi obtido com atividade específica ideal para os estudos de imagem *in vivo*.
- Pôde-se avaliar a eficácia da vacina no modelo de metástase, observando-se o número de lesões metastáticas nos pulmões dos animais. O modelo terapêutico, com a administração de duas doses da vacina e iniciando o tratamento precocemente, conferiu redução do tamanho dos focos metastáticos aos animais tratados.

6.2 Sugestões para pesquisas futuras

As sugestões para pesquisas futuras envolvendo o radiofármaco [^{18}F] FHBG são:

- Padronizar uma síntese mais simplificada, rápida e reprodutível para a produção automatizada de rotina de [^{18}F] FHBG no Centro de Radiofarmácia do IPEN.
- Realizar estudos de biodistribuição em animais sadios e em animais com modelo tumoral de metástase pulmonar.
- Utilizar o [^{18}F] FHBG, como uma importante ferramenta de investigação de novas formas de terapias para melanoma metastático.

- Demonstrar que a vacina derivada de células B16F10 projetadas para co-expressar vetores adenovirais AdRGDPGp19Arf e AdRGDPGIFN β fornecerão um mecanismo para eventualmente eliminar, seletivamente as células tumorais. Utilizar o sistema [^{18}F]-FHBG-PET, para investigar a prevenção da formação de metástases e/ou a redução no tamanho dos focos metastáticos após a imunoterapia.

As sugestões para pesquisas futuras envolvendo a imunoterapia:

- Investigar e comprovar os mecanismos de ação da imunoterapia envolvendo a combinação p19Arf e IFN β no modelo murino de metástase pulmonar.

**ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE BIOSSEGURANÇA
– INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

Comissão Interna de Biossegurança

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS A SER EXECUTADO NESTE INSTITUTO

1. **Título do projeto de pesquisa:** Uso da Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) para identificação precoce de metástases e investigação da eficácia terapêutica da combinação p19Arf e Interferon-beta em melanoma murino.
2. **Organismo doador (organismo doador da sequência de DNA/RNA que será introduzida por engenharia genética no organismo receptor):** *Mus musculus*, *Aequorea victoria*, *vírus herpes simplex*.
3. **Organismo receptor ou parental (organismo que recebe o material genético do organismo doador):** Linhagem de melanoma murino (B16F10), camundongo C57BL/6.
4. **Material genético incluído no organismo geneticamente modificado (sequência de RNA/DNA inserida no organismo receptor- ID do Gene):** Sequência codificante dos genes Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A murino (CDKN2A, p19Alternate Reading Frame, p19Arf, NCBI Gene ID:12578), interferon beta murino (IFN β , NCBI Gene ID:15977), Green fluorescent protein (enhanced Green fluorescent protein, eGFP, U55762, da *Aequorea victoria*), timidina quinase (TK, HSV-TK, Thymidine Kinase, timidina Kinase, Gene ID 2703374).

5. Vetor (agente carreador): Vetor adenoviral não replicativo do sorotipo 5, com adição dos resíduos RGD no Knob fiber e deleção dos genes E1 e E3 (AdRGDPGeGFP, AdRGDPGp19, AdRGDPGIFNb, AdRGDPGp19IRESIFNb) ou vetor retroviral não replicativo baseado em Moloney Murine Leukemia virus (pCL, pCL-TK).

6. Classificação do organismo geneticamente modificado: Grupo I - Ressaltamos que depois de prontos os OGMs do presente trabalho (Linhagem repórter-células B16F10-TK e vacina anti-tumoral- livre de partículas virais) não apresentam riscos, o vírus não replica, não tem expressão de genes virais e que o gene de interesse não apresenta perigo, assim justificando, os trabalhos com a manipulação das células para injeção e ensaios *in vivo* na sala 103 (NB-1) do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), CQB 0067/98.

7. Resumo do projeto:

O presente trabalho consiste na preparação do radiofármaco [^{18}F]-FHBG, que identificará com precisão a presença de células geneticamente modificadas para expressar a proteína timidina quinase (TK, derivado do *Herpes Simplex Virus*) e esta abordagem será empregada para detectar metástases e monitorar o efeito terapêutico após ministração de uma imunoterapia. Este estudo caracteriza o [^{18}F]-FHBG como um novo e potencial radiofármaco para PET e o compara ao [^{18}F]FDG em um modelo de melanoma metastático murino.

A imunoterapia envolve a transferência genica *ex vivo* de p19Arf e interferon-beta para células tumorais, etapa que será realizada no Laboratório de Vetores Virais do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO)- Instituto do Câncer do estado de São Paulo (CTO-ICESP/FMUSP-SP)-CQB: 0084/98).

O transporte dos OGMs, entre o ICESP e o IPEN, será realizado utilizando contenção secundária a prova de vazamento, devidamente fechada e rotulada, e este contêiner condicionado em caixa rígida, fechada e identificada com símbolo de risco biológico e dados do responsável.

Os trabalhos com o preparo das células para injeção e ensaios *in vivo* em camundongo C57BL/6, ocorrerão na sala 103 (NB-1) do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), CQB 0067/98. As células da vacina serão lisadas por 3 ciclos de congela e descongela em nitrogênio líquido e ressuspensas em 100 µL de PBS1x. Já as células da linhagem celular tumoral serão apenas ressuspensas em 100 µL de PBS1x. Estas condições foram derivadas das estabelecidas previamente no LVV (Ruan Medrano, dissertação de Mestrado, dados não publicados).

Posteriormente serão administrados os radiofármacos os quais permitirão o acompanhamento em tempo real da eficácia e segurança da nova imunoterapia. Com o apoio do [¹⁸F]-FHBG-PET, será investigada a prevenção da formação de metástases e/ou a redução no tamanho dos focos metastáticos após a imunoterapia.

8. Laboratório: Os trabalhos com o preparo das células para injeção e ensaios *in vivo* em camundongo C57BL/6, ocorrerão na sala 103 (NB-1) do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), CQB 0067/98.

9. Pesquisador principal: Emerson Soares Bernardes.

9. Outro pessoal envolvido: Maria Renata Valente Brandão Freire.

10. Observações de biossegurança: É importante resaltar que os OGMs do presente trabalho (células B16F10-TK e vacina anti-tumoral), não apresentam riscos, o vírus não replica, não tem expressão de genes virais e que o gene de interesse não apresenta perigo, justificando que os procedimentos de injeção destes materiais s.c em camundongos C57BL/6 sejam realizados em área certificada para trabalho em contenção NB-1. No caso do Centro de Biotecnologia (CB) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-CNEN/SP, esta área fica localizada no segundo piso, na sala 103. O acesso para esta área é restrita e somente é permitido a entrada de pessoas autorizadas. Autorização

requer treinamento e conhecimento dos manuais e protocolos utilizados na área. Informações e procedimentos estão fixados na porta de entrada. As superfícies de trabalho são descontaminadas com solução de hipoclorito antes e depois da realização dos procedimentos. Os EPIs exigidos incluem avental descartável, luvas, óculos de proteção, gorro e máscara. Todos os EPIs são de uso individual, para uso dentro da área NB-1 e com descarte dentro desta área. O manejo dos resíduos com OGMs devem obrigatoriamente seguir as fases de segregação, acondicionamento, identificação e destinação final definidos segundo a classificação de risco dos OGMs, bem como a característica do resíduo gerado (resíduos líquidos, sólidos, perfurocortantes, entre outros). Descarte dos EPIs será realizado em lixeira identificada como "lixo infectante". Rejeitos líquidos serão descontaminados antes de seu descarte por tratamento com hipoclorito de sódio. Resíduos sólidos serão autoclavados antes de seu descarte. O transporte dos OGMs, entre o ICESP e o IPEN, será realizado utilizando contenção secundária a prova de vazamento, devidamente fechada e rotulada, e este contêiner condicionado em caixa rígida, fechada e identificada com símbolo de risco biológico e dados do responsável.

002/2005

11. Assinatura do pesquisador principal:

Data:

12. Observações da CIBio:

13. Aprovação da CIBio:

Dra. Cibele Nunes Peroni

Dra. Regina Affonso

14. Assinatura do presidente da CIBio:

Data:

Dr..Patrick Jack Spencer

**ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE BIOSSEGURANÇA
– DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA E ONCOLOGIA DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.**

Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo

Comissão Interna de Biossegurança - CQB: 0084/98

Projeto de pesquisa envolvendo organismos geneticamente modificados

Para preenchimento pela secretaria

Data de entrega: ____/____/____

nº Protocolo ____-____

1. Título do projeto de pesquisa: USO DA TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS (PET) PARA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE METÁSTASES E INVESTIGAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA COMBINAÇÃO p19Arf E INTERFERON-BETA EM MELANOMA MURINO

2. Resumo do projeto: O melanoma maligno é um tipo de câncer com grande risco de produzir metástases e com altas taxas de mortalidade resultantes de diagnósticos tardios e falta de tratamentos eficazes. Ao longo dos últimos anos, a terapia gênica voltada para o câncer e o desenvolvimento de métodos capazes de visualizar processos moleculares e celulares ao longo da terapia, tem recebido especial atenção. Na atualidade, a imagem molecular tem sido amplamente utilizada na pesquisa, diagnóstico e tratamento do câncer. Um avanço importante em imagem molecular do câncer foi a introdução da Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), a qual proporciona maior resolução da imagem. O radiofármaco mais utilizado para diagnóstico em oncologia, e atualmente o único produzido no Brasil para PET, é o [18F]2 fluoro-2-deoxyglucose (18F-FDG). Todavia, a acumulação do 18F-FDG não é característica exclusiva de células tumorais, também pode estar presente em várias outras condições incluindo inflamações, infecções e outros processos benignos. Estudos recentes indicam que mesmo a combinação do 18F-FDG-PET e Tomografia Computadorizada (CT) não são ainda suficientemente sensíveis para detectar com segurança a presença de metástases e diferenciá-las de outros processos inflamatórios ou infecciosos. Sendo assim, propomos neste trabalho, a preparação e uso do radiofármaco [18F]-FHBG para identificar com precisão a presença de células geneticamente modificadas para expressar a proteína timidina quinase (TK, derivado do Herpes Simplex Virus) e esta abordagem será empregada para detectar metástases e monitorar o efeito terapêutico após ministração de uma imunoterapia. A imunoterapia envolve a transferência genica ex vivo de p19Arf e interferon-beta para células tumorais e a introdução destas no organismo para provocar uma resposta imunológica anti-tumoral. Com o apoio do [18F]-FHBG-PET, será investigada a prevenção da formação de metástases e/ou a redução no tamanho dos focos metastáticos após a imunoterapia. O presente trabalho visa a síntese do radiofármaco [18F]-FHBG (substrato de TK) no Centro de Radiofarmácia do IPEN, e cuja produção permitirá o acompanhamento em tempo real da

eficácia e segurança de uma nova imunoterapia. Cumpre ressaltar que a padronização da produção do radiofármaco [18F]-FHBG no IPEN representa a possibilidade real de produção e comercialização desse radiofármaco no futuro, uma vez que já é amplamente utilizado em estudos clínicos no exterior.

3. **Início Previsto: 01/06/2015** **Término Previsto: 31/05/2017**

4. **Organismo receptor (organismo que recebe o material genético do organismo doador):**

Linhagem de melanoma murino (B16F10), camundongo C57BL/6

5. **Organismo doador (organismo doador da sequência de DNA/RNA a ser introduzida no organismo receptor):**

Mus musculus, Aequorea victoria, virus herpes simples.

6. **Material genético incluído no organismo geneticamente modificado (sequência de RNA/DNA inserida no organismo receptor – ID do Gene):**

Sequência codificante dos genes Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A murino (CDKN2A, p19 Alternate Reading Frame, p19Arf, NCBI Gene ID: 12578), interferon beta murino (IFNb, NCBI Gene ID: 15977), Green fluorescent protein (enhanced green fluorescent protein, eGFP, U55762, da Aequorea victoria), timidina quinase (TK, HSV-TK, thymidine kinase, timidina kinase, Gene ID 2703374)

7. **Vetor (agente carreador):**

Vetor adenoviral não replicativo do sorotipo 5, com adição dos resíduos RGD no knob fiber e deleção dos gene E1 e E3 (AdRGDPGeGFP, AdRGDPGp19, AdRGDPGIFNb, AdRGDPGp19IRESIFNb) ou vetor retroviral não replicativo baseado em Moloney Murine Leukemia virus (pCL, pCLTK)

8. **Classificação do organismo geneticamente modificado:**

☐ Nível 1 (NBI)

☒ Nível 2 (NBII)

9. **Departamento ou Serviço no qual o projeto será desenvolvido:**

Procedimentos in vitro serão realizados no Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO)-Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Procedimentos in vivo serão realizados no Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), CQB 0067/98.

10. **Laboratório no qual o projeto será desenvolvido:**

Caso haja mais de um laboratório envolvido com o trabalho em contenção com OGM, indicar o número do CQB

Procedimentos in vitro serão realizados no Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO)-Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Procedimentos in vivo serão realizados no Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), CQB 0067/98.

11. Equipe de Pesquisa (citar função que ocupa):

Pesquisador Principal: Bryan Eric Strauss **função:** Coordenador de Pesquisa, Laboratório de Vetores Virais, Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO)-Instituto do Câncer do Estado de São Paulo). Pesquisador responsável.

Pesquisador Executante: Ruan Felipe Vieira Medrano **função:** Doutorando do programa de pós-graduação em oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Vetores Virais, Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO)-Instituto do Câncer do Estado de São Paulo)

Pesquisador (es) Executante (s): Emerson S. Bernardes, Maria Renata Valente Brandão Freire **função:** Pesquisadores do Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) que realizarão os ensaios in vivo.

12. Medidas de biossegurança envolvidas no processo (utilização de EPCs e EPIs, procedimento de descontaminação e descarte):

Procedimentos envolvendo OGM de classe de risco 2 serão realizados em área certificada para trabalho em contenção NB-2. Especificamente no caso do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, esta área está localizada no oitavo andar (Laboratório de Vetores Virais). Acesso para esta área é restrita e somente pessoas autorizadas são permitidas de entrar. Autorização requer treinamento e conhecimento dos manuais e protocolos utilizados na área. Sinalização e procedimentos são fixados na porta de entrada. A área possui ante-sala, que serve para paramentação e desparamentação, e duas salas de cultura. Em todas as áreas, as bancadas são impermeáveis a água e são resistentes a ácidos, álcalis, solventes e calor moderado e são facilmente acessadas para limpeza. As superfícies de trabalho são descontaminadas com solução de hipoclorito antes e depois de realização de procedimentos. Os OGMs são manipulados em cabines de segurança biológicas, tipo II, Classe A, que são irradiadas com luz UV antes e após os procedimentos. Os EPIs exigidos incluem avental descartável, luvas, óculos de proteção, gorro e máscara. Todos os EPIs são de uso individual, dedicados para uso dentro da área NB-2 e com descarte dentro desta área. Descarte dos EPIs é realizado em lixeira identificada como 'lixo-infectante'. Rejeitos líquidos são descontaminados antes de seu descarte por tratamento com

hipoclorito de sódio. Resíduos sólidos são tratados com autoclavagem antes de seu descarte, um processo facilitado pelo uso do 'pass-through' que conecta a área NB-2 com a sala de autoclave. Quando necessário, transporte de OGMs, sendo dentro do Instituto do Câncer ou entre o Instituto do Câncer e o Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), será realizado utilizando contenção secundária a prova de vazamento, devidamente fechado e rotulado, e este contêiner condicionado em caixa rígida, fechada e identificada com símbolo de risco biológico e dados do responsável. Em caso de acidente envolvendo exposição ao OGM pelo operador, esta pessoa será atendida pelo pronto socorro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo.

13. Resumo da fundamentação técnica:

No Laboratório de Vetores Virais, a produção dos vetores virais será realizada. Em cultura, o vírus pCLTK será introduzido nas células B16 para gerar a linhagem repórter. Em seguida, os vetores adenovirais serão aplicados nas células B16-TK. Estas células serão mantidas em cultura onde devem morrer pela ação dos genes p19Arf e/ou interferon-beta. Os restos celulares, agora livres de partículas virais, serão transportados até o Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) e este material injetado s.c. em camundongos C57BL/6, agindo como uma vacina anti-tumoral. Estes animais poderão já ser portadores de tumor B16-TK ou podem ser desafiados futuramente com injeção destas células. Progressão tumoral será monitorada por paquímetro e imageamento não invasivo. Ressaltamos que, no ICESP, somente será realizada procedimentos rotineiros de produção de vírus e sua aplicação em linhagem celular mantida em cultura. Os demais ensaios serão realizados no Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

14. Assinatura do pesquisador principal:

Data: 02/04/2015

15. Observações da CIBio:

16. Aprovação da CIBio:

17. Assinatura do presidente da CIBio:

Data: / /

Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Departamento de Radiologia - FMUSP
CQB Nº 0084/98

**ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA**

Comissão de Ética no Uso de Animais

Parecer - Projeto Nº 153/15/CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“USO DA TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS (PET) PARA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE METÁSTASES E INVESTIGAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA COMBINAÇÃO P19ARF E INTERFERON-BETA EM MELANOMA MURINO”** de responsabilidade do pesquisador **DR EMERSON SOARES BERNARDES** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA.

São Paulo, 23 de abril de 2015.

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN