

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

**Estudo de marcação com iodo-131 de anticorpo monoclonal anti-CD20
usado na terapia de linfoma não-Hodgkin**

Akinkunmi Ganiyu Akanji

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

Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, aos meus queridos e amados pais - Alfa Kasaliyu A. Tiamiyu, Alhaja Suwebatu Ajoke B. Akanji, Dr. Ajibola I. Badiru, pelo carinho, amor, estímulo, inspiração e apoio. Ao povo brasileiro e a humanidade como um todo.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e, em particular, ao Centro de Radiofarmácia (CR) pela oportunidade deste trabalho.

Ao MSc Jair Mengatti, gerente do Centro de Radiofarmácia, pelo apoio.

À Neuza Fukumori, gerente adjunto do Controle de Qualidade e João Alberto Osso Jr, gerente adjunto de Produção do Centro de Radiofarmácia pelas facilidades oferecidas.

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo pela orientação deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio, confiança e amizade.

À Dra. Emiko Muramoto, pela colaboração inestimável fornecida na realização dos estudos de distribuição biológica deste trabalho.

À MSc Marycel F. de Barbosa pelos conhecimentos transmitidos e colaboração inestimável na realização deste trabalho.

Ao Dr. Carlos, e a Dra. Diane chefe do Departamento de Biotecnologia, IPEN pela coluna do HPLC fornecida, e a contribuição técnica na parte de separação de células de leucócitos.

Aos pesquisadores, técnicos, bolsistas e estagiários pelo agradável e profícuo convívio durante a realização deste trabalho.

Em especial, aos meus familiares no Brasil, Dr. Ajibola Isau Badiru, Paulo Braz Felipe da Costa, Claudia Sabaz, Fabio Sabaz, Ema Laura Ibanez, Olumide Micheal Ogunjimi, Olakunle Ijiola, pelo estímulo, apoio, contribuição e colaboração inestimável fornecida na realização deste trabalho, meus profundos e sinceros agradecimentos.

"Faça o que puder com o que tiver onde estiver"

Theodore Roosevelt

Estudo de marcação com iodo-131 de anticorpo monoclonal anti-CD20 usado na terapia de linfoma não-Hodgkin

Akinkunmi Ganiyu Akanji

RESUMO

Linfomas são doenças originárias do sistema linfático, descritos por Thomas Hodgkin em 1932. São tradicionalmente classificados em dois grupos básicos: doenças de Hodgkin e linfomas do tipo não hodgkin (LNH). Inicialmente, pacientes com LNH foram tratados com radioterapia apenas ou combinada com imunoterapia usando-se anticorpo monoclonal anti-CD20 (ex., Rituximab-Mabthera, Roche). Porém, radioimunoterapia é uma nova modalidade de tratamento para pacientes portadores de LNH, na qual radiação citotóxica proveniente de radioisótopos terapêuticos é depositada nos tumores via anticorpos monoclonais (Acms). Este estudo concentrou-se nas condições de marcação do Acm anti-CD20 (Rituximab-Mabthera, Roche), com radioiodo (^{131}I), pelo método direto, usando-se Cloramina-T como agente oxidante. Foram estudados parâmetros de marcação tais como: método de purificação, influência de tempo de incubação, influência de massa de agente oxidante, estabilidade *in vitro* e *in vivo*, imunoreatividade do anticorpo e distribuição biológica do anticorpo marcado em camundongos *Swiss* sadios. Produto de alta pureza radioquímica foi obtido, sem diferença notável entre os métodos aplicados. Não foi observada nenhuma influência direta do tempo de incubação na pureza radioquímica do anticorpo marcado. Um pequeno decréscimo na pureza radioquímica foi observado quando variou-se a massa do Acm sem variar a atividade do radioiodo. Após purificação, o anticorpo marcado apresentou pureza radioquímica de aproximadamente 100 %. Observou-se um produto de alta pureza radioquímica quando o anticorpo foi marcado na condição padrão. O anticorpo anti-CD20 apresentou variações de pureza radioquímica quando sua estabilidade foi testada em cinco condições estabilizadoras diferentes. Entretanto, a condição em que ácido gentísico foi combinado com congelamento demonstrou-se apropriada e capaz de minimizar os efeitos de autoradiólise do anticorpo marcado com alta atividade terapêutica de iodo-131. O anticorpo marcado apresentou imunoreatividade abaixo da relatada na literatura. A distribuição biológica em camundongos *Swiss* sadios revelou captação elevada no pulmão, fígado, e intestino delgado. O clareamento sanguíneo do anticorpo marcado foi relativamente rápido. Contudo, dados experimentais revelaram que anticorpos monoclonais anti-CD20 podem ser seguramente marcados com alta atividade de iodo-131 usando o método de Cloramina-T. O uso de cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) na avaliação de pureza radioquímica mostrou-se apropriado, eficiente, prático, além de simples e rápido. O método de purificação utilizado demonstrou-se eficiente para a separação do anticorpo marcado do iodo livre. A abordagem inédita apresentada neste estudo, no sentido de viabilizar transporte e comercialização do produto marcado, referiu-se ao estudo de estabilidade do Acm marcado. A distribuição biológica do anticorpo demonstrou-se compatível com a distribuição do anticorpo íntegro indicando ótima estabilidade relativa *in vivo*. Os resultados deste estudo confirmam a potencialidade do anticorpo para a radioimunoterapia de linfomas do tipo não-Hodgkin.

The study of labeling with iodine-131 of monoclonal antibody anti-CD20 used for the treatment of non-Hodgkin lymphoma

Akinkunmi Ganiyu Akanji
ABSTRACT

Lymphomas are malignancies of the lymphatic system, described by Thomas Hodgkin in 1932. Traditionally, lymphomas are classified in two basic groups: Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma (NHL). Patients with NHL were earlier treated with radiotherapy alone or in combination with immunotherapy using monoclonal antibody anti-CD20 (ex., Rituximab-Mabthera, Roche). However, Radioimmunotherapy is a new modality of treatment for patients with NHL, in which cytotoxic radiation from therapeutic radioisotopes is delivered to tumors through monoclonal antibodies. This study focused on labeling conditions of monoclonal antibody anti-CD20 (Rituximab-Mabthera, Roche) with iodine-131, by direct radioiodination method using Chloramine-T as oxidizing agent. Labeling parameters investigated were: Radiochemical purity (RP), method of purification, incubation time, antibody mass, oxidative agent mass, stability *in vitro*, stability *in vivo*, immunoreactivity and biological distribution performed in normal *Swiss* mouse. Product of high radiochemical purity was obtained with no notable difference between the methods applied. No clear evidence of direct influence of incubation time on radiochemical purity of the labeled antibody was observed. Whereas, a clear evidence of direct influence of activity on radiochemical purity of the labeled antibody was observed when antibody mass was varied. After purification, the labeled product presented radiochemical purity of approximately 100 %. Product of superior radiochemical yield was observed when standard condition of labeling was used. The labeled product presented variation in radiochemical purity using five different stabilizer conditions. The condition in which gentisic acid was combined with freeze appears more suitable and capable of minimizing autoradiolysis of the antibody labeled with high therapeutic activity of iodine-131. The labeled product presented low immunoreactivity when compared to the literature. Biological distribution in normal *Swiss* mouse demonstrated high uptake of the labeled antibody in lungs, liver, and small intestine. The progressive loss of activity in blood indicates fast blood clearance of the labeled antibody that is eliminated through the kidney, in urine. The experimental data proved that mAb anti-CD20 can be securely labeled with high therapeutic activity of iodine-131 using Chloramine-T method. Radiochemical purity determined by chromatographic plates (ITLC-SG) proved to be appropriate, efficient, practical and simple. The purification method demonstrated to be appropriate and efficient for separating the labeled antibody from free iodine. The results of stability of the labeled antibody presented in this study suggest that the product can be transported and commercialized using the condition in which gentisic acid was combined with freeze. *In vivo* distribution of the labeled antibody shows to be compatible with integral antibody distribution, indicating good *in vivo* stability. Results obtained in this study confirmed the potential of the labeled product anti-CD20-¹³¹I for radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphoma (NHL).

SUMÁRIO

RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
1	Introdução..... 5
1.1	Tratamento de linfomas 5
1.2	Radioimunoterapia (RIT) 9
1.3	Aplicação de Radioimunoterapia em LNH 11
1.4	Antígenos tumor-específicos ou tumor-associados com anticorpo dirigido...14
Nome genérico / nome comercial do radiofármaco	15
1.5	Radioisótopos terapêuticos usados para Radioimunoterapia..17
1.6	Vantagens da Radioimunoterapia em relação à Imunoterapia ou Radioterapia 23
1.7	Resultados clínicos..... 25
1.8	Principais métodos de radioiodação..... 26
1.8.1	Marcação de proteínas com Cloramina-T 26
1.8.2	Radiólise do anticorpo marcado..... 27
2	Objetivo..... 29
3	Materiais e métodos 30
3.1	Materiais 30
3.1.1	Reagentes e soluções 30
3.1.2	Equipamentos..... 30
3.1.3	Animais 31
3.1.4	Outros 31
3.2	Métodos..... 31
3.2.1	Preparação de soluções de trabalho..... 31
3.2.2	Preparação do anticorpo monoclonal anti-CD20 (Rituximab-Mabthera®) 31
3.2.3	Estudo das condições de marcação do anticorpo monoclonal anti-CD20 com iodo-131 31
3.3	Estudo dos parâmetros de marcação 32
3.3.1	Avaliação da influência do tempo de incubação na pureza radioquímica da marcação 32
3.3.2	Avaliação da influência da massa de Cloramina-T na pureza radioquímica da marcação..... 32
3.3.3	Avaliação de influência da razão massa do anticorpo / atividade do iodo- 131 32
3.3.4	Métodos utilizados na avaliação da pureza radioquímica do produto marcado 33
3.3.5	Purificação do produto marcado (anti-CD20- ¹³¹ I)..... 34
3.3.6	Cálculo do rendimento de marcação..... 34
3.3.7	Estudo de estabilidade <i>in vitro</i> do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo- 131 34
3.3.7.1	Estudo de estabilidade em Plasma Humano (PH)..... 34
3.3.7.2	Estudo de estabilidade em Solução Estabilizadora de Polivinilpirrolidona (PVP) 35
3.3.7.3	Estudo de estabilidade em Solução Estabilizadora de Ácido Gentísico 35
3.3.7.4	Estudo de estabilidade em Solução Estabilizadora de Ácido Gentísico combinado com congelamento..... 36
3.3.7.5	Estudo de estabilidade em Albumina Humana (A H) 20 %..... 36

3.3.8	Estudo de Imunoreatividade do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131	36
3.3.8.1	Preparação das amostras de concentrado leucocitário	36
3.3.9	Estudo de distribuição biológica do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131	38
4	Resultados	40
4.1	Condições de marcação do anticorpo anti-CD20 com iodo-131	40
4.1.1	Influência do tempo de incubação na pureza radioquímica da marcação.....	40
4.1.2	Avaliação de influência de massa de Cloramina-T na pureza radioquímica do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I.....	41
4.1.1	Avaliação da influência da razão entre massa do anticorpo e a atividade do iodo-131	42
4.2	Purificação do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I	42
4.3	Rendimento de marcação do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I	43
4.4	Estabilidade <i>in vitro</i> do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I	43
4.4.1	Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I incubado em plasma humano	43
4.4.2	Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I incubado em solução estabilizadora de polivinilpirrolidona (PVP)	44
4.4.3	Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I com Ácido Gentísico	46
4.4.4	Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I com Ácido Gentísico combinado com Congelamento	46
4.4.5	Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I incubado em soro Albumina Humana (SAH) 20 %	47
4.5	Estudo de imunoreatividade do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I	49
4.6	Distribuição biológica do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I.....	50
5	Discussão.....	54
6	Conclusões	60
	REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE TABELA

TABELA 1- Antígenos comuns das células-B de LNH e seus Acm correspondentes.....	15
TABELA 2- Radioisótopos terapêuticos usados em Radioimunoterapia.	17
TABELA 3 - Vantagens e desvantagens de Radioisótopos usados em RIT.....	21
TABELA 4- Rf das espécies radioquímicas observados em fita de ITLC-SG e metanol 85 %	33
TABELA 5- Pureza radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I determinada por cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) e eletroforese nos tempos de incubação estudados.....	40
TABELA 6- Pureza Radioquímica (%) x massas de cloramina-T e tempos de incubação.	41
TABELA 7- Pureza Radioquímica (%) de marcação realizada com diferentes razão de massa Ac / atividade do iodo-131.....	42
TABELA 8- Pureza Radioquímica (%) do produto marcado purificado e não purificado.....	42
TABELA 9- Rendimento (%) do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I quando a massa de Cloramina-T (CT) foi variada com tempo de incubação.	43
TABELA 10- Pureza radioquímica (%) da marcação de 100µg de anti-CD20 com 2960 MBq (80mCi) de iodo-131.....	43
TABELA 11- Pureza Radioquímica do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I incubado em plasma humano (PH).....	44
TABELA 12- Pureza Radioquímica (%) do produto marcado com atividade terapêutica conservado sob refrigeração e congelado.....	44
TABELA 13- Pureza Radioquímica (%) do produto marcado com atividade diagnóstica conservado sob refrigeração e congelado.	45
TABELA 14- Pureza Radioquímica (%) do produto marcado incubado em solução PVP com atividade terapêutica e diagnóstica.	45
TABELA 15- Pureza Radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I utilizando-se Ác Gentísico.	46
TABELA 16- Pureza Radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I utilizando-se ácido gentísico combinado com congelamento.	46
TABELA 17- Pureza Radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I incubado em soro Albumina Humana 20 %.	47
TABELA 18- Pureza Radioquímica (%) comparativa do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I utilizando-se diferentes condições estabilizadoras.	47
TABELA 19- Estabilidade Relativa do produto marcado após 24hs.....	48
TABELA 20- Ligação <i>in vitro</i> (%) do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I e anti-CEA- ¹³¹ I a linfócitos sanguíneos.....	49
TABELA 21- (%) Atividade / órgão do composto anti-CD20- ¹³¹ I em camundongos <i>Swiss</i> sadios nos tempos estudados.	50
TABELA 22- % Atividade / Grama tecido do composto anti-CD20- ¹³¹ I em camundongos <i>Swiss</i> sadios nos tempos estudados.	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Pureza radioquímica do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I: variação do tempo de marcação e comparação dos métodos de ensaio.	41
FIGURA 2- Pureza Radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I utilizando-se diferentes condições estabilizadoras.	48
FIGURA 3- Estabilidade relativa do anti-CD20- ¹³¹ I em diferentes condições estabilizadoras após 24 hs de marcação.	49
FIGURA 4- % Atividade / Órgão do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I em camundongos <i>Swiss</i> sadios.	51
FIGURA 5- Curva de clareamento sanguíneo do anti-CD20- ¹³¹ I em camundongos <i>Swiss</i> sadios.	52
FIGURA 6- % Atividade / grama do anticorpo anti-CD20- ¹³¹ I em camundongos <i>Swiss</i> sadios.	53

Introdução

Tratamento de linfomas

O sistema linfático é uma complexa rede de células e órgãos especializados (como medula, baço, timo, nódulos linfáticos, amídalas, adenóides, apêndice e grupos de tecidos no intestino delgado) que defende o corpo contra infecções.

Circulando dentro do vaso linfático, a linfa, líquido incolor formado por linfócitos e células brancas do sangue, é parte essencial de defesa do corpo contra infecção e doenças. Há dois tipos de linfócitos, as células B e T [1,2].

São denominadas de linfoma todas as doenças originárias do sistema linfático, seja dos nódulos linfáticos ou em outras áreas do sistema linfático. Esse tipo de doença foi descrita primeiramente por Thomas Hodgkin, em 1832, e até recentemente sua natureza inflamatória, infecciosa ou neoplásica era desconhecida. É claramente conhecida como uma proliferação neoplásica de uma célula comum às células Reed-Sternberg e suas variantes, as células Hodgkin, que devem ser uma forma alterada dos linfócitos-B.

Todas as doenças hematológicas são originárias de transformações neoplásicas de células derivadas da medula óssea. A maior complexidade de diferenciação celular no sistema linfático e hematopoiético é refletida na diversidade de tumores. Recentemente, mais de cinquenta subtipos dessas doenças são identificados com vários tipos de apresentação clínica, grau da doença e resposta ao tratamento [1,2,3].

A classificação apropriada dessa classe de doença torna-se uma ferramenta essencial para gerenciar melhor essa complexidade. Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou os linfomas como neoplasias de células-B e T e publicou manuais de orientações gerais sobre classificações de tumores de origem hematopoiética e de tecidos linfáticos, a fim de facilitar o diagnóstico e tratamento desse grupo de doenças.

O documento trouxe esclarecimentos e critérios claros e objetivos de como classificar esse tipo de patologia além de ser uma contribuição importante para o tratamento adequado e providenciou informações claras para a patogênese desse grupo de doenças [1,3].

Em geral, essa classificação é baseada na morfologia da patologia como: doença de Hodgkin e linfoma do tipo não-Hodgkin (LNH). Em ambos os casos, há substituição de tecido linfático normal por aglomeração de células linfáticas anormais [1,2,4].

Os linfomas do tipo não-Hodgkin são um grupo heterogêneo de patologias do sistema linfático. A etiologia exata para a maioria dos linfomas ainda não está determinada, mas as infecções virais e bacterianas mostram-se como fatores etiológicos importantes [1,3].

A ocorrência de linfoma não Hodgkin está associada às condições inflamatórias crônicas tais como: a síndrome de Sjogren, doença celíaca e artrite reumatóide. A infecção crônica tem uma participação importante na patogênese dessas doenças demonstrada pela associação do tecido linfóide mucosa gástrica associado (MALT) com infecção por *Helicobacter pylori* [1,3]. Contudo, o LNH consiste de vários subtipos histológicos classificados através do modelo de classificação estipulado pela OMS, o modelo mais utilizado atualmente [3,4].

Como outros cânceres, são doenças das células, estruturas especializadas e diferenciadas, mas que se reproduzem da mesma maneira. Normalmente, essa divisão acontece de maneira ordenada e controlada, mas, se por algum motivo esse processo se descontrola, as células continuarão se dividindo. Para o caso dos linfócitos, ocorrerá o aumento em demasia de células brancas imaturas no sangue ou na medula e uma massa ou tumor pode se formar em um ou mais grupos de nódulos linfáticos [2].

Como parte de sua função de defesa contra infecção, os linfócitos se movem para diferentes partes do corpo, podendo atravessar o sistema linfático e passar para outros nódulos linfáticos em outras partes do corpo. Podem atravessar a corrente sanguínea sendo carregados a outros órgãos e continuar se dividindo para formar novos tumores [2].

É tanto fascinante como frustrante a epidemiologia, tanto da doença de Hodgkin como do linfoma do tipo não-Hodgkin. Há vários indícios em relação a sua etiologia e alguns desses fatores são conhecidos para alguns subgrupos desses tumores, mas a etiologia da maioria dos casos continua desconhecida. A literatura epidemiológica sobre linfomas faz uma separação consistente sobre a doença de Hodgkin dos linfomas do tipo não-Hodgkin, mas sempre evitando os subgrupos [3,5,6].

O aspeto que chama atenção na epidemiologia descritiva do LNH em países ocidentais é, principalmente, o aumento inexplicável que ocorreu no decurso dos últimos anos. A proporção de aumento de incidência, por exemplo, na Inglaterra e no país de Gales, desde 1971, foi a maior para qualquer tumor exceto tumor pleural nas mulheres e, nos homens, o melanoma. Igualmente, aumentos crescentes foram vistos nos Estados Unidos da América (EUA) e em outros países ocidentais [6,7].

A mortalidade de pacientes com LNH na Inglaterra e país de Gales também aumentou em populações de adultos mais velhos. Portanto, em crianças e populações de adultos mais jovens, há decréscimo na taxa de mortalidade devido à melhoria no sistema de tratamento da doença [6].

Relatos na literatura mostram aumento de 55 % na sobrevivência relativa de 5 anos para casos diagnosticados durante 1992 e 1998 nos EUA e aumento de 48 % na Europa nos casos diagnosticados entre 1987 e 1989 [6,8]. Para a população infantil o aumento é muito maior, 74 % na Europa e 72 % nos EUA [6,8,9]. Todavia, a incidência de LNH é crescente, afetando cerca de 50.000 - 60.000 pacientes por ano e é a quinta causa de morte nos Estados Unidos [4,6].

No Brasil, os números relatados mostram que a incidência da doença ocorre em todas as faixas etárias, sendo insignificante em idades abaixo dos 10 anos e aumentando de forma diretamente proporcional nas faixas etárias entre 35 - 40 anos, com 10 casos observados em grupos de

100.000 pessoas. Ocorre um aumento progressivo de casos chegando a 90 casos em grupos de 10.000 pessoas com 80 anos [10].

Aproximadamente oitenta por cento dos linfomas são originários das células-B, com grande maioria (> 95 %) contendo ou expressando o antígeno CD20 na superfície das células [4,11-14]. Tradicionalmente, os linfomas das células-B são divididos em três tipos ou graus diferentes como: baixo-grau (pequenos linfócitos, zona marginal, célula central folicular, grau I e II); grau-intermediário (células grandes e difusas) e alto-grau (linfoblástico, Burkitts), cada uma ocorrendo, aproximadamente, em um terço dos pacientes [1,3,4,12].

As células-B de LNH de baixo-grau são consideradas como LNH indolentes e respondem a vários tipos de tratamentos havendo, inevitavelmente, recaída, conduzindo a eventual morte com sobrevivência média relatada de 5 a 15 anos [1,4].

Tradicionalmente, a radioterapia convencional exerce um papel importante no tratamento de LNH de células-B e pode ser usada com finalidade curativa para pacientes no estágio I e II do tipo indolente. Porém, para formas histológicas volumosas e agressivas, a radioterapia é utilizada em combinação com substâncias quimioterápicas tais como: ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona (CHOP) sozinhos ou com anticorpo monoclonal anti-CD20 [1,4,12-15] (ex., Rituximab – Mabthera-Roche).

Os LNH de células-B de grau intermediário e alto têm uma apresentação mais sintomática, sendo chamados de agressivos e freqüentemente respondem a tratamento com múltiplos agentes quimioterápicos, com mais da metade das respostas sendo duráveis [3,4,12,13].

Recentemente, descreveu-se a utilização combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona (CHOP) e o anticorpo anti-CD20. Com esta combinação, 50% - 60% dos pacientes foram curados, 20% apresentaram melhora durante tratamento, apresentando apenas uma transiente remissão parcial (RP) ou doença estável com progressão subsequente,

considerando que os outros 30% apresentaram recaída após remissão completa (RC) [4,11,12,14-16].

No caso dos reincidentes, uma substancial proporção de candidatos altamente selecionados pode ser curada com altas doses de quimioterápicos e implantação de células tronco. Além disto, aproximadamente 40% dos pacientes com LNH de células-B não são curados com dose padrão ou alta de quimioterapia convencional. O uso de Rituximab demonstrou somente a indução de uma resposta transiente e parcial em 30% destes pacientes. Todavia, estes pacientes são candidatos em potencial a uma nova e recente abordagem, a Radioimunoterapia (RIT) [4,5,14,17,18,19,21,23,24].

Radioimunoterapia (RIT)

Radioimunoterapia é definida como uma modalidade de tratamento na qual a radiação citotóxica proveniente de radioisótopos terapêuticos é depositada nos tumores via anticorpos (anticorpos monoclonais, AcM) que se ligam aos antígenos, tumor-específicos ou tumor-associados. Representa uma combinação de princípio de tratamento sistêmico com depósito “*in loco*” de radiação. Esta modalidade terapêutica é realizada utilizando-se compostos imunoconjugados, constituídos de anticorpos ligados quimicamente a radionuclídeos, dirigidos aos antígenos, tumor-específicos ou tumor-associados [4,15,16,21,22,23].

Esses anticorpos funcionam como veículos que carregam o radioisótopo terapêutico para o tumor e possuem efeito citotóxico mediado por apoptose, citotoxicidade anticorpo-dependente célula-mediada (ADCC) e citotoxicidade complemento-dependente (CDC).

Além disso, as características do antígeno contra o qual um anticorpo em particular é dirigido (o antígeno alvo) determinam, em grande parte, a efetividade de ambos, o próprio anticorpo e a radiação dirigida. Desta forma, a escolha dos anticorpos, antígenos alvo e radioisótopos são críticos para o sucesso da RIT [4,15,16,17,18,21,22].

A eficiência de compostos radioimunoterápicos pode ser descrita pela permanência do radionuclídeo no sítio do tumor em quantidade e tempo suficientes para destruir o tumor. Porém, isso depende de quatro parâmetros críticos: a) a acessibilidade do tumor, b) especificidade do anticorpo dirigido, c) afinidade do anticorpo dirigido, e d) a estabilidade *in vivo* do radionuclídeo em permanecer no sítio do tumor. Embasado nesses parâmetros, a potência de qualquer radioimunoterápico pode ser definida como dependente da ligação ou incorporação máxima do radionuclídeo ao anticorpo em conjunção com retenção máxima de ligação com o antígeno específico [23].

É convencional definir a imunoreatividade de radioimunoterápico como sendo a fração do anticorpo radiomarcado ligado ao antígeno dirigido. O conhecimento dessa fração de ligação do anticorpo ligado ao antígeno é fundamental, que determina sua capacidade terapêutica, assegurando que o seu uso resultará no efeito terapêutico desejado. Essa capacidade de ligação, ou seja, a imunoreatividade de anticorpos radiomarcados é expressa em porcentagem, por meio de um método de extrapolação matemática de ligação de quantidade infinita teórica do anticorpo marcado ao antígeno dirigido [4,23].

Moléculas de Acm utilizadas em RIT são marcadas com isótopos radioativos que emitem partículas β^- ou α que podem ser associadas com raios gama (γ). Mono emissores de partículas beta menos como ítrio-90 (^{90}Y) e fósforo-32 (^{32}P) são chamados de beta emissores puros e emissores de partículas associadas como lutécio-177 (^{177}Lu), rênio-188 (^{188}Re) e iodo-131 (^{131}I), emitem partículas beta com raios gama associados, de vários níveis de energia. Esses compostos (moléculas de anticorpos com isótopos radioativos) são chamados de imunoconjugados. A maioria destas biomoléculas conjugados com radioisótopos, principalmente as emissores beta, é absorvida dentro de alguns milímetros nos tecidos, resultando numa dose de radiação para as células tumorais em adição ao efeito citotóxico dos próprios Acm. Devido ao alcance limitado das partículas beta, esta radiação geralmente não penetra nos tecidos saudáveis além do tumor.

Estudos demonstraram que, em tumores maiores, o efeito citotóxico dos Acm exerce um papel significativo na indução de morte destas células [4,13,14,15,20,25].

Aplicação de Radioimunoterapia em LNH

Esta modalidade de tratamento na qual os anticorpos radioativos são dirigidos aos antígenos “alvos”, os anticorpos CD-20, representam uma nova promessa de tratamento para LNH de células-B. A RIT está deixando de ser um simples modelo experimental para se tornar um modelo padrão de tratamento, sendo um tratamento especificamente sistêmico, com objetivo de morte seletiva de um número maior de células tumorais do que a radioterapia convencional (radiação direta externa) ou quimioterapia [4,16,17,21].

A primeira tentativa do uso de radionuclídeo conjugado com imunoglobulinas para tratamento de câncer foi reportada muitas décadas atrás. Desde então, muitas combinações de anticorpo-radionuclídeo foram propostas, um feito possível pela introdução da técnica de produção de anticorpos monoclonais por Köhler e Mustein em 1975 [4,12,22,23,24,25].

A promessa da RIT para tratamento de LNH de células-B ficou mais aparente após o relato de DeNardo e colaboradores, do primeiro paciente com essa doença tratado com RIT. Esses pesquisadores usaram um Acm anti-célula-B marcado com iodo-131, chamado Lym-1, com que demonstraram resultados objetivos em aproximadamente metade dos pacientes tratados [27].

Desde então, inúmeros ensaios clínicos pilotos têm sido conduzidos usando Acm anti-célula-B, a maioria demonstrando atividade anti-tumoral em pacientes com LNH de células-B em vários estágios da doença [10,11,12,17,18,20,25,26,28].

O sucesso da RIT no tratamento de LNH de células-B é, em parte, relacionado às propriedades inerentes à biologia molecular desta doença. Isso inclui radiosensibilidade e os aparentes e bem definidos antígenos dirigidos na sua superfície, fazendo com que sejam atrativos e possíveis os processos biológicos e imunológicos importantes como, apoptose, ADCC e CDC [4,12,15,16,17,18,21,29].

Contudo, essa façanha pode ser efetivamente explorada somente pelo uso apropriado de anticorpos capazes de induzir esses processos biológicos e imunológicos e, no caso de RIT, pelo uso de radioisótopos terapêuticos apropriados para depositar radiação citotóxica no tumor [4,12,16,17,21].

Identificar anticorpos apropriados e isótopos ideais para uma marcação estável é fruto de pesquisas básicas e clínicas extensivas de quase duas décadas envolvendo várias disciplinas, como imunologia, radioquímica, medicina nuclear e oncologia médica.

Em fevereiro de 2002, o anticorpo monoclonal (Acm) radiomarcado, ibritumomab tiuxetan-⁹⁰Y (Zevalin; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, CA), recebeu a aprovação final do FDA (Food and Drug Administration) como o primeiro anticorpo radiomarcado comercialmente disponível para o tratamento de câncer. Esta aprovação veio somente alguns anos após Rituximab ser introduzido na prática clínica como o primeiro anticorpo não conjugado para terapia de câncer; em especial os linfomas do tipo não-Hodgkin de baixo-grau recorrentes e indolentes, beneficiando milhares de pacientes portadores dessa doença [4,12,13,15,16].

O interessante é que, tanto no caso de Rituximab como o Ibritumomab tiuxetan-⁹⁰Y, o anticorpo em questão é dirigido contra células-B de linfoma não-Hodgkin. Rituximab é um Acm quimérico não conjugado contra o antígeno CD20 de superfície das células-B de LNH, enquanto Ibritumomab tiuxetan é um Acm parente murínico do Rituximab marcado com ⁹⁰Y. Esta aprovação consagra o sucesso de ambos, radioimunoterapia (RIT) e imunoterapia, no tratamento de moléstias hematológicas malignas em geral e de células-B de LNH, em particular.

Inúmeros ensaios clínicos pilotos e protocolos fase I ou fase I/II têm sido relatados, utilizando vários anticorpos monoclonais radiomarcados dirigidos contra células-B de LNH. Estes protocolos foram direcionados para investigar a especificidade pela célula alvo, farmacocinética e dosimetria dos vários Acm radiomarcados e determinar seu perfil toxicológico e máxima dosagem tolerada [MDT] em pacientes com células-B previamente tratados. Como esperado, os

Acms usados nesses ensaios reconheceram vários antígenos presentes nos linfócitos-B e divergiram em suas afinidades de ligação, imunoreatividade, isótopos, índice de internalização e números de sítios de antígeno presentes nas células normais e células-B malignas [4,12,13,15,16-17,19,20,23,24,25,27,29].

Outro imunocombinado, formado pelo Acm Tositumomab marcado com iodo-131, também foi testado clinicamente. O resultado final de um protocolo fase I com doses não-mieloablativas de Tositumomab-¹³¹I foi relatado por Kaminski e colaboradores [19]. Trinta e quatro pacientes entraram no ensaio, dezoito deles com LNH de baixo-grau, vinte e um pacientes com LNH resistentes a quimioterapia e quatorze com tumor de grande volume (>500g). As doses de Tositumomab-¹³¹I administradas foram baseadas em resultados de estudos pré-terapia com doses fracionadas estimadas para o corpo inteiro (185MBq (5mCi), 15mg) [4,13,18,20,26,27,29].

A mesma quantidade de proteína (anticorpo não conjugado) variando de 150 para 700mg na maioria dos pacientes, foi administrada 1h antes do anticorpo traçador marcado ou dose de terapia para melhorar a biodistribuição do Tositumomab-¹³¹I. Iniciou-se com dose de 25 Gy para o corpo total, aumentando-se sempre em 10 Gy. A máxima dose tolerada [MDT] foi determinada em 75 Gy para o corpo total em pacientes que não passaram por um transplante medular, mas esse valor parece menor em pacientes que passaram por transplante medular [4,13,18,20,26,27,29].

As doses radioativas de Tositumomab-¹³¹I utilizadas variaram de 1,26 a 5,56 GBq (34 -161 mCi). Vinte e dois dos vinte e oito pacientes avaliados (79%) responderam, com quatorze (50%) apresentando remissão completa (RC). A média de duração da RC foi superior a treze meses, com oito pacientes permanecendo livres da doença até a conclusão do estudo [4,20,26,27,29].

Os últimos três anos após o desenvolvimento da RIT de células-B de LNH foram caracterizados principalmente pela condução de protocolos de fase II e III para determinar a eficácia de anticorpos monoclonais radiomarcados como candidatos ideais para RIT [21,23,24,25].

Protocolos fase II e III são disponíveis apenas para Tositumomab-¹³¹I, aplicado em doses mieloablativas e não-mieloablativas, e para o Ibritumomab tiuxetan-⁹⁰Y, em doses não-mieloablativas [4,20,25,26,29].

De forma resumida, os relatos dos protocolos fase II e III com Tositumomab-¹³¹I mostraram que este Acm, quando administrado em MDT de 75Gy do corpo total, é seguro e efetivo em pacientes com LNH de baixo-grau ou transformado, em vários estágios da doença. Entretanto, os resultados dos estudos de fase II conduzidos em pacientes com LNH baixo-grau ou transformado, não tratados previamente, podem justificar, em princípio, as considerações da utilização desta modalidade terapêutica, sozinha ou em combinação com outras modalidades quimioterápicas, na linha de frente para certos pacientes [4,20,25,26,29].

Uma desvantagem potencial associada à utilização do Tositumomab murínico é a alta incidência de resposta imunológica, descrita como resposta HAMA (“Human Antibody Murine Activity”). Entretanto, a utilização de Acm quiméricos ou humanizados, a adoção de regimes contendo pequenas quantidades de Acm murínico (pôr exemplo, o Ibritumomab tiuxetan murínico em combinação com Rituximab), e a combinação da RIT com quimioterapia imunossupressiva citotóxica podem, pelo menos em parte, contornar esse problema [4,20,26-31].

Antígenos tumor-específicos ou tumor-associados com anticorpo dirigido

A especificidade do anticorpo utilizado em RIT é determinada principalmente pelo antígeno a ser dirigido. Esse antígeno deve ser específico para o tumor com mínima ou nenhuma expressão em células saudáveis. Entretanto, na prática, a maioria desses antígenos, incluindo os de células B de LNH, são mais tumor-associados do que tumor-específicos. Isso quer dizer que eles também são expressos na superfície de células normais e órgãos e tecidos (dependendo do antígeno), embora em porcentagem menor ou número reduzido de antígenos por célula [4]. Conseqüentemente, os anticorpos dirigidos a esses antígenos são relativamente e não absolutamente específicos. A TAB. 1 mostra os antígenos mais comuns das células-B, e nomes

dos Acm não-conjugados dirigidos contra esses antígenos com os radionuclídeos conhecidos [16-19,34-36].

TABELA 1- Antígenos comuns das células-B de LNH e seus Acm correspondentes.

Antígeno dirigido	Acm(s) não-conjugados	Nome genérico do Acm comercial	Acm Radiofarmaco correspondente	NOME GENÉRICO / NOME COMERCIAL DO RADIOFÁRMACO
CD19	Anti-B4 HD37			
CD21	OKB7		OKB7- ¹³¹ I	
CD20	B1	Tositumomab		Tositumomab- ¹³¹ I (Bexxar)
	2B8	Ibritumomab	IDEC- ¹¹¹ In/ ⁹⁰ Y-2B8	Ibritumomab- ¹³¹ I tiuxetan- ¹¹¹ In/ ⁹⁰ Y (Zevalin)
	C2B8	Rituximab (Rituxan)	C2B8- ¹³¹ I hLL2- ¹³¹ I	
	HLL2		hLL2- ¹¹¹ In/ ⁹⁰ Y	
CD22		Epratuzumab (Lymphocide)	hLL2- ¹⁸⁶ Re	Epratuzumab- ¹³¹ I
HLA-DR	Lym-1		Lym-1- ¹³¹ I Lym-1- ⁶⁷ Cu Lym-1- ⁹⁰ Y	Epratuzumab ¹¹¹ In/ ⁹⁰ Y Epratuzumab ¹⁸⁶ Re-hLL

A maioria desses antígenos é chamada de “CD” (“cluster of differentiation”), como: CD19, CD20, CD21, CD22, CD37 e CD52 com o antígeno HLA-DR representando outro grupo de antígenos importantes dirigidos para as células-B dos LNH [4,15,17,20,31].

Uma consequência direta da expressão destes antígenos alvo nas células-B normais e seus precursores é o uso comum do anticorpo não marcado, em doses relativamente altas, antes da administração dos anticorpos marcados, com o objetivo de bloquear os antígenos alvos nas células-B normais e seus precursores, determinando uma ligação mais favorável no tumor [4,12,13,26,31].

Contudo, esse bloqueio tem efeito, embora em grau menor, até em células-B malignas que podem estar circulando no sangue ou alojadas no baço ou na medula óssea, pelo fato de que esses são sítios de grande afinidade dos anticorpos não marcados. Entretanto, esse bloqueio parcial é aceitável quando se trata de tumores grandes [4,15,16].

Devido ao fato de que a maioria dos Acm usados em RIT é diferente das células-B malignas, quantidades variáveis de anticorpos não marcados são previamente administradas à administração do Acm radiomarcado. Há relatos de que esse procedimento aumenta o efeito anti-tumoral desses Acms radiomarcados. Como referência, somente 5mg de Lym-1 não conjugado são administrados antes do Lym-1 radiomarcado, exceto em pacientes com células malignas circulantes [4,26-28].

Ao contrário, grandes quantidades de Acm anti-CD20 não marcado, entre 200mg-700mg, são administradas para cada dose do Acm radiomarcado. Neste caso, a dose de infusão recomendada do Acm não marcado, o Rituximab quimérico, é de 250mg/m² ou aproximadamente 430mg em homens com 70 kg antes do radiomarcado (Ibritumomab tiuxetan-⁹⁰Y) [4,15-17,19,20,32].

No caso do Tositumomab-¹³¹I (Bexxar; Corixa Corp; CA EUA), o Acm anti-CD20 marcado com iodo-131, a quantidade do Acm não marcado é similar (450mg) [4,15-17,19,20,32].

O antígeno CD20 é caracterizado por sua freqüência de expressão alta (superior a 90%) na superfície de células-B de LNH, expressão relativamente homogênea na superfície das células destes tumores, com alto número de antígenos por célula (maior que 100.000) [4,13,17,20,21,23,27-29,33].

Outra característica importante deste antígeno é que ele se internaliza lentamente, ou seja, o transporte para dentro da célula tumoral após a ligação do anticorpo é lento, quando comparado a outros antígenos como o CD19 e CD22. Portanto, os Acm dirigidos aos antígenos alvo CD20 são considerados como de internalização lenta enquanto os dirigidos ao CD19 e CD22 são

considerados de internalização rápida. Isto apresenta importante implicação com respeito à escolha do radioisótopo a ser utilizado na marcação do anticorpo [4,34].

Radioisótopos terapêuticos usados para Radioimunoterapia

Vários radioisótopos terapêuticos utilizados para marcação de Acm em RIT são disponíveis. A TAB. 2 mostra a maioria destes isótopos, propriedades físicas, vantagens e desvantagens. O sucesso da RIT depende de três fatores principais, porém interdependentes e a escolha de radionuclídeo apropriado é uma delas, além do anticorpo, e do antígeno alvo. A resposta tumoral depende de algumas considerações tais como, dose de radiação cumulativa distribuída, a taxa de dose, a penetração da dose, e a radiosensibilidade do tumor [4,15-17,21,23-25].

O objetivo principal ao escolher um radionuclídeo é garantir a permanência da radioatividade no alvo com menos radiação nos tecidos normais ao redor desse alvo [4,15-17,21,23-25].

A seleção do radioisótopo a ser usado em RIT é baseada em seu perfil energético, partícula emitida, alcance médio em tecidos e sua meia-vida física. Esses fatores são determinantes não só do efeito antitumoral como do perfil toxicológico; além de suas propriedades químicas que ditam a facilidade de ser acoplado ao anticorpo monoclonal formando assim um composto radioimunoconjugado. Um preço acessível e disponibilidade são considerações práticas e importantes nesta escolha [4,15-17,21,23-25].

A seleção de um radioisótopo inadequado ou impróprio pode resultar no seu desligamento do anticorpo, dificultando a permanência do composto marcado no sítio do tumor. Isso resultaria em uma dose de radiação alta desnecessária nos órgãos próximos do tumor e uma dose de radiação menor ou insignificante no próprio tumor [4,16,21,24,26,37].

TABELA 2- Radioisótopos terapêuticos usados em Radioimunoterapia.

Radioisótopo	Tipo de emissão	Meia-Vida	E (max) (MeV)	Alcance Médio em tecidos (mm)	Aquisição de Imagem

⁹⁰ Y	β^-	2,7 d	2,3	2,50	Não
¹³¹ I	β, γ	8,0 d	0,81	0,30	Sim
¹⁷⁷ Lu	β, γ	6,7 d	0,50	0,28	Sim
¹⁵³ Sm	β, γ	2,0 d	0,80	0,53	Sim
¹⁸⁶ Re	β, γ	3,8 d	1,1	0,92	Sim
¹⁸⁸ Re	β, γ	17,0 h	2,1	2,43	Sim
⁶⁷ Cu	β, γ	2,6 d	0,57	0,6	Sim
²¹² Pb	β, γ	10,6 h	0,57	0,6	Sim
²²⁵ Ac	α, γ	10 d	5,83	0,04-0,1	Sim
²¹³ Bi	α, β, γ	45,7 min	5,87	0,04-0,1	Sim
²¹² Bi	α, β	1,0 h	6,09	0,04-0,1	Sim
²¹¹ At	α	7,2 h	5,87	0,04-0,1	Sim
¹²⁵ I	α	60,1 d	0,035	0,001-0,02	Não
	Auger				

Em geral, pode ser utilizado para RIT qualquer um dos radioisótopos terapêuticos apresentado na Tabela 2. Porém, a escolha de cada um desses radioisótopos dependerá de seus perfis energéticos, a situação clínica, o local e estágio da doença (doença volumosa ou doença microscópica residual).

A maioria dos radioisótopos utilizados para este tipo de terapia é emissor de partículas beta (β) e representa a única ou principal fonte de radiação terapêutica depositada. Dois emissores- β largamente usados em RIT são o iodo-131 e ítrio-90, este último com energia média de 0,93 MeV, meia-vida de 2,7 dias, alcance médio nos tecidos de 2,5 mm, enquanto que iodo-131 apresenta energia- β média de 0,19 MeV, meia-vida de 8 dias, e alcance médio nos tecidos de 0,3 mm. O iodo-131 apresenta como vantagens a disponibilidade, custo acessível, emissão gama (γ)

associada que possibilita aquisição de imagens e química simples de ligação às proteínas [15-17,21-24].

No caso do ítrio-90, a energia alta e o alcance maior nos tecidos, aliados ao efeito "de irradiação cruzada" ("crossfire") permitem que a radiação alcance e afete (e potencialmente matando) células tumorais que não estejam diretamente ligadas ao anticorpo ou que estejam em local de difícil acesso para o anticorpo. Essas qualidades tornam o ítrio-90 apropriado para irradiação de tumores volumosos. Entretanto, esse efeito "crossfire" ocorre devido à combinação entre a meia-vida física dos radionuclídeos e a meia-vida biológica dos anticorpos anti-CD20 murínicos [15,21,35].

Todavia, para tumores micro-metastáticos, o longo alcance do ítrio-90 pode resultar em danos aos tecidos sadios vizinhos ao tumor e o curto alcance de iodo-131 pode ser considerado ideal. Isso é importante considerando as evidências indicando que anticorpos monoclonais e seus fragmentos não se distribuem de forma homogênea e em quantidades adequadas dentro dos tumores. Há uma distribuição preferencial dos Acms em áreas bem próximas de vasos sanguíneos em detrimento a outras áreas.

Fatores como a distribuição heterogênea dos anticorpos, dos antígenos, a vascularização do tumor e a permeabilidade dos vasos tumorais devem ser considerados sempre na escolha do anticorpo, de radionuclídeo e do antígeno dirigido para se atingir uma RIT com êxito [4,15-17,21,23,24,37,38].

Radioisótopos emissores de partículas alfa [α] representam outro tipo de radiação utilizada em RIT. São partículas monoenergéticas com alta transferência linear de energia (LET) [41]. Há várias vantagens de utilização de radionuclídeos com alto LET em aplicações de radioimunoterapia. Por exemplo, o valor do LET médio para o ítrio-90, é de 0,2 k eV/ μm , enquanto que a do astatínio-211 é de 97 k eV/ μm . Porém, o alcance médio em tecido do mesmo astatínio-211 é de 70 μm [4,13,15-17,21,26,33].

Ainda mais, o efeito da radiação de alto LET é independente da taxa da dose e as propriedades das partículas alfa com poder de ionização alto num espaço curto resultam em alta eficiência biológica relativa comparada aos efeitos com dosagem similar das partículas beta [21,37].

O efeito de radiação de LET baixo na sobrevivência de células depende da presença de oxigênio, e isso não é o caso de partículas de radiação de LET alta. Portanto, isso sugere que as partículas alfa devem se sair melhor nas condições hipóxicas encontradas nos tumores [4,21,25,41].

O conjunto dessas qualidades faz com que as partículas alfa sejam mais eficientes que as partículas beta, pois podem depositar radiação letal ao tumor numa única dose, e devido a esta mesma característica se tornam mais úteis para o tratamento de tumores menores e mais acessíveis como leucemia no sangue e medula óssea [4,15-17,21,25,37,42].

Uma desvantagem importante do uso de emissores α relaciona-se ao efeito de radiólise provocado pela energia do isótopo na estrutura do radiofármaco.

Independente do tipo de radiação emitida pelos vários radioisótopos utilizados em RIT, eles podem ser grosseiramente divididos em duas categorias, com base em suas características químicas: halogênios (como o ^{131}I , ^{211}At) e radiometais (^{90}Y , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{67}Cu e ^{213}Bi) [4,15,24].

Em geral, halogênios, em particular o iodo-131, podem ser facilmente incorporados a anticorpos utilizando-se método direto por substituição eletrofílica oxidativa utilizando-se Iodogen ou Cloramina-T. Já a incorporação de radiometais requer quelantes (como DOTA e tiuxetan) conjugados ao anticorpo para promover ligações estáveis. Entretanto, o uso de quelantes inadequados levará à formação de compostos instáveis e, conseqüentemente, ao desligamento ou separação do radioisótopo do anticorpo [4,13,24,33,42].

Entre os isótopos relacionados na TAB. 3, o iodo-131 e ítrio-90 são os mais utilizados em RIT. Iodo-131 é o isótopo mais convencional e comumente utilizado em terapia (no tratamento de

pacientes com hipertireoidismo ou câncer de tireóide) e isto explica, em parte, o uso do radionuclídeo na maioria das aplicações de RIT, incluindo o tratamento de células-B de LNH [4,13,15,24,42].

TABELA 3 - Vantagens e desvantagens de Radioisótopos usados em RIT.

Isótopo	Vantagens	Desvantagens
¹³¹ I	Custo baixo, química fácil de marcação, obtenção de imagem	Dehalogenação <i>in vivo</i> , liberação de ¹³¹ I exposição de paciente e profissionais à radiação.
⁹⁰ Y	Energia β-alta, maior penetração tumoral, menor risco de exposição à radiação	Requer quelante para marcação estável, não permite aquisição de imagem, alto custo.
⁶⁷ Cu	Separação insignificante do quelante, permite obtenção de imagem.	Requer quelante para marcação estável, baixa disponibilidade.
¹⁸⁶ Re	Separação insignificante do quelante, permite obtenção de imagem.	Requer quelante para marcação estável, baixa disponibilidade.
¹⁸⁸ Re	Energia β-alta, maior penetração tumoral, permite aquisição de imagem.	Requer quelante para marcação estável, meia-vida curta para Acms inteiros.
²¹¹ As	Efeito letal ao tumor, LET alto.	Dehalogenação, não permite aquisição de imagem, baixa disponibilidade.

O iodo-131 apresenta inúmeras vantagens, tais como baixo custo, métodos de radioiodação de anticorpos relativamente simples e habilidade de obter imagens com anticorpos antes do uso das doses terapêuticas ou após a RIT, por causa da emissão gama associada ao isótopo. Esta última vantagem é, contudo, acompanhada da exposição à radiação pelo próprio paciente e dos parentes e profissionais, o que requer confinamento e cuidados especiais no caso da administração de altas doses consideradas como desvantagem [4,15,21-25,32,37,42].

Outra desvantagem importante do uso do iodo-131 relaciona-se ao efeito da dehalogenação, que inevitavelmente ocorre após catabolismo dos anticorpos convencionalmente radioiodados em vários órgãos normais (fígado, baço, medula e rins) e, em grau variável, também na célula tumoral. O iodo livre liberado requer proteção para a tireóide e, particularmente, quando altas doses do anticorpo marcado são administradas, podem resultar em hipotireoidismo, apesar do bloqueio de tireóide [4,15,21-25,32,33,37,42].

Há um problema importante quando Acm de rápida internalização (como, anti-CD19 e CD22) são marcados com iodo-131. Neste caso, a rápida internalização é associada à rápida degradação intracelular dos Acm radiomarcados dentro dos lisossomos, resultando em liberação de uma fração substancial do iodo-131 das células tumorais [4,13].

Contudo, radioiodo e radiometais são marcadores apropriados para anticorpos com lenta internalização, o que explica o fato de iodo-131 e radiometais serem utilizados para marcação de anticorpos anti-CD20 utilizados em procedimentos clínicos de RIT [19,26].

O ítrio-90 vem sendo utilizado na marcação de vários anticorpos monoclonais, incluindo os de internalização rápida e lenta, desenvolvimento que vem sendo facilitado pela disponibilidade de quelantes estáveis. O uso de tais quelantes eliminou o problema do ítrio-90 livre subsequentemente localizado nos ossos, aumentando assim a toxicidade medular [4, 23,26].

A necessidade da utilização de um quelante para marcação de Acm com ítrio-90 pode ser considerada como uma desvantagem pela necessidade de ser primeiro conjugado ao Acm antes de ser marcado, sendo que esses quelantes podem não estar disponíveis no laboratório e/ou instituição [4, 23,26].

O radionuclídeo Ítrio-90 é um emissor beta puro e, portanto, não possibilita a aquisição de imagens cintilográficas quando dosagens baixas ou padrão de Acms marcados com ítrio-90 são aplicados ou usados. Imagens de radiação Bremsstrahlung podem ser adquiridas quando se utilizam quantidades muito altas de radioatividade e estas se concentram consideravelmente em

determinados órgãos ou tumor, o que nem sempre acontece na maioria das situações clínicas. Isto também resulta em imagens de baixa qualidade [4,51,54,55].

Desta forma, existe a necessidade de um radionuclídeo com similaridade química com ítrio-90, porém com radiação gama, para determinar a distribuição e dosimetria dos anticorpos monoclonais marcados com o ítrio-90 nos órgãos e no tumor. O Índio-111, um isótopo já conhecido e freqüentemente usado para imagem, preenche essa necessidade para predizer os parâmetros do AcM marcado com ítrio-90. Mesmo com a disponibilidade de AcMs Índio-111 correspondentes para quase todos os AcMs marcados com ítrio-90 [AcM-⁹⁰Y] utilizados para RIT (como Ibritumomab tiuxetan-⁹⁰Y/¹¹¹In), a necessidade do índio-111 é uma desvantagem pequena. Por outro lado, com o uso do ⁹⁰Y, a exposição à radiação de profissionais e parentes é desprezível e os procedimentos terapêuticos podem ser realizados mesmo com altas doses sem necessidade de isolamento [4,51,54].

Outra vantagem importante do ítrio-90 está relacionada ao poder de penetração de suas partículas beta que é maior que do iodo-131, sendo vantajoso para o tratamento de tumores com distribuição heterogênea do antígeno. Rênio-186 e Cobre-67 são isótopos já utilizados para RIT de células-B de LNH, mas relatos sobre o uso clínico são limitados até o momento; suas vantagens e desvantagens estão descritas na TAB. 3 [51,54].

Vantagens da Radioimunoterapia em relação à Imunoterapia ou Radioterapia

A abordagem de conjugação de anticorpos com radioisótopos terapêuticos apropriados diferencia radioimunoterapia de imunoterapia ou com anticorpos não conjugados ou conjugados com toxinas, as chamadas imunotoxinas [4,12,25].

O tratamento com anticorpos ligados a radioisótopos (RIT) em vez de imunotoxinas ou anticorpos não conjugados resulta em várias vantagens distintas. Uma vantagem evidente é que com RIT, os efeitos anti-tumor destes AcMs, os mecanismos tanto biológico e imunológico,

como apoptose, ADCC e CDC, em conjunto com os efeitos da radiação, exercem papel importante nas respostas anti-tumorais observadas [4,16,17,28,29,32,35].

Outra vantagem importante da RIT é que não é necessário dirigir um anticorpo específico para cada célula tumoral para provocar o efeito antitumoral ao nível celular, já que até células antígeno-negativo não dirigidas podem ser irradiadas e potencialmente mortas por radiação oriunda de células vizinhas. Isto não ocorre com anticorpos não conjugados ou imunotoxinas, onde para cada célula tumoral deve ser especificamente direcionado um anticorpo para que aconteça o efeito antitumoral ao nível celular [4,16,25].

Em conseqüência, é improvável que ocorra uma regressão completa da massa tumoral utilizando anticorpos não conjugados ou imunotoxinas se o antígeno não for expresso em cada ou em quase todas as células tumorais.

Esse fator pode explicar parcialmente a fração de remissão completa (RC) entre as remissões totais (RT), ou seja, remissões completas (RC) e remissões parciais[RP] juntas, utilizando doses não mieloablativas de Acms radiomarcados comparados com Acms não conjugados similares [20,21,28,63].

Outra vantagem em potencial da RIT é a forma como a radiação é depositada, em taxa de dose baixa (<20cGy/h), fazendo com que seja mais eficaz que os feixes de radiação externa (XRT), o chamado efeito inverso da taxa de dosagem. Este fato está provavelmente relacionado ao efeito de apoptose sobre as células de linfoma e ao ciclo de crescimento celular, com acúmulo de células na fase G2-M do ciclo celular, que são radiosensíveis [4,15,16,23].

Contudo, a grande vantagem da radioimunoterapia sobre imunoterapia ou radioterapia consiste no princípio empregado. Diferente de radioterapia feita com aplicação de feixes de doses intensas em espaços de tempo curto, a RIT é feita utilizando-se doses muito pequenas e radiação de LET baixo, porém por um período longo.

Os Radioimunoconjugados permanecem no sítio do tumor por dias e devido à meia-vida do radioisótopo utilizado, ocorre a garantia de emissão de energia de radiação significativa durante esse período. Portanto, a permanência da radiação constante por um período longo de tempo provoca alguns efeitos evidentes. Um desses efeitos é a possibilidade de reparo ou a recuperação celular sobre o efeito sub-letal provocado pela radiação de LET baixa usado em RIT durante o período de tratamento. Há estimativas de que o aumento de aproximadamente 20 % da taxa de dose é necessário para atingir o grau de sobrevivência onde o reparo celular não é possível [21].

Para uma RIT bem sucedida, a protocolo de tratamento deve ser planejado considerando-se os efeitos de proliferação celular que, infelizmente, ocorre durante o tratamento. Para frear a proliferação celular e manter a população celular constante existe a estimativa de que são necessárias taxas de doses entre 2 a 3 cGy/h, enquanto que taxas de dose alta são necessárias para provocar a regressão das mesmas células tumorais [21,83].

Outra vantagem do tratamento prolongado utilizando-se pequenas taxas de dose de radiação de RIT, diz respeito à re-vascularização de regiões hipóxicas dentro do tumor. Considerando que células no estado hipóxico anterior voltam ao estado aeróbico e tornam-se mais sensíveis e susceptíveis ao efeito deletério da radiação de LET baixo emitida pelos radioimunoconjugados espalhados "in loco" ou seja, dentro das células tumorais [21,83].

Resultados clínicos

O primeiro resultado clínico de RIT para linfomas e leucemia linfocítica crônica de células-B foi relatado por DeNardo e seus colaboradores em 1987 [27], que utilizaram o anticorpo Lym-1 marcado com o iodo-131, dirigido contra um antígeno variante (HLA-DR), fazendo uso de um modelo radioterápico de dose baixa fracionada com dose de radiação entre 30 e 60 mCi de atividade, distribuídas entre duas a seis semanas, até atingir a resposta máxima do tumor, bem como, a toxicidade limite da dose e desenvolvimento da HAMA (Human anti-mouse antibody response) ao atingir 300 mCi de atividade.

Dez entre os dezoito pacientes que participaram do estudo, apresentaram remissão completa de 55 % (RC). As RC foram atingidas quando mais de 260 mCi (9,6 GBq) de atividade do iodo-131 foi usado [4,17,27]. Esses resultados foram atualizados em 1998 quando DeNardo e seus colaboradores relataram o tratamento de vinte e um pacientes (seis com LNH baixo-grau, doze com grau-intermediário e três com alto-grau). Quatorze receberam mais de uma dose de RIT [17].

A dose máxima tolerada (DMI) foi de 100 mCi/m² para cada uma das duas doses aplicadas, separadas por um intervalo de 4 semanas. Do total de vinte e um participantes, onze (52 %) responderam ao tratamento, quatro (19 %) apresentaram a RP e sete (33 %) RC. A média de duração de resposta foi de dezesseis meses para baixo-grau, oito meses para grau-intermediário e somente cinco meses para a doença de alto-grau [17].

Outro resultado clínico importante relatado foi o resultado do primeiro ensaio de Fase I/II do estudo de RIT de anti-CD20 para LNH utilizando dosagens não-mieloblásticas de Tositumomab-¹³¹I, uma experiência realizada na Universidade de Michigan, EUA. Dos cinquenta e nove pacientes participantes do estudo, quarenta e dois (71 %) responderam ao tratamento, vinte com RC (34 %). A média de sobrevivência sem a progressão da doença foi de doze meses para todas as respostas, e vinte meses para os pacientes com remissão completa (RC). Sete (12 %) pacientes permaneceram sem a doença entre três e seis anos de vida. Quatro desses pacientes (7 %) recaíram após ASCT (autologous stem cell transplantation) [19].

Há relato de um trabalho publicado em 2004 de um estudo de RIT Fase II usando Tositumomab e Tositumomab-¹³¹I para LNH de células-B indolente e transformado. Dos quarenta e um pacientes, trinta e um (76 %) responderam ao tratamento, vinte (49 %) atingiram a remissão completa (RC) ou remissão completa não confirmada (RC(u)), onze (27 %) atingiram remissão parcial (RP). Em ambos os casos, a taxa de resposta é similar (76 %) em forma indolente, e (71 %) em LNH transformado. A média de duração total sem progressão da doença para ambos foi de um ano e três meses. Onze (27%) pacientes continuaram em RC ou RC(u) de quase três anos a cinco anos e dois meses após a terapia. Em geral, a terapia foi bem tolerada e a toxicidade hematológica foi o principal efeito adverso encontrado dentro do estudo [4,12,16].

Além disso, Bienert e seus colaboradores em 2005 relataram o resultado de um estudo avaliando a segurança, toxicidade e a resposta terapêutica de RIT, usando dosagem não-mieloblástica de Rituximab-¹³¹I em pacientes com células-B de LNH previamente tratados com quimioterapia seguida de ASCT. Obtiveram (10 %) de remissão completa com duração de quatorze meses, dois pacientes (22 %), com remissão parcial com regressão de doze a treze meses após o tratamento. Um dos pacientes com RP recebeu um novo tratamento com RIT e ficou livre da doença por mais sete meses.

Quatro pacientes com doença avançada ou massa volumosa entre os que responderam ao tratamento morreram quase cinco meses após o tratamento. Três pacientes desenvolveram taxa alta de soro lactose desidrogenase (SLD) antes da RIT e nenhum deles respondeu ao tratamento. Dos pacientes que receberam RIT como tratamento adicional após quimioterapia, um deles continuou com a doença após nove meses e o outro teve recaída cinco meses após acompanhamento. A toxicidade hematológica reversível de nível três em quatro ocorreu em sete dos nove pacientes.

Os pesquisadores concluíram que a radioimunoterapia com Rituximab-¹³¹I em pacientes com LNH de células-B previamente tratados com quimioterapia é seguro e bem tolerado, e que quatro entre dez terapias induz respostas. Mas concluíram que RIT é menos eficiente em pacientes com alto-grau e com SLD alto. A toxicidade hematológica severa ocorrida em sete pacientes não provocou nenhum problema clínico significativo. Todavia, afirmaram que RIT parece ser uma opção terapêutica adicional para pacientes com células-B refratários cuidadosamente selecionados [4,28,30].

Vose e seus colaboradores em 2000 conduziram um estudo multi-institucional Fase II com Tositumomab-¹³¹I para RIT de LNH de células-B de baixo-grau transformado, refratário e quimioterapia recorrente. Entre os quarenta e sete pacientes participantes do estudo, quarenta e cinco (96 %) foram tratados com uma única dose terapêutica. Vinte e sete (57 %) pacientes responderam. A taxa de resposta é idêntica ou similar para os pacientes com baixo-grau (57 %) e baixo-grau transformado (60 %). A média de sobrevivência livre da doença foi de quase dez meses. Quinze pacientes (32 %) tiveram RC. A média de duração dos RC foi de quase vinte meses, e seis pacientes (13 %) tiveram RC em andamento no término do estudo. Os pesquisadores concluíram que o tratamento foi bem tolerado, sendo a toxicidade hematológica a única reação adversa observada no estudo [20].

Contudo, atualmente, há treze anticorpos monoclonais liberados para uso terapêutico, entre os quais somente dois radiomarcados liberados para uso; ambos para o tratamento de LNH: Tositumomab-¹³¹I (Bexxar; Corixa Corp., Seattle, WA, USA), e Ibritumomab-⁹⁰Y tiuxetan (Zevalin, IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA) [4,15,16,24,32]. Atingiu-se uma taxa de remissão global de 67 % em pacientes de LNH tratados com Zevalin (4,15,24,32,59).

Experiências com uma única dosagem de Bexxar em quinhentos e oitenta e dois pacientes em cinco ensaios clínicos resultaram em remissões com média de duração de três meses a seis anos. Um total de cento e sessenta e um (28 %) pacientes tiveram remissão completa (RC), com média de duração de quase cinco anos [15,24]. Segundo os pesquisadores, esses dois radiofármacos demonstraram ter a sua eficácia terapêutica aumentada, não somente por serem conjugados a radionuclídeos apropriados, mas também por serem dirigidos ao antígeno com especificidade e afinidade definida [24].

Principais métodos de radioiodação

Na área clínica, anticorpos monoclonais marcados com iodo-131, iodo-123 e iodo-124 foram muito utilizados no diagnóstico e tratamento de vários tipos de cânceres [44,45,47].

Vários métodos e técnicas foram propostos e empregados na radioiodação de proteínas, seus fragmentos e peptídeos: **método direto** por meio de substituição eletrofílica oxidativa pelo uso de agentes oxidantes como a Cloramina-T ou Iodogen, pela oxidação enzimática utilizando-se a lactoperoxidase, ou substituição eletrolítica com uso de células especiais eletrolíticas, e o **método indireto ou conjugação** através do uso de grupos prostéticos, entre outros.

Devido a sua simplicidade, o mais utilizado é o método direto utilizando-se Cloramina-T que resulta na introdução do iodo, na posição meta no anel fenólico dos resíduos de tirosina [43,44, 47,48,52].

Marcação de proteínas com Cloramina-T

A famosa técnica de Greenwood, ou Cloramina-T é a técnica mais utilizada em vários laboratórios de pesquisa por sua simplicidade e praticidade, porém com pequenas alterações, ajustadas às respectivas necessidades. Essa técnica consiste em submeter um anticorpo ou proteína a ser marcada ao iodeto radioativo, tamponado com adição de tampão fosfato pH 7,4 seguido de Cloramina-T. Após poucos minutos de reação à temperatura ambiente e sob agitação, a reação é terminada adicionando-se metabissulfato de sódio. Em seguida, o composto marcado pode ser purificado em coluna de gel filtrante, (Sephadex G-25) utilizando-se tampão PBS (fosfato-salina pH 7,5) [43,44,52,54].

Em geral, a coluna de Sephadex é eluída com 40 – 50 mL de solução tampão fosfato de sódio em frações de 0,5 mL. A atividade em cada fração é determinada, e as frações que contêm o produto marcado são misturadas. [44,52,54].

Apesar desse método ser mais utilizado para marcação de proteínas e polipeptídeos, alguns problemas específicos são associados ao seu uso. O primeiro problema é ser o método inadequado para a marcação de proteínas e peptídeos sem resíduos de tirosina. O segundo é que algumas proteínas apresentam alteração estrutural parcial durante a radioiodação, enquanto outros apresentam alterações permanentes [45].

Alterações estruturais sofridas pelas proteínas podem comprometer sua função biológica e, conseqüentemente, alterar a sua capacidade de ligação ao antígeno levando a baixa imunoreatividade desses anticorpos monoclonais [44,47,52]. Esses danos podem ser leves ou severos a ponto de deixar o anticorpo marcado impróprio para o uso. Há algumas evidências também de que danos dessa natureza são provocados por impurezas nocivas, presentes nas soluções do iodo proveniente de determinados fornecedores [45].

Um outro problema comum relativo aos anticorpos monoclonais radioiodados utilizando-se Cloramina-T, é a susceptibilidade desses anticorpos à dehalogenação *in vivo*. Esse fenômeno é atribuído à deiodinases endógenas devido à similaridade química do sítio de iodinação dos anticorpos monoclonais com os dos hormônios da tireóide [47].

Radiólise do anticorpo marcado

A eficiência de ligação e a estabilidade de compostos radioiodados são essenciais e determinantes para uma irradiação *in vivo* eficiente. Para que isso ocorra, deve-se evitar a decomposição ou a radiólise de compostos radioiodados durante armazenamento ou transporte. A ocorrência de autoradiólise é um problema em potencial quando alta atividade específica de radiação é incorporada aos anticorpos monoclonais usados para terapia [42,72,73].

Em geral, a ocorrência de autoradiólise em compostos radiomarcados é um fato preocupante, pois isso comprometerá a sua capacidade e eficiência terapêutica. Minimizar os efeitos deletérios atribuídos à radiólise de compostos radiomarcados por iodo-131 e ítrio-90, ou outros radioisótopos beta emissores, é de suma importância na preparação de formulações clínicas para radioimunoterapia [23,77-80].

A radiólise pode ocorrer e se manifestar como problema tanto durante o processo de marcação como durante armazenamento do composto radiomarcado até sua administração ao paciente. Esse entrave em potencial é característico dos beta emissores, visto que possuem alta energia, e as altas doses de radioatividade incorporadas aos anticorpos monoclonais podem além de irradiar o tumor, irradiar potencialmente a molécula do anticorpo. A conseqüência direta disso é a sua capacidade em destruir ou modificar a atividade biológica do anticorpo, principalmente a afinidade do anticorpo pelo antígeno dirigido [23,72-74,77,80].

Contudo, a degradação radiolítica em compostos radiomarcados tem sido o maior desafio no campo de pesquisa e desenvolvimento de radiofármacos para aplicações terapêuticas. Normalmente, o grau de decomposição é diretamente proporcional à atividade total empregada. Isto é, a decomposição é mais lenta em compostos com baixa concentração radioativo de atividade (< 4mCi/mL) do que em compostos com altas concentrações radioativo de atividade (>10mCi/mL) [72,74,80].

Porém, compostos radiomarcados podem permanecer relativamente estáveis em níveis de até 20 mCi, em temperatura ambiente, enquanto que compostos com 100 mCi podem se decompor rapidamente nas mesmas condições de conservação e armazenagem [75].

A decomposição radiolítica se inicia no término do processo da marcação. Porém a vida útil de radiofármacos reconstituídos ou não é ditada pela sua pureza radioquímica (PRQ). Isto é, a porcentagem do produto marcado contido no produto final menos a impureza presente na marcação. Compostos ou produtos com alta pureza radioquímica são considerados ideais e seguros para aplicação terapêutica, e são capazes de produzir maior efeito terapêutico desejado. Em contrapartida, produtos com pureza radioquímica baixa ou menor (<90%) têm seu uso desaconselhado, pois acredita-se que além de apresentar um certo risco ao paciente, são ineficazes em apresentar efeito terapêutico desejado [75].

Para solucionar esse problema, aditivos e estabilizantes ou procedimentos alternativos que podem aumentar a vida útil dos compostos radiomarcados são importantes e necessários em termos práticos e econômicos, considerando a conservação, logística e demanda [75,77,81].

Entretanto, a quantidade de solução estabilizadora usada em composições radiomarcadas ou conjugadas em temperatura de conservação e estocagem devem sempre ser ajustadas de acordo com a sensibilidade do composto marcado e em função da degradação ou decomposição radiolítica do composto radiomarcado [74].

Objetivo

O presente trabalho objetiva estudar a radioiodação do anticorpo monoclonal anti-CD20 com radioiodo (iodo-131), visando contribuir para a elaboração de um radiofármaco com potencial para tratamento de linfoma não-Hodgkin.

Estudar as condições de marcação do anticorpo anti-CD20 quimérico, Rituximab, Mabthera[®] com iodo-131, a estabilidade *in vitro* e *in vivo*, a imunoreatividade, e a distribuição biológica do composto marcado (anti-CD20-¹³¹I).

Materiais e métodos

Materiais

Reagentes e soluções

- Anticorpo anti-CD20 quimérico (humano-murínico), Rituximab, Mabthera®-Roche Brasil.
- Radioiodo-[¹³¹I]NaI Nordion – Canadá, processado no IPEN-CNEN/SP
- Cloramina-T (N-monocloro-p-toluenosulfonamida) – Merck, USA
- Metabissulfito de sódio –Merck, USA
- Fosfato de Sódio monobásico monoidratado (NaH₂PO₄. H₂O) – Merck, Brasil
- Fosfato dissódico (Na₂HPO₄) – Merck, Brasil
- Iodeto de Potássio – Merck, USA
- Metanol – grau HPLC - EM Science, USA
- Azida Sódica – Merck, USA
- Anti-CEA – Anticorpo Monoclonal Anti-antígeno carcinoembrionário Merck,USA
- Cloreto de Sódio – Merck, Brasil
- Polivinilpirrolidona (PVP) – Sigma, USA
- Glicose anidra – Merck, USA
- Ácido Gentísico – Sigma, USA
- Barbiturato de sódio – Amersham Bioscience, Brasil
- Ácido Ascórbico – Merck, Brasil
- Ficoll Paque 400 - Amersham Bioscience, Brasil
- Diatrizoato de sódio - Amersham Bioscience, Brasil
- Heparina – Roche, Brasil

Cabe salientar que todos os reagentes utilizados apresentam grau analítico, com exceção do metanol que foi utilizado com grau HPLC.

Equipamentos

- Contador Gama Cobra CR-276, Packard, USA.
- Cromatógrafo Líquido de alta Eficiência – Waters, com detetor UV (Waters) e detetor de radiação, Packard, USA.
- Balança Analítica, M-220 - Denver Instruments, USA.
- Calibrador de Dose, CRC – 35R, Capintec, USA.
- Centrífuga, CF 7D2 Himac Hitachi, USA.
- Monitor portátil de radiação 7013 – IPEN
- Balança Digital GM-300P Lutron, Brasil.
- pH metro – Tecnopon, Brasil.
- Banho maria Water Bath B-48/0 – Buechi, Brasil.
- Eletroforese – EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, USA.
- Agitador Vortex, USA.

Animais

Camundongos – *Swiss* adultos sadios, pesando entre 28 – 45 g - Biotério – IPEN/CNEN-SP

- Outros*
- Colunas de gel Sephadex G-25, PD10 Pharmacia, Biotec-Sweden.
 - Cubas cromatográficas de vidro – Perlab, Brasil.
 - Filtros millex 0,22 μm – Millipore, USA.
 - Placa cromatográfica impregnada com sílica gel 60 – Gelman Sciences, USA.
 - Papel cromatográfico Whatman n°. 1 – Whatman, USA.
 - Programa BIEXP de análise compartimental [82].

Métodos

Preparação de soluções de trabalho

Foram preparadas as seguintes reagentes e soluções:

- a) Solução tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,3 e 7,5
- b) Solução de Metanol 85 %
- c) Solução de Azida Sódica 0,05 %
- d) Solução tampão barbital 0,5 M, pH 8,6

Preparação do anticorpo monoclonal anti-CD20 (Rituximab-Mabthera®)

Para realizar as marcações foram colocados em tubos plásticos de marcação cônicos com tampa de 1,5 mL, alíquotas de 100 μg do anticorpo em 10 μL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5. Os tubos foram acondicionados sob refrigeração (2 –8 °C) de acordo com as recomendações do fabricante.

Estudo das condições de marcação do anticorpo monoclonal anti-CD20 com iodo-131

Neste estudo, a marcação do anticorpo anti-CD20 quimérico Rituximab, Mabthera® Roche, Brasil, com iodo-131 foi realizada por meio de adaptação da técnica de radioiodação direta de proteínas, relatada por vários autores, como Yalow & Benson (1960), Hunter & Greenwood (1962), Greenwood & Hunter, Glover (1963), e Berh, Th. M et al (2001), entre outros. Consiste em uma metodologia de incorporação direta, por meio de substituição eletrofílica, na qual o radioiodo (iodeto de sódio) é oxidado na presença da proteína ou anticorpo. Por meio de uso de Cloramina-T (N-monocloro p-tolueno sulfonamida) agente oxidante moderado, e metabissulfito de sódio como agente redutor para interromper a reação [43,44,51,52,54].

Para efetuar as marcações utilizou-se a solução de tampão de fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5 previamente preparada e armazenada em geladeira, e os demais reagentes (solução de iodeto de sódio, Cloramina-T, e metabissulfito de sódio) foram preparados no momento do uso.

- Reagentes e soluções:

- AcM anti-CD20 (Rituximab-Mabthera® Roche, Brasil) 100 µg / 10 µL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5
- Cloramina-T (1mg/mL) em solução tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,5
- Metabissulfito de sódio (2mg/mL) em solução tampão fosfato de sódio 0,2M pH7,5
- Na¹³¹I diluído em água destilada, 37 – 185 MBq (1 – 5 mCi) / 10 µL.
- Solução tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,5

➤ **Condição de marcação padrão:**

Num tubo de marcação foram colocados 100 µg em 10µL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 do anticorpo anti-CD20, 50 µL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7, 5; 10 µL de solução de Na¹³¹I (37 – 185 MBq) e 10 µL de solução Cloramina-T (1mg/mL). Após três minutos de reação à temperatura ambiente e sob agitação, adicionou-se 10 µL de solução Metabissulfito de sódio (2mg/mL).

➤ **Condição de marcação com atividade terapêutica:**

Num tubo de marcação foram colocados 10 mg em 1mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 do anticorpo anti-CD20, 100 µL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7, 5; 200 µL de solução de Na¹³¹I (2960 – 37000 MBq) e 10 µL de solução Cloramina-T (10mg/mL). Após três minutos de reação à temperatura ambiente e sob agitação, adicionou-se 10 µL de solução Metabissulfito de sódio (20mg/mL).

Estudo dos parâmetros de marcação

A massa da Cloramina-T, do anticorpo monoclonal anti-CD20, a atividade do iodo-131 e o tempo de incubação foram estudados. Variando-se um dado parâmetro, os restantes permaneceram constantes, ou seja, inalterado, de acordo com a condição de marcação padrão descrito anteriormente.

Avaliação da influência do tempo de incubação na pureza radioquímica da marcação

Desejando-se obter o melhor rendimento e pureza radioquímica do produto marcado em menor tempo de reação, variou-se o tempo de reação em um, três, e dez minutos, sendo os parâmetros restantes mantidos inalterados.

Avaliação da influência da massa de Cloramina-T na pureza radioquímica da marcação

Verificou-se a influência da massa do agente oxidante (CT) na pureza radioquímica (%) do produto marcado. A massa de Cloramina-T (CT) foi variada utilizando-se volume constante (µL) de solução de CT de concentrações diferentes (1 mg/mL, 10 mg/mL, e 20 mg/mL), ou seja, 10µg, 100 µg e 200µg de CT e os parâmetros restantes foram mantidos inalterados.

Para cada massa de Cloramina-T variada foi avaliada nos diferentes tempos de incubação.

Avaliação de influência da razão massa do anticorpo / atividade do iodo-131

Estudou-se o efeito da razão massa do anticorpo / atividade do radioiodo, para marcações com com atividade diagnóstica (37 a 185 MBq / 1 – 5 mCi) do radioiodo-131. Mantivemos as demais condições inalteradas.

O anticorpo monoclonal anti-CD20 (Rituximab-Mabthera[®]) foi diluído e aliqotado em 100, 50, 25, 10 µg / 10 µL em tubos de marcação. Os tubos foram marcados com atividade de 74 185 MBq / 10 µL de iodo-131.

O tempo de incubação também foi variado em um, três, e dez minutos em temperatura ambiente utilizando-se 100 µg de Ac e atividade diagnóstica.

Métodos utilizados na avaliação da pureza radioquímica do produto marcado

Foram avaliadas metodologias diferentes para determinar a pureza radioquímica do produto marcado (% do radionuclídeo incorporado à proteína) tais como:

- a) Cromatografia em camada delgada (ITLC-SG), utilizando-se fita de sílica gel 60 como fase estacionária e metanol 85 % como fase móvel. A proteína marcada foi aplicada a 1,50 cm da base da fita, que em seguida foi colocada na cuba (previamente saturada) contendo o solvente. A proteína marcada permanece na metade inferior da fita enquanto o radioiodo livre migra para a metade superior da fita.

Após a corrida, as fitas foram secas, cortadas em segmentos de 1cm para determinação de radioatividade em contador de radiação gama do tipo poço.

A TABELA 4 demonstra as distâncias de migração relativas (Rf) de cada espécie radioquímica observada na fita de ITLC-SG.

TABELA 4- Rf das espécies radioquímicas observados em fita de ITLC-SG e metanol 85 %

Componente	Rf
Anti-CD20- ¹³¹ I	0,0
¹³¹ I (livre)	1,0

- b) Eletroforese – a porcentagem de radioiodo livre nas marcações foi determinada utilizando-se eletroforese em papel Whatman 1 e solução tampão barbital 0,5 M, pH 8,6 como solvente, 300 V por 40 minutos. A proteína marcada foi aplicada a 1,50 cm da base da fita, que em seguida foi colocada na cuba contendo o solvente (solução tampão barbital 0,5 M, pH 8,6). A proteína marcada permanece na metade inferior da fita enquanto o radioiodo livre migra para a metade superior da fita.

Após a corrida as fitas foram secas, cortadas em segmentos de 1 cm para determinação de radioatividade em contador de radiação gama do tipo poço.

Purificação do produto marcado (anti-CD20-¹³¹I)

Purificou-se o produto marcado com o intuito de promover a redução da impureza existente no mesmo, na forma de iodo livre (íons iodeto que não se ligaram à estrutura do anticorpo anti-CD20).

O produto marcado foi transferido do tubo da marcação para a coluna Sephadex G-25 PD10, pré-lavada ou equilibrada com aproximadamente 40 mL de solução salina (NaCl 0,9 %). Em seguida, a coluna foi eluída com solução salina e foram recolhidas 12 frações de 1 mL cada, sendo que o produto marcado foi eluído na terceira e quarta frações. A atividade dos tubos foi determinada em calibrador de dose [44,54].

A pureza radioquímica (%) das frações reunidas que contêm o produto foi determinada através de cromatografia em fitas (duplicatas) de sílica gel (ITLC-SG), usando-se metanol 85 % como solvente.

Cálculo do rendimento de marcação

Para esse propósito, alguns dados foram coletados, como a atividade do produto no final do processo da marcação, a atividade inicial da coluna antes de iniciar as eluições, e atividade final da coluna após as eluições. Em seguida, realizou-se o cálculo do rendimento (%) do produto marcado purificado. Adotou-se como padrão o rendimento global, ou seja, rendimento global do produto final após sua passagem pela coluna, dividindo a soma das frações (tubos três e quatro) que contêm o produto pela atividade inicial, quando ainda no tubo de marcação antes da sua transferência para a coluna Sephadex G-25 PD10.

A fórmula utilizada no cálculo:

$$\text{Rendimento Global (\%)} = \frac{\mathbf{A (T3 + T4)}}{\mathbf{A (Ta)}}$$

(Eq.1)

A (Ta)

Onde:

A (T3 + T4) é a soma de atividade das frações que contêm o produto.

A (Ta) é a atividade inicial do produto antes da sua transferência para a coluna.

Estudo de estabilidade in vitro do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131

Estudo de estabilidade em Plasma Humano (PH)

Preparação de Plasma Humano

Amostras de plasma humano foram preparadas a partir de amostras de sangue coletadas de doadores voluntários. As amostras de sangue foram colocadas em tubos cônicos apropriados heparinizados e, em seguida, centrifugadas a 2500 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos à

temperatura ambiente. O plasma foi coletado dos tubos cônicos e misturado para formar uma única amostra de plasma.

Ensaio:

Para o produto marcado com atividade terapêutica de 2960 MBq (80 mCi), incubou-se 3,7 MBq (137 μ Ci) de atividade em 1,5 mL de plasma humano.

Da mesma forma, para o produto marcado com atividade diagnóstica de 92,5 MBq (2,5 mCi), incubou-se 37 MBq (1 mCi) de atividade em 1,5 mL de plasma humano.

Em seguida, verificou-se a estabilidade dos compostos por meio da determinação de pureza radioquímica (%) duas, quatro, seis, e 24 horas após a incubação, por meio de cromatografia em fitas (duplicatas) de sílica gel (ITLC-SG), usando-se metanol 85 % como solvente.

Estudo de estabilidade em Solução Estabilizadora de Polivinilpirrolidona (PVP)

Antes do ensaio propriamente dito foram realizados dois ensaios com finalidade comparativa. O produto (anti-CD20-¹³¹I) marcado com atividade terapêutica (2960 MBq/ 80mCi) e atividade diagnóstica (76,59 MBq/2,07mCi) foi conservado em geladeira (2 – 8 °C) e congelado (< –20°C sem a solução estabilizadora de polivinilpirrolidona, PVP).

➤ **Preparação da solução estabilizadora de polivinilpirrolidona (PVP)**

A solução de polivinilpirrolidona (PVP) para atividade terapêutica é composta de:

Glicose anidra (100mg), ácido ascórbico (10mg), cloreto de sódio (9,5mg), PVP, (500mg), dissolvidos em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5 e o pH final foi ajustado para 7,0 com 3,5 mL de solução de ácido clorídrico 1M.

A solução de PVP para atividade diagnóstica é composta de:

Glicose anidra (1mg), ácido ascórbico (10mg), cloreto de sódio (9,5mg), PVP (500mg), dissolvidos em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5 e o pH final foi ajustado para 7,0 com 3,5 mL de solução de ácido clorídrico 1M.

Ensaio:

O estudo de estabilidade em PVP foi realizado incubando-se o produto marcado (anti-CD20-¹³¹I) com atividade terapêutica (2960MBq) em solução estabilizadora de polivinilpirrolidona (PVP) preparada para alta atividade (10mL), e a mistura foi conservada em geladeira a 2 - 8 °C, ou congelada a – 20 °C; e o produto marcado (anti-CD20-¹³¹I) com atividade diagnóstica (24,5MBq) foi incubado em solução de PVP previamente preparada para baixa atividade (10mL), e a mistura foi conservada de 2 - 8 °C.

Em seguida, verificou-se a estabilidade dos compostos por meio da determinação de pureza radioquímica (%) duas, quatro, seis, e 24 horas após a incubação por meio de cromatografia em fitas (duplicatas) de sílica gel (ITLC-SG), usando-se metanol 85 % como solvente.

Estudo de estabilidade em Solução Estabilizadora de Ácido Gentísico

➤ **Preparação de solução Estabilizadora de Ácido Gentísico**

Para marcação com atividade terapêutica foram pesados 40 mg de ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzóico), dissolvidos em um mililitro de água destilada (40 mg/mL).

Para marcação com atividade diagnóstica foram pesados 1mg de ácido gentísico dissolvidos em um mililitro de água destilada.

Vale ressaltar que as duas soluções foram preparadas alguns minutos antes do ensaio e foram conservadas de 2 – 8 °C.

Ensaio

Após a marcação, o produto (anticorpo anti-CD20-¹³¹I) foi transferido ao frasco contendo a solução de ácido gentísico já preparada, e a mistura foi conservada em geladeira (2 – 8°C).

Em seguida, verificou-se a estabilidade dos compostos por meio da determinação de pureza radioquímica (%) duas, quatro, seis, e 24 horas após a incubação por meio de cromatografia em fitas (duplicatas) de sílica gel (TTLc-SG) [23,74,78,81].

Estudo de estabilidade em Solução Estabilizadora de Ácido Gentísico combinado com congelamento

Ensaio

Após a marcação, o produto (anticorpo anti-CD20-¹³¹I) foi transferido ao frasco contendo a solução de ácido gentísico já preparada, e em seguida, a mistura foi congelada (< –20°C).

Em seguida, verificou-se a estabilidade dos compostos por meio da determinação de pureza radioquímica (%) duas, quatro, seis, e 24 horas após a incubação por meio de cromatografia em fitas (duplicatas) de sílica gel (TTLc-SG) [23, 74,78,81].

Vale ressaltar que este ensaio foi realizado somente com o anticorpo anti-CD20 marcado com atividade terapêutica de 2960 MBq. Foi preparada uma solução nova de ácido gentísico para uso neste ensaio.

Estudo de estabilidade em Albumina Humana (A H) 20 %

O volume do anticorpo anti-CD20-¹³¹I marcado com atividade terapêutica foi elevado a 3 mL com albumina humana (AH) 20 % (2 mL) num frasco de penicilina (10 mL), em seguida conservado em geladeira a 2 – 8 °C.

O mesmo ensaio foi repetida para o anticorpo anti-CD20-¹³¹I marcado com atividade diagnóstica.

Em seguida, verificou-se a estabilidade das marcações por meio da determinação de pureza radioquímica (%) duas, quatro, seis, e 24 horas após a incubação por meio de cromatografia em fitas (duplicatas) de sílica gel (TTLc-SG) [54].

Estudo de Imunoreatividade do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131

A ligação específica (%) *in vitro* do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131 aos leucócitos foi determinada em comparação com a de outro anticorpo usado como controle, o anti-CEA (anti-antígeno carcinoembrionário) também marcado com iodo-131. Dado o fato de que os linfócitos normais expressam antígeno CD20, usou-se concentrado leucocitário rico em linfócitos-B preparado por meio de técnica descrita a seguir.

Preparação das amostras de concentrado leucocitário

Método de separação *in vitro* de leucócitos (rico em linfócitos) utilizando-se Ficoll-paque.

➤ **Princípio da técnica**

A amostra de sangue total contendo anticoagulante diluída em solução salina foi colocada acima de solução de Ficoll-paque, em seguida centrifugado por alguns minutos. A migração diferencial durante a centrifugação resulta na formação de camadas de diferentes tipos de células. A camada

de baixo é constituída de eritrócitos agregados e sedimentandos através da solução de Ficoll-paque.

A camada imediatamente acima contém, na maior parte, de granulócitos, que com a pressão osmótica da solução de Ficoll-paque ganha densidade suficiente para migrar e sedimentar-se acima dos eritrócitos.

Os linfócitos, com sua densidade baixa, são encontrados na interface entre o plasma e o Ficoll-paque, juntos com outras partículas de sedimentação lenta como plaquetas e os monócitos. Os linfócitos são removidos e lavados com solução salina para remover as plaquetas, Ficoll-paque e plasma.

➤ **Coleta de sangue e manuseio**

O uso de sangue fresco é importante para assegurar maior viabilidade de separação dos linfócitos.

1. Em tubo de ensaio de 10 mL, adiciona-se 2 mL de sangue contendo anticoagulante heparina, mais volume igual de solução salina (volume final 4mL).
2. Mistura-se a solução puxando-se para dentro e para fora da pipeta Pasteur.

➤ **Ensaio**

1. Coloca-se 3 mL de Ficoll-paque no tubo de centrifugação.
2. Adiciona-se com cuidado a amostra de sangue diluída (4 mL) acima do Ficoll-paque.
3. Centrifuga-se a 1600 rpm, 20 minutos à temperatura ambiente.
4. Retira-se a camada de linfócitos usando-se a pipeta Pasteur limpa. Cuidado deve ser tomado para não dispersar a camada de linfócitos.

➤ **Procedimentos para lavagem de linfócitos para remover as plaquetas**

1. A camada de linfócitos é transferida para um tubo de centrifugação limpo.
Obs: É importante a remoção total dessa camada, quantidade mínima de Ficoll-paque e um pouco de sobrenadante. A remoção excessiva de Ficoll-paque pode provocar a contaminação dos granulócitos, enquanto que a remoção excessiva do sobrenadante resultará na contaminação desnecessária por plaquetas e proteínas do plasma.
2. Adiciona-se pelo menos 3 volumes (6 mL) de solução salina aos linfócitos no tubo de centrifugação.
3. Suspende-se as células puxando-as suavemente para dentro e fora da pipeta Pasteur.
4. Centrifuga-se a 1500 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente.
5. Remove-se o sobrenadante.
6. Suspende-se os linfócitos em 5 mL de solução de PBS puxando-se o sobrenadante para dentro e fora da pipeta Pasteur.
7. Centrifuga-se a 1500 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente.
8. Remove-se o sobrenadante.

9. Os linfócitos devem ser suspensos no meio apropriado para serem usados. Cerca de 1500000 linfócitos em 3 mL de solução salina, são obtidos e são alíquotados em 6 tubos contendo 0,5 mL cada, constituindo 2 grupos de três tubos cada. O primeiro grupo (grupo 1) foi utilizado para estudo de imunoreatividade do anti-CD20¹³¹I e segundo grupo (grupo 2) do anti-CEA¹³¹I (branco).

3.3.8.2 Incubação dos anticorpos marcados com os leucócitos

Amostras de 10µL do composto marcado (anti-CD20-¹³¹I) foram adicionadas aos tubos do Grupo 1, e amostras de 10µL do controle (anti-CEA-¹³¹I) foram adicionadas ao Grupo 2. Em seguida, todos os tubos foram incubados em banho-maria à temperatura de 37 °C por uma hora.

Após incubação, as atividades nos tubos de ensaio foram determinadas em calibrador de dose e, em seguida, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes descartados. Um mililitro de solução salina foi adicionado aos tubos e foram suavemente misturados. O processo foi repetido e atividade das células foi determinada em calibrador de dose.

A ligação às células para cada tubo foi calculada da seguinte forma:

$$\frac{\text{Atividade final das células}}{\text{Atividade inicial das células}} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Por fim, calculou-se a média dos três tubos para anti-CD20-¹³¹I e anti-CEA-¹³¹I.

A ligação específica foi calculada de seguinte forma:

$$L E = (\text{Ligação do anti-CD20-}^{131}\text{I}) - (\text{Ligação do anti-CEA-}^{131}\text{I}) \quad (\text{Eq.3})$$

Estudo de distribuição biológica do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131

Foram realizados estudos de biodistribuição do composto marcado em camundongos da raça *Swiss*, sadios para determinar a porcentagem de acúmulo em órgãos e tecidos com relação à atividade do composto injetada, considerando-se que a radioatividade medida pode estar associada ao composto injetado ou a um produto de sua degradação.

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

Foram selecionados 12 camundongos adultos da raça *Swiss*, sadios pesando entre 28 a 45 g. Os animais foram separados em três grupos de quatro (n = 4), sendo cada grupo para cada horário de estudo, isto é, uma, quatro e vinte e quatro horas após injeção do produto. Foram injetados nos animais 0,74MBq (20 µCi/0,1mL) da amostra do anti-CD20-¹³¹I na veia caudal, e em seguida os animais, foram sacrificados nos tempos pré-determinados.

Amostras de sangue (100 µL) foram retiradas com capilar do sinus orbital antes dos animais serem sacrificados. Os órgãos / tecidos como o cérebro, tireóide, pulmão, coração, baço, fígado, estômago (vazio), músculo, rins, intestino delgado, intestino grosso, útero/ovário, rabo, foram retirados, lavados, pesados e, em seguida, colocados em tubos apropriados e a atividade dos mesmos determinada no contador gama tipo poço. Alíquotas, correspondentes à atividade injetada serviram de padrão de referência no cálculo da porcentagem da radioatividade captada por cada órgão / tecido, expressa em (%) atividade / órgão e (%) atividade / grama.

Vale ressaltar que os animais utilizados neste estudo não passaram por tratamento de bloqueio

da glândula tireóide, nem receberam nenhum tipo de anestésico.

A pureza radioquímica (%) do composto marcado utilizado no estudo de distribuição biológica foi previamente determinada, por meio de cromatografia em fitas (duplicatas) de sílica gel (ITLC-SG). O produto foi utilizado sem purificação, pois a pureza radioquímica observada foi superior a 95 %.

Fórmulas utilizadas nos cálculos biológicos:

$$\text{■ } \% \text{ Atividade / órgão} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \times 100 \quad (\text{Eq.4})$$

$$\text{cpm} \quad \text{padrão}$$

$$\text{■ } \% \text{ Atividade / grama} = \frac{\% \text{ dose / órgão}}{\text{peso do órgão correspondente}} \quad (\text{Eq.5})$$

peso do órgão correspondente

$$\text{■ } \text{volemia (mL)} = \text{peso corpóreo animal (g)} \times 0,07 \text{ (mL/g)} \quad (\text{Eq.6})$$

$$\text{■ } \% \text{Atividade/sangue total} = \frac{\text{volemia (mL)} \times \text{cpm sangue}}{\text{cpm padrão}} \times 100 \quad (\text{Eq.7})$$

cpm padrão

$$\text{■ } \% \text{ Atividade /grama músculo} = \frac{\text{cpm músculo (g)}}{\text{(cpm}_p \text{ massa amostra de músculo)}} \times 100 \quad (\text{Eq.8})$$

Onde: cpm = contagem por minuto.

Cpm_p = com padrão.

Os resultados de captação sanguínea foram analisados no programa BIEXP de análise compartimental, gentilmente cedido pela Dra. Murphy do Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México.

Resultados

Condições de marcação do anticorpo anti-CD20 com iodo-131

Neste estudo, avaliou-se as condições de marcação do anticorpo anti-CD20 (Rituximab, Mabthera-Roche, Brasil) com iodo-131, utilizando-se metodologia de incorporação direta do radioiodo e empregando-se Cloramina-T como agente oxidante. Obteve-se um produto com pureza radioquímica superior a 96 % ($96,65 \pm 0,23$ / $95,23 \pm 2,80$ n=3) logo após a marcação, e inferior a 90 % ($86,18 \pm 0,48$ / $88,07 \pm 0,83$ n=3) 24 horas após marcação. Os valores descritos foram obtidos com os métodos de cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) e eletroforese, respectivamente.

Não foram observadas diferenças significativas entre os métodos de análise de pureza radioquímica utilizados, como apresenta a TAB. 5. Por questões de praticidade para realização do ensaio, optamos, na maioria dos estudos, pela determinação da pureza radioquímica (PR) utilizando-se o método cromatográfico.

4.1.1 Influência do tempo de incubação na pureza radioquímica da marcação

A TABELA 5 e FIGURA 1 apresentam o resultado do estudo de variação do tempo de incubação na pureza radioquímica da marcação.

TABELA 5- Pureza radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20-¹³¹I determinada por cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) e eletroforese nos tempos de incubação estudados.

Tempo (min)	Pureza Radioquímica (%)			
	ITLC-SG		Eletroforese	
	Imediato	24 hs	Imediato	24 hs
1	$96,65 \pm 0,25$	$86,18 \pm 0,48$	$95,23 \pm 2,80$	$88,07 \pm 0,83$

3	97,54 ± 1,45	87,12 ± 0,25	96,14 ± 0,35	85,64 ± 0,45
10	96,82 ± 0,26	86,56 ± 0,45	96,49 ± 0,13	86,75 ± 0,68

(N=5)

Não se observa diferença substancial nos valores obtidos nos tempos estudados, nem entre os métodos utilizados (ITLC-SG/ eletroforese) para determinação de pureza radioquímica.

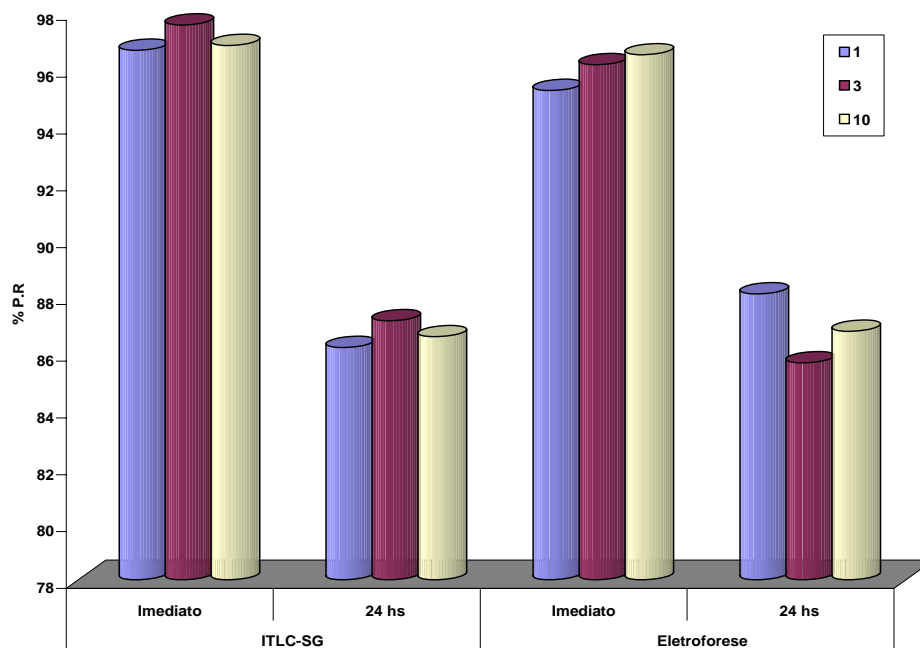


FIGURA 1- Pureza radioquímica do anticorpo anti-CD20-¹³¹I: variação do tempo de marcação e comparação dos métodos de ensaio.

4.1.2 Avaliação de influência de massa de Cloramina-T na pureza radioquímica do anticorpo anti-CD20-¹³¹I

A TABELA 6 demonstra os valores da pureza radioquímica (%) quando a massa de Cloramina-T foi alterada para diferentes tempos de incubação.

TABELA 6- Pureza Radioquímica (%) x massas de cloramina-T e tempos de incubação.

Tempo(min)	Pureza Radioquímica (%)		
	Massa de Cloramina-T (µg)		
	10	100	200
1	96,27 ± 0,30	96,19 ± 0,90	95,85 ± 5,21
3	96,29 ± 0,13	98,00 ± 0,02	94,10 ± 0,61
10	96,84 ± 1,19	96,85 ± 0,04	95,21 ± 0,51

(N = 3).

Avaliação da influência da razão entre massa do anticorpo e a atividade do iodo-131

A TABELA 7 apresenta os valores obtidos no estudo de variação da razão massa anticorpo e atividade do iodo, quando massas de 100, 50, 25 e 10 μ g do anticorpo anti-CD20 foram marcados com 74 MBq (2mCi) de atividade do iodo-131. A TAB. 7 também descreve a estabilidade das respectivas preparações até 24 hs da preparação.

TABELA 7- Pureza Radioquímica (%) de marcação realizada com diferentes razão de massa Ac / atividade do iodo-131.

Pureza Radioquímica (%)				
Massa do Anticorpo / Atividade do Iodo-131 (μ g) / (MBq)				
Tempo	100 / 74	50 / 74	25 / 74	10 / 74
Imediato	96,20 \pm 0,14	96,01 \pm 0,10	95,31 \pm 0,08	89,52 \pm 0,48
2 h	95,86 \pm 0,19	95,86 \pm 0,19	95,04 \pm 0,08	88,82 \pm 0,46
4 h	95,74 \pm 0,27	95,62 \pm 1,51	94,71 \pm 0,83	88,30 \pm 0,28
6 h	94,28 \pm 1,74	95,30 \pm 0,08	94,42 \pm 1,72	87,02 \pm 0,17
24 h	87,54 \pm 0,71	87,02 \pm 0,39	84,87 \pm 0,50	74,75 \pm 0,56

(N = 3)

Purificação do anticorpo anti-CD20-¹³¹I

Após passar o produto marcado por coluna Sephadex G-25 PD10, obteve-se um produto com pureza radioquímica elevada com redução de porcentagem de iodo livre (iodeto) como mostra a TAB. 8.

A TAB. 8 apresentam os valores de pureza radioquímica do produto purificado e não purificado, comparativamente.

TABELA 8- Pureza Radioquímica (%) do produto marcado purificado e não purificado.

PUREZA RADIOQUÍMICA (%)				
Tempo (min)	Produto Não purificado		Produto Purificado	
	Imediato	24Horas	Imediato	24Horas
1	97,75 \pm 0,01	93,65 \pm 0,45	99,38 \pm 0,40	95,77 \pm 1,69

3	96,12 ± 0,01	92,32 ± 1,28	97,17 ± 0,34	92,90 ± 2,20
10	96,82 ± 1,17	79,10 ± 0,01	98,10 ± 0,20	94,99 ± 2,38

(N = 3).

Rendimento de marcação do anticorpo anti-CD20-¹³¹I

O rendimento de marcação do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131 foi calculado em diferentes condições de marcação, mais especificamente, ao variar-se o tempo de incubação e massa do agente oxidante (Cloramina-T). A TAB. 9 descrevem o valor de rendimento (%) obtido em condição de marcação padrão (valores em negrito) e quando a massa de Cloramina-T foi variada com o tempo de incubação.

TABELA 9- Rendimento (%) do anticorpo anti-CD20-¹³¹I quando a massa de Cloramina-T (CT) foi variada com tempo de incubação.

Tempo(min)	Rendimento de Marcação (%)		
	10 µg CT / 10 µL	100 µg CT / 10 µL	200 µg CT / 10 µL
1	89,61 ± 7,45	53,23 ± 8,22	73,93 ± 7,83
3	86,65 ± 0,75	64,58 ± 5,40	68,48 ± 5,34
10	84,56 ± 0,24	67,68 ± 3,64	67,68 ± 3,70

(N = 3).

Estabilidade *in vitro* do anticorpo anti-CD20-¹³¹I

TABELA 10- Pureza radioquímica (%) da marcação de 100µg de anti-CD20 com 2960 MBq (80mCi) de iodo-131.

Pureza Radioquímica (%)				
Imediato	2 h	4 h	6 h	24 h
92.18 ± 0.37	91.67 ± 0.50	91.42 ± 0.65	90.53 ± 1.45	88.27 ± 0.63

(N=3)

A TAB.10 representa a pureza radioquímica da marcação conservada sob refrigeração.

Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I incubado em plasma humano

O anticorpo anti-CD20 marcado com atividade terapêutica de 2960 MBq (80mCi), foi incubado em plasma humano de forma a simular a distribuição de atividade do radiofármaco na corrente sanguínea de um indivíduo adulto, (3,7 µg / 1,5mL de plasma humano). O produto apresentou alta pureza radioquímica, superior a 97,0 %, mantendo-se alta após 24 h horas de incubação,

como apresenta a TAB. 11. O anticorpo anti-CD20 marcado com atividade diagnóstica porém incubado em plasma humano em concentrações radioativa de 37 MBq / 1,5 mL apresentou menor estabilidade (TAB. 11).

TABELA 11- Pureza Radioquímica do anticorpo anti-CD20-¹³¹I incubado em plasma humano (PH) em diferentes concentrações de atividade.

Estabilidade da Marcação		
Pureza Radioquímica (%)		
Tempo	Atividade Terapêutica (3,7 MBq) /1,5 mL PH	Atividade Diagnóstica (37MBq) /1,5 mL PH
Imediato	97,75 ± 0,08	95,35 ± 0,89
2 h	97,54 ± 0,17	91,62 ± 0,25
4 h	97,05 ± 0,02	91,23 ± 1,17
6 h	96,91 ± 0,07	91,20 ± 1,17
24 h	96,84 ± 0,24	90,78 ± 0,58

(N = 3)

Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I incubado em solução estabilizadora de polivinilpirrolidona (PVP)

Nas TAB. 12 e TAB. 13 estão apresentados os dados obtidos dos estudos preliminares para efeito de comparação. A primeira tabela demonstra pureza radioquímica do anticorpo anti-CD20 marcado com atividade terapêutica, conservado sob refrigeração à temperatura de 2 - 8 °C e congelado à temperatura ≤ - 20 °C, enquanto que a segunda demonstra a pureza radioquímica do anticorpo anti-CD20 marcado com atividade diagnóstica, também conservado sob refrigeração e congelado. Vale ressaltar que as duas marcações foram conservadas sem a solução estabilizadora de polivinilpirrolidona (PVP).

TABELA 12- Pureza Radioquímica (%) do produto marcado com atividade terapêutica conservado sob refrigeração e congelado.

Pureza Radioquímica (%)		
Atividade Terapêutica 2960 MBq (80mCi)		
Tempo	Refrigerado	Congelado

Imediato	96,41 ± 0,25	96,41 ± 0,25
2 h	92,32 ± 0,15	93,94 ± 0,64
4 h	88,48 ± 1,11	93,79 ± 0,20
6 h	88,30 ± 2,28	93,77 ± 0,14
24 h	74,08 ± 0,85	93,52 ± 0,28

(N = 3)

TABELA 13- Pureza Radioquímica (%) do produto marcado com atividade diagnóstica conservado sob refrigeração e congelado.

PUREZA RADIOQUÍMICA (%)		
Atividade Diagnóstica 76,59 MBq (2,07mCi)		
Tempo	Refrigerado	Congelado
Imediato	97,27 ± 0,11	97,54 ± 0,49
2 h	95,78 ± 0,51	96,94 ± 0,07
4 h	95,00 ± 0,47	96,91 ± 0,17
6 h	94,70 ± 0,34	96,19 ± 0,01
24 h	89,50 ± 0,11	89,50 ± 0,11

(N = 3)

A TAB. 14 apresenta os resultados de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I marcado com atividade terapêutica e diagnóstica incubados em solução estabilizadora de polivinilpirrolidona (PVP).

TABELA 14- Pureza Radioquímica (%) do produto marcado incubado em solução PVP com atividade terapêutica e diagnóstica.

Pureza Radioquímica (%)		
Tempo	Atividade Terapêutica	Atividade Diagnóstica
	2960 MBq (80mCi) /10mL	90,6 MBq (2,45 mCi) / 10mL
	PVP	PVP
Imediato	97,54 ± 0,17	96,28 ± 1,31
2 h	96,62 ± 0,72	95,62 ± 1,86
4 h	96,51 ± 0,07	94,88 ± 0,77
6 h	93,70 ± 0,26	92,84 ± 2,56
24 h	91,66 ± 0,01	92,27 ± 0,08

(N = 3)

Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I com Ácido Gentísico

A TAB. 15 apresenta os resultados de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I marcado com atividade terapêutica e diagnóstica utilizando-se ácido gentísico como agente estabilizador.

TABELA 15- Pureza Radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20-¹³¹I utilizando-se Ác Gentísico.

Tempo	Pureza Radioquímica (%)	
	Atividade Terapêutica	Atividade Diagnóstica
	2960MBq (80mCi)	240,5MBq (6,5mCi)
Imediato	98,68 ± 0,87	98,72 ± 0,66
2 h	98,78 ± 0,02	98,42 ± 0,50
4 h	98,45 ± 0,47	98,31 ± 0,29
6 h	97,77 ± 0,35	97,80 ± 0,35
24 h	92,61 ± 0,69	96,78 ± 0,06

(N = 3)

Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I com Ácido Gentísico combinado com Congelamento

A TAB.16 apresenta os resultados de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I marcado com atividade terapêutica (2960 MBq), obtida quando ácido gentísico foi usado em conjunto com a baixa temperatura, ou seja, congelamento (-20°C).

TABELA 16- Pureza Radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20-¹³¹I utilizando-se ácido gentísico combinado com congelamento.

PUREZA RADIOQUÍMICA (%)				
Ác Gentísico / Congelamento				
Imediato	2 h	4 h	6 h	24 h
98,11 ± 0,06	97,01 ± 0,73	96,60 ± 0,06	97,30 ± 0,20	95,98 ± 0,01

(N = 3)

Estudo de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I incubado em soro Albumina Humana (SAH) 20 %

A TAB.17 apresenta os resultados de estabilidade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I marcado com atividade terapêutica e diagnóstica, obtidos quando as preparações foram incubadas em solução de soro albumina humana 20 %.

TABELA 17- Pureza Radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20-¹³¹I incubado em soro Albumina Humana 20 %.

Tempo	Pureza Radioquímica (%)	
	Atividade Terapêutica 2960MBq/2mL SAH 20 %	Atividade Diagnóstica 240,5MBq/2mL SAH 20 %
Imediato	97,95 ± 0,42	97,30 ± 0,15
2 h	96,97 ± 0,38	96,52 ± 0,06
4 h	96,86 ± 0,55	96,08 ± 0,35
6 h	96,08 ± 0,35	95,95 ± 0,19
24 h	94,26 ± 0,18	94,83 ± 0,20

(N = 3)

A TAB.18, a seguir, demonstra em detalhes dados obtidos de estudos de estabilidade *in vitro* do anticorpo anti-CD20 marcado com atividade terapêutica em diferentes condições estabilizadoras. Isto facilita a comparação ou avaliação em termos de eficiência de cada um das condições utilizadas.

TABELA 18- Pureza Radioquímica (%) comparativa do anticorpo anti-CD20-¹³¹I utilizando-se diferentes condições estabilizadoras.

Tempo	Pureza Radioquímica (%)					
	Cong.	Cong+PVP	PVP	Ác Gentis	Ác Gent+Cong	SAH 20%
Imediato	96,41±0,25	96,38±0,39	97,54±0,17	98,68±0,87	98,11±0,06	97,75±0,42
2 h	93,94±0,64	97,04±0,07	96,62±0,72	98,78±0,02	97,01±0,73	96,97±0,38
4 h	93,79±0,20	96,38±0,54	96,51±0,07	98,45±0,47	96,60±0,06	96,86±0,55

6 h	93,77±0,14	96,70±0,15	93,70±0,26	97,77±0,35	97,30±0,20	97,07±0,00
24 h	93,52±0,28	94,00±2,98	91,66±0,01	92,61±0,69	95,98±0,01	94,26±0,18

(N = 3)

O mesmo resultado comparativo pode ser observado, de forma mais ilustrativa, como mostra a FIG. 2.

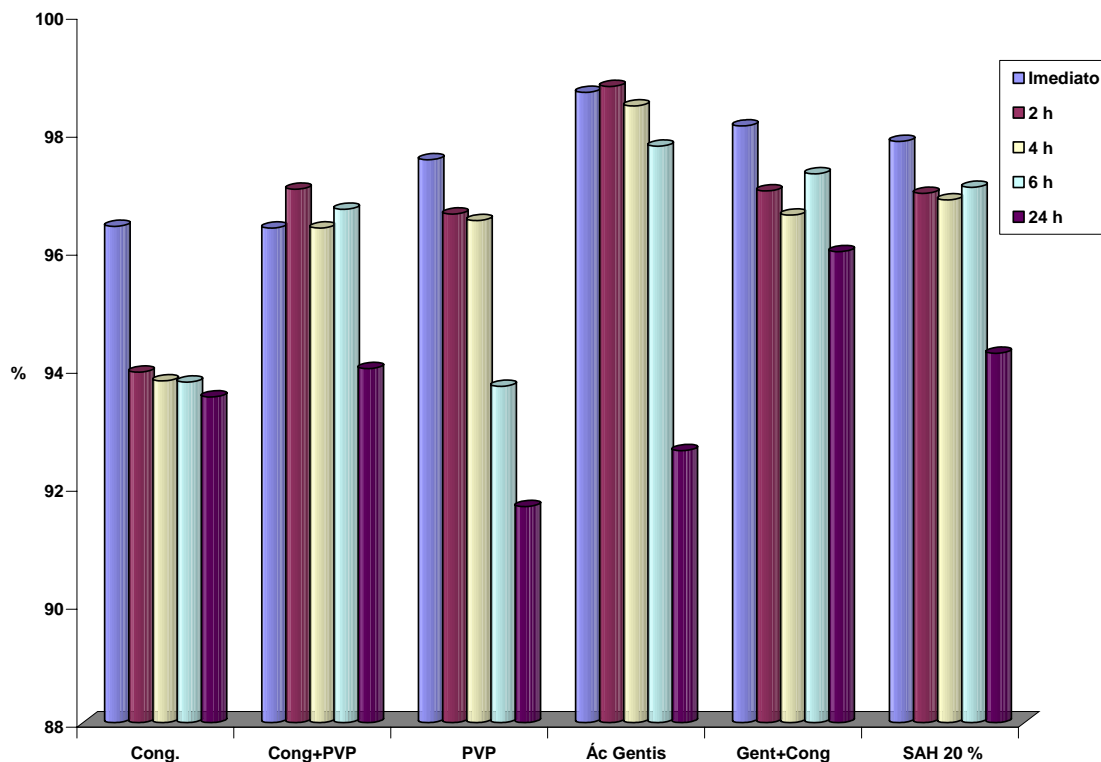


FIGURA 2- Pureza Radioquímica (%) do anticorpo anti-CD20-¹³¹I utilizando-se diferentes condições estabilizadoras.

A TAB. 19 e a FIG. 3 apresentam a estabilidade relativa, após 24 hs, do composto marcado utilizando-se diferentes estabilizantes. Os valores foram determinados considerando-se a pureza radioquímica inicial, como 100 % em todas as condições estabilizadoras, subtraindo-se deste valor inicial o decréscimo percentual observado após 24 hs de armazenamento. Esta normalização facilita a comparação entre os métodos utilizados para estabilização.

TABELA 19- Estabilidade Relativa do produto marcado após 24hs.

Estabilizante	% Relativas do Produto Após 24HS
Congelamento	97,00 %
Congelamento + PVP	97,53 %
PVP	93,97 %
Ác Gentísico	93,85 %

Ác Gentísico + Congelamento	97,83 %
Albumina Humana 20%	96,43 %

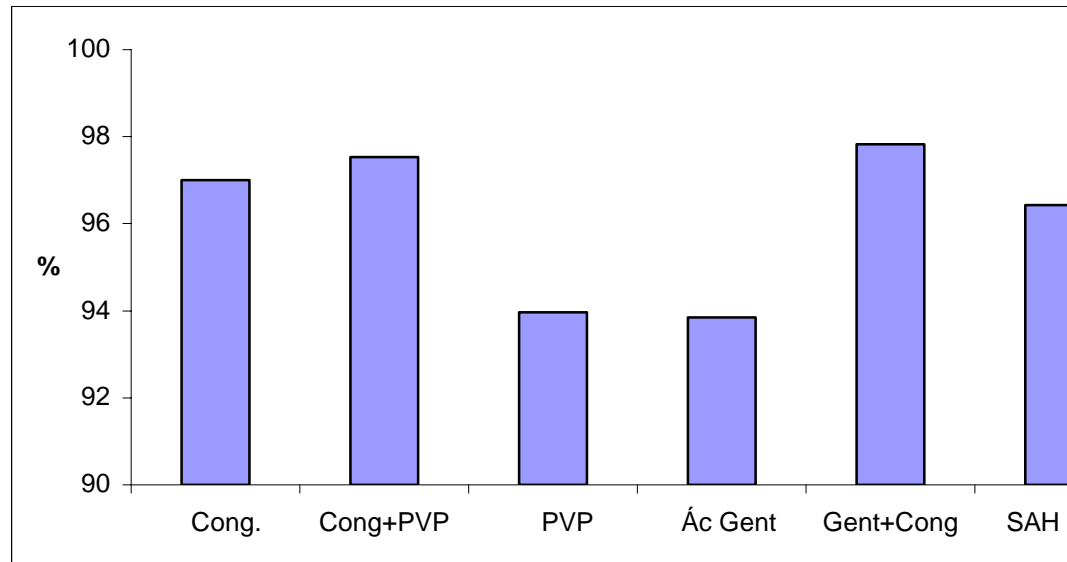


FIGURA 3- Estabilidade relativa do anti-CD20-¹³¹I em diferentes condições estabilizadoras após 24 hs de marcação.

Estudo de imunoreatividade do anticorpo anti-CD20-¹³¹I

A TAB. 20 demonstra os dados obtidos neste estudo de imunoreatividade realizado com anticorpos marcados na proporção de 100 µg do Ac para 74 MBq de ¹³¹I (atividade específico de (740 MBq / mg).

TABELA 20- Ligação *in vitro* (%) do anticorpo anti-CD20-¹³¹I e anti-CEA-¹³¹I a linfócitos sanguíneos.

LIGAÇÃO DO ANTICORPO MARCADO A LINFÓCITOS SANGUÍNEOS (%)				
Amostra	1	2	3	Média
Anti-CD20	3,91 %	3,49 %	4,08 %	3,83 ± 0,30
Anti-CEA	3,55 %	4,08 %	3,79 %	3,81 ± 0,26

(N = 3)

A ligação específica do anticorpo anti-CD20-¹³¹I foi determinada por meio de diferença:

$$(\text{média de anti-CD20-}^{131}\text{I} - \text{média de anti-CEA-}^{131}\text{I})$$

Ou seja,

$$3,83 \% - 3,81 \% = \mathbf{0,02 \%}$$

Distribuição biológica do anticorpo anti-CD20-¹³¹I

A TAB. 21 e FIG. 4 apresentam a captação dos órgãos e tecidos do anticorpo anti-CD20-¹³¹I expressas em (%) atividade / órgão e demonstram claramente que o grau de captação desses órgãos é relativamente proporcional ao tempo estudado. Isto é, a maior captação é observada na primeira hora estudada e observa-se o decréscimo nos tempos subsequentes, particularmente para os órgãos de grande circulação. Ao contrário, a captação na tireóide aumenta com o tempo, indicando o acúmulo de iodeto livre.

Igualmente, a TAB. 22 e FIG. 5 apresentam a captação dos órgãos e tecidos do anticorpo anti-CD20-¹³¹I expressas em (%) atividade / grama. O mesmo fenômeno observado na situação anterior se repetiu, ou seja, observa-se a captação acentuada nas primeiras horas, e na medida em que as horas passam essa captação diminuía acentuadamente.

TABELA 21- (%) Atividade / órgão do composto anti-CD20-¹³¹I em camundongos *Swiss* sadios nos tempos estudados.

Órgãos/Tecidos	% ATIVIDADE / ÓRGÃO		
	Tempo		
	1 h	4 h	24 h
Cérebro	0,43 ± 0,14	0,30 ± 0,10	0,14 ± 0,04
Tireóide	0,61 ± 0,23	1,96 ± 0,43	2,25 ± 0,38
Pulmão	4,60 ± 0,76	3,61 ± 1,74	1,45 ± 0,32
Coração	1,11 ± 0,13	0,98 ± 0,21	0,48 ± 0,15
Baço	1,00 ± 0,18	0,80 ± 0,15	0,34 ± 0,15
Fígado	13,30 ± 0,65	9,33 ± 0,29	3,54 ± 1,03
Estômago vazio	1,70 ± 0,36	1,65 ± 0,25	0,68 ± 0,28
Rins	3,42 ± 0,43	2,74 ± 0,24	0,81 ± 0,47
Intestino delgado	5,49 ± 0,36	7,41 ± 0,64	2,72 ± 1,01
Intestino grosso	1,08 ± 0,14	2,87 ± 0,82	1,40 ± 0,45
Útero/ovário	-	-	0,66 ± 0,32
Sangue Total	72,52 ± 7,91	47,31 ± 5,49	22,93 ± 3,12

(N = 4)

A FIG. 4 demonstra melhor os dados apresentados na TAB. 21, salvo os dados de sangue total que foram expressos na curva de clareamento sanguíneo do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131 apresentada na FIG. 5.

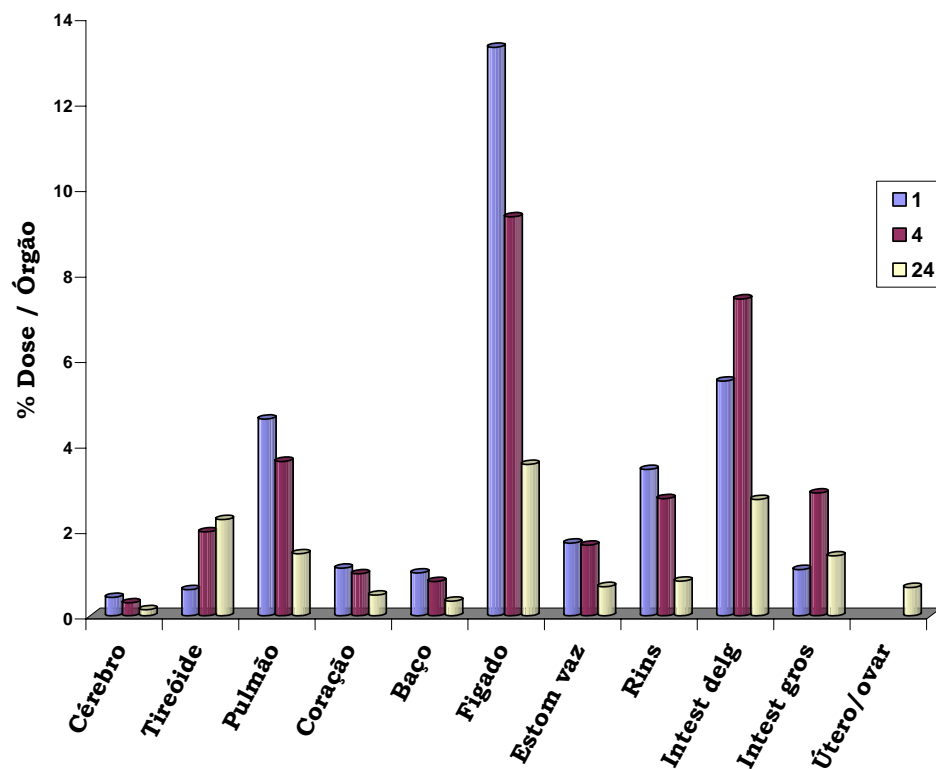


FIGURA 4- % Atividade / Órgão do anticorpo anti-CD20-¹³¹I em camundongos *Swiss* sadios.

A FIG. 5 demonstra o perfil do clareamento sanguíneo do anticorpo marcado de duas formas, a rápida demonstrada pela curva pequena, que se inicia aproximadamente à uma hora de produto injetado durando até três horas após, e a lenta demonstrada pela curva longa que se inicia no término da curva anterior durando até o término do tempo estudado (FIG.5).

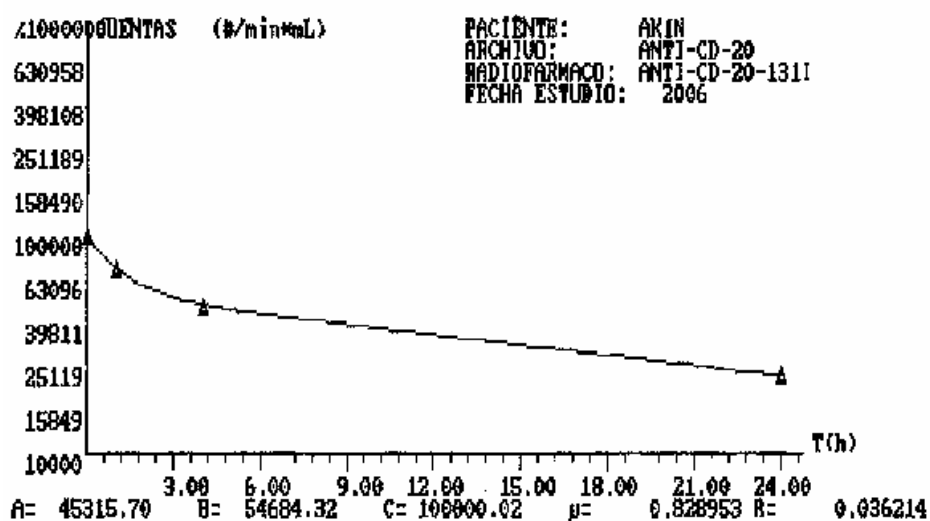


FIGURA 5- Curva de clareamento sanguíneo do anti-CD20-¹³¹I em camundongos *Swiss* sadios.

Os dados de captação sanguínea foram analisados no programa BIEXP (92) de análise compartimental, representando as componentes rápida e lenta do clareamento sanguíneo, com os respectivos tempos de meia vida ($t_{1/2}$).

Equação:

(Eq. 9)

$$C(t) = A \exp^{-\alpha t} + B \exp^{-\beta t}$$

$$C(t) = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

$$A = 45.315,70 \text{ \#/min.mL} \quad 45.315,70 \text{ \#/min.mL}$$

$$B = 54684,32 \text{ \#/min.mL} \quad 54.684,32 \text{ \#/min.mL}$$

$$\alpha = 0,8289528 \text{ 1/h} \quad 0,828 \text{ 1/h}$$

$$t_{1/2} = 0,8361721 \text{ (h)} \quad 0,836 \text{ h}$$

$$\beta = 0,0362138 \text{ (1/h)} \quad 0,036 \text{ 1/h}$$

$$t_{1/2} = 19,1404266 \text{ (h)} \quad 19,14 \text{ h}$$

Sendo: $C(t_0) = 100000 \text{ (\#/min.mL)}$

TABELA 22- % Atividade / Grama tecido do composto anti-CD20-¹³¹I em camundongos *Swiss* sadios nos tempos estudados.

Órgãos/Tecidos	% DOSE / ÓRGÃO		
	Tempo		
	1 h	4 h	24 h
Cérebro	1,15 ± 0,44	0,78 ± 0,25	0,32 ± 0,12
14,31 ± 2,92	8,58 ± 3,82	5,23 ± 1,41	8,05 ± 2,77
Baço	6,03 ± 1,13	2,46 ± 0,87	
Fígado	5,88 ± 2,50	5,51 ± 1,79	1,96 ± 0,74
Estômago vazio	9,84 ± 1,41	6,14 ± 0,94	2,21 ± 0,60
	7,85 ± 2,96	7,01 ± 1,54	2,30 ± 0,50

Rins	11,21 ± 2,01	6,84 ± 1,37	2,46 ± 1,47	Intestino
delgado	2,96 ± 0,34	3,32 ± 0,41	1,17 ± 0,15	
Intestino grosso	1,49 ± 0,17	2,84 ± 0,55	1,22 ± 0,16	
Útero/ovário	–	–	4,64 ± 1,63	Sangue
/ MI	35,00 ± 4,79	21,61 ± 3,37	10,79 ± 1,43	

(N = 4).

Na FIGURA 6 estão apresentados os dados gráficos da captação da porcentagem atividade/grama do anticorpo marcado que foram testados nos camundongos *Swiss* sadios.

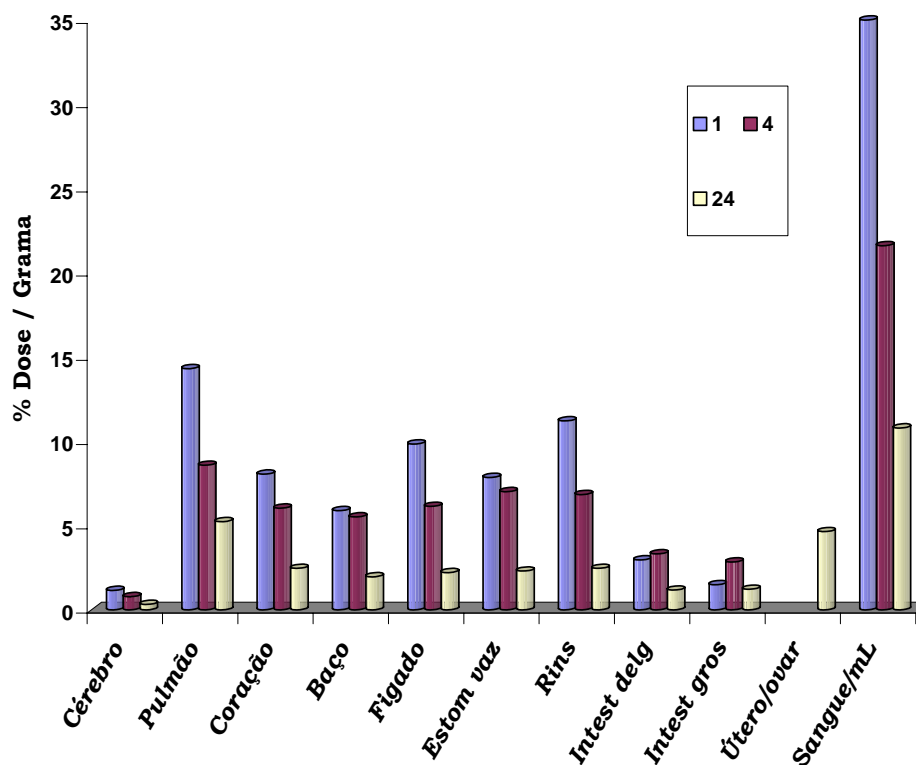


FIGURA 6- % Atividade / grama do anticorpo anti-CD20-¹³¹I em camundongos *Swiss* sadios.

Discussão

Neste estudo buscou-se as melhores condições de marcação do anticorpo monoclonal anti-CD20, (Rituximab - Mabthera[®]) com radioiodo-131, objetivando-se produzir um Ac marcado com alta atividade específica (MBq / mg do Ac). Utilizando-se o método direto de marcação de moléculas protéicas, apesar dos problemas teoricamente a ele associados, obteve-se produto com pureza radioquímica superior a 96 % ($96,65 \pm 0,23$ %) e o produto continuou com 89,58 % de sua pureza radioquímica inicial 24 hs após a marcação $86,18 \pm 0,48$. O método utilizado mostrou-se apropriado, pois é simples, rápido e com pureza radioquímica satisfatória, necessitando, entretanto, estabelecer métodos estabilizadores do produto marcado.

Foram avaliados dois métodos bastante utilizados na determinação de pureza radioquímica de anticorpos radiomarcados, são eles: a cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) e a eletroforese. A cromatografia em camada (ITLC-SG) mostrou-se um método simples, prático rápido e barato, enquanto que a eletroforese mostrou-se um método mais demorado, levando, no mínimo quarenta minutos para ser realizada a corrida, além da necessidade do equipamento. Apesar de serem dois métodos distintos, não foram observadas diferença significativas entre os resultados obtidos de pureza radioquímica (TAB. 5).

Na purificação do produto marcado em coluna Sephadex-G25 PD10, obteve-se um produto de alta % de pureza radioquímica com diminuição de porcentagem de impurezas (iodo livre) (TAB. 8). Diante dos resultados apresentados pelo método utilizado, pode-se afirmar que o método, além de ser prático e simples, foi eficiente para separação do anticorpo anti-CD20 marcado, do iodo livre.

O rendimento de marcação do anticorpo anti-CD20 marcado com o iodo-131 em duas condições diferentes de marcação (variando-se a massa de Cloramina-T e o tempo de incubação), mostrou-se melhor para o produto marcado sob condição padrão, isto é, com concentração de 1mg de Cloramina-T (10 µg de CT) com 3 minuto de tempo de reação (rendimento de 86,65 %).

Enquanto que o mesmo produto, porém marcado sob condição de 10 mg/ml de Cloramina-T (100 µg de CT) com 1minuto de tempo de reação apresentou rendimento inferior (53,23 %) ao apresentado pelo produto anterior. Igualmente, o anticorpo anti-CD20 marcado nas condições de 20 mg/ml de Cloramina-T (200 µg de CT) com 1minuto de reação apresentou rendimento também inferior (73,93 %) ao apresentado pelo mesmo produto nas condições padrão de marcação (TAB. 9).

O aumento da concentração da solução de CT promoveu diminuição no rendimento de marcação também para os demais tempos de reação avaliados (3 e 10 minutos)

O aumento na concentração de CT não promoveu alteração significativa nos resultados de pureza radioquímica, conforme observado na TAB. 6. Entretanto, causou alteração no rendimento da marcação, com maior perda de atividade causada por aderência da atividade nas paredes dos frascos de marcação.

Estudando-se a influência do tempo de incubação na pureza radioquímica do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131, (TAB. 6) pode-se deduzir que o produto pode ser marcado em qualquer dos tempos estudados, pois todos apresentaram pureza radioquímica superior a 96 %. Sugere-se a adoção de tempo dos 3 minutos como tempo ideal de incubação ou reação, considerando-se que seja suficiente para garantir a total oxidação do radioiodo. Acredita-se que quanto maior a oxidação do radioiodo, menor seria em termos quantitativos a forma não marcada ou livre de iodo. Em consequência disso, menor seria a quantidade de contaminantes ou resíduos da reação tais como o iodo na forma de iodeto e o anticorpo anti-CD20 não marcado. Além disto, o estudo demonstrou que o anticorpo anti-CD20 marcado com 3 minutos de incubação apresentou pureza radioquímica próxima a 98 % (TAB. 6).

Avaliando-se ainda a influência da massa de cloramina-T (CT) na pureza radioquímica do produto marcado (TAB. 6), não observa-se nenhuma diferença significativa nos valores obtidos,

confirmando a afirmação de Bolton e colaboradores, e Hutchinson e Ziegler [52,53]. Esses pesquisadores afirmaram que o aumento da concentração de Cloramina-T, não afeta a pureza radioquímica do composto marcado, enquanto que qualquer diminuição na concentração do mesmo, provoca uma diminuição correspondente ou proporcional na pureza radioquímica do composto marcado [52,53].

Quando variou-se a massa de Cloramina-T sem variar a massa do metabissulfato de sódio (MBS), igualmente, a pureza radioquímica do produto permaneceu inalterada, inclusive quando variou-se a massa da CT junto com o tempo de incubação (TAB. 6).

Variando-se a massa de Ac de 10 a 100 μg , para a atividade de 74 MBq (TAB. 7), não observou-se diferença significativa na pureza radioquímica determinada imediatamente após período de incubação. A diminuição da % de pureza radioquímica, entretanto, ficou mais evidente para a menor razão massa Ac / atividade, quando determinada a pureza radioquímica em função do tempo de armazenamento.

Todavia, isso vem a concordar com a afirmação de Greenwood e colaboradores (1963), de que a redução na massa de proteínas marcadas com a mesma atividade resulta no decréscimo da pureza radioquímica do composto final [44]. Essa afirmação também pode ser confirmada quando se comparam os valores de pureza radioquímica inferiores quando 100 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ do anticorpo foram marcados com atividade terapêutica de 2960 MBq (80mCi) como mostra a TAB. 10.

Essa baixa de rendimento pode ser atribuída ao fato da massa do anticorpo anti-CD20 ter sido insuficiente para incorporar tamanha atividade. Também é provável que com a massa menor do anticorpo ficassem mais evidentes os efeitos da energia beta alta do iodo-131 levando à radiólise do composto ou até um desligamento parcial do iodo aumentando desta forma a porcentagem de iodeto no composto marcado [57,58,59].

A estabilidade *in vitro* do anticorpo anti-CD20 marcado com atividades altas e baixas de iodo-131 foi avaliada em diferentes condições, considerando-se a ocorrência de auto-radiólise do composto marcado. O estudo da estabilidade do anticorpo marcado é um parâmetro de extrema importância no desenvolvimento de radiofármacos, devendo ser considerado o tempo entre o preparo, dispensação, transporte, até a eventual administração ao paciente [23,72,81]. No entanto, evitar ou reduzir ao mínimo a degradação radiolítica de compostos radiomarcados para uso em terapia considera-se como um dos principais desafios para os pesquisadores na formulação de radiofármacos, pois, os efeitos deletérios atribuídos à radiólise comprometem a eficácia terapêutica dessas formulações [74,77-80].

Na primeira condição de estudo de estabilidade, o anticorpo anti-CD20 marcado com atividade terapêutica foi incubado em plasma humano e a estabilidade determinada 2, 4, 6, e 24 hs após incubação. O mesmo apresentou pureza radioquímica superior a 97 % (97,54 %) 2 hs após incubação, e 24 hs depois ainda apresenta 99,07 % da pureza radioquímica inicial (96,84 %) (TAB. 11).

Este estudo foi realizado para avaliar, ainda que de forma não fisiológica, o efeito da ação de proteínas e enzimas plasmáticas na estabilidade do produto marcado. Para tanto, procurou-se incubar uma certa atividade do produto marcado com atividade terapêutica em um certo volume de plasma, como forma de simular a diluição da dose terapêutica no volume sanguíneo total de um indivíduo adulto (volemia de cerca de 5 L) de 70 kg.

No caso da marcação realizada com atividade diagnóstica, utilizou-se uma diluição diferente, de modo que a concentração radioativa final (MBq / vL plasma) foi 10 vezes maior que no caso anterior.

O resultado de estabilidade em plasma humano revelou certa estabilidade do composto marcado em função do tempo de incubação. A instabilidade foi mais acentuada para a condição de maior concentração radioativa, indicando tratar-se, com maior probabilidade, de um efeito de auto-radiólise do que um efeito degradativo por ação de enzimas plasmáticas.

Na segunda condição estudada, o anticorpo anti-CD20 marcado com atividade terapêutica foi conservado sob refrigeração (2 – 8 °C) e congelado (≤ -20 °C) e a estabilidade determinada 2, 4, 6, e 24 hs após incubação. O produto conservado sob refrigeração apresentou variações significativas na sua pureza radioquímica, variando em 4,43 % após 2 hs e chegando a 30,14 % de variação 24 hs depois (TAB. 12). O mesmo produto, porém, congelado apresentou menor variação na pureza radioquímica, variando de 2,63 % após 2 hs e 3,09 % 24 hs depois (TAB. 12). Segundo esse resultado, podemos dizer que o congelamento pode ser uma das alternativas eficientes para conservar o anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade, destinado à terapia. Na terceira condição estudada, verificou-se a estabilidade do anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade de iodo-131 em uma solução estabilizadora de polivinilpirrolidona (PVP). O produto apresentou alteração abaixo de 1 % na sua pureza radioquímica 2 hs após incubação e de 6,41 % 24 hs depois (TAB. 14). Com base neste resultado, a solução estabilizadora de polivinilpirrolidona (PVP) pode ser uma excelente abordagem para conservação de anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade, desde que o composto seja utilizado até no máximo 4 hs após sua incubação, quando ainda apresentar pureza radioquímica superior a 96 %. (TAB. 14).

Na quarta condição, estudou-se a estabilidade do anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade de iodo-131 utilizando-se o ácido gentísico como agente estabilizador.

O produto apresentou-se estável sem quase nenhuma alteração até 4 hs de incubação, apresentando apenas 1 % e 6,65 % de alteração 6, e 24 hs após incubação (TAB. 15).

Na quinta condição, avaliou-se a estabilidade do anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade de iodo-131 utilizando-se o ácido gentísico e congelamento como meio eficiente de inibir a auto-radiólise. Obteve-se um resultado que talvez seja mais apropriado ou eficaz na conservação do anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade do iodo-131, pois foi o que apresentou menor alteração de pureza radioquímica durante o tempo estudado, de apenas 2,22 %, após 24 hs de incubação (TAB. 16).

Na sexta condição estudada, a estabilidade do anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade de iodo-131 foi avaliada após incubação em soro Albumina Humana 20 % como agente estabilizador. O produto apresentou-se estável quase sem alteração aparente em sua pureza radioquímica durante o tempo estudado, mostrando somente uma alteração de 3,94 %, após 24 hs de incubação (TAB. 17). Este meio estabilizador, entretanto, apresenta a desvantagem de utilizar concentrado de proteína humana.

Como a pureza radioquímica inicial das marcações destinadas ao estudo de estabilidade nem sempre eram iguais, calculou-se a estabilidade relativa do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131 para as diferentes condições estabilizantes, após 24 hs, considerando-se a pureza radioquímica inicial como 100 % em todas as condições estabilizadoras, subtraindo-se deste valor inicial o decréscimo percentual observado após 24 hs de armazenamento (TAB. 19). Esta abordagem facilitou a comparação entre os métodos utilizados no estudo. Apesar de todos apresentarem estabilidade relativa superior a 90 %, indicando uma certa eficácia, observou-se que nenhum dos métodos sozinho inibiu totalmente a ocorrência de radiólise.

Entre todas as condições estudadas, as que empregaram a solução estabilizadora de PVP e ácido gentísico podem ser consideradas como as menos eficazes em assegurar a estabilidade do

produto marcado nas condições estudadas. Acredita-se, entretanto, que resultados melhores possam ser obtidos se ajustadas as concentração de seus ingredientes, sempre em relação à atividade empregada na marcação.

As condições estabilizadoras de congelamento sem PVP, e com PVP, e Albumina Humana, podem ser consideradas como eficazes estabilizantes nas condições estudadas. Finalmente, baseado apenas nos resultados experimentais obtidos no estudo, considerou-se que apenas a combinação de duas condições (ácido gentsísico e congelamento) apresentou-se como a mais eficiente, capaz de reduzir a auto radiólise do anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade de iodo-131, destinado para tratamento de linfoma do tipo não Hodgkin. Essa condição combinada, além de apresentar uma estabilidade relativa alta, próxima a 98 % (97,83 %), também apresentou uma alteração muito baixa, de apenas 1,07 %, da pureza radioquímica durante o tempo estudado, conforme demonstrado na TAB. 19 e FIG 3.

Esse resultado é muito importante em dois aspectos: 1) econômico, é um processo simples e não requer nenhum investimento adicional nem em infraestrutura nem em equipamentos adicionais, pois o ácido gentsísico pode ser adicionado ao anticorpo anti-CD20 durante o processo de marcação, ou logo após a condição de marcação. O produto, em seguida, pode ser congelado e transportado nesta condição para o local de uso e ser descongelado e aplicado ao paciente. 2) técnica, representa uma abordagem inédita e eficaz na conservação do anticorpo anti-CD20 podendo ser aplicado a outros anticorpos monoclonais marcados com alta atividade de iodo-131 ou outro radioisótopo destinado à terapia.

Isso pode ser uma abordagem ou procedimento útil ou vantajoso, além de assegurar um produto de qualidade. Entretanto, a viabilidade imunológica do anticorpo monoclonal radiomarcado deverá ser avaliada antes da utilização, de forma a verificar se o método de marcação e de conservação empregados não afetaram a capacidade de interação do anticorpo com o sitio de interação específico [72,73,77,80,81].

Kishore e colaboradores 1986 e Wahl e colaboradores 1990 [72,73] relataram que o congelamento pode ser um procedimento alternativo para diminuir o efeito da radiação sobre sistemas biológicos, pois diminui bastante a difusão de radicais livres responsáveis pela ocorrência de radiólise em materiais biológicos radiomarcados em especial o iodo-131 [72,73].

A imunoreatividade do produto marcado foi avaliada e o resultado obtido de ligação específica (0,02 %) foi muito baixo, praticamente não havendo diferença entre os valores obtidos para o anti-CD20-¹³¹I e o padrão de anti-CEA-¹³¹I. Talvez isso explique a afirmação ou hipótese demonstrada em outros trabalhos de que anticorpos íntegros e/ou compostos protéicos em geral radiomarcados com iodo-131 com o método de cloramina-T são pouco estáveis e apresentam baixa imunoreatividade [52,53]. Sabe-se que a retenção de imunoreatividade integral de anticorpos monoclonais radiomarcados é condição fundamental para obter resultado satisfatório em radioimunoterapia. Pois o uso de imunocombinados imunoincompetentes ou instáveis só contribuirá para a irradiação não-específica do paciente sem contribuir para a irradiação específica do tumor [38,83,84].

Segundo Schaffland e colaboradores [38], Nikula e colaboradores [85], e Matzku e colaboradores [86], a diminuição de imunoreatividade observada em anticorpos monoclonais radiomarcados pode ser resultado de vários parâmetros químicos ou impurezas presente no iodo-131 bem como do grau de iodação do anticorpo (mono ou poli-iodado), sendo que esses fatores podem diferir significativamente para diferentes imunoglobulinas (IgGs) [38,85,86].

Além disso, especificações e métodos de produção do radioiodo podem variar entre diferentes produtores e até o produto do mesmo lote e do mesmo fabricante. E mais, resíduos de tirosina abundantes nas regiões complemento-dependente dos sítios de ligação dos anticorpos monoclonais pode afetar significativamente a imunoreatividade desses compostos radioiodados [85].

Vale ressaltar que ensaios de imunoreatividade através de uso de células vivas podem favorecer a ocorrência de variações, uma vez que essas células podem expressar quantidades variáveis de antígenos “alvo” (CD20) [38,85].

Porém, os resultados do estudo de Schaffland e colaboradores [38], demonstraram claramente a possibilidade da dependência de imunoreatividade à atividade específica do anticorpo marcado. Isto é, foi observado alta imunoreatividade em anticorpo anti-CD20 marcado com baixa atividade específica de iodo-131 (29,6 MBq/mg) comparado à baixa imunoreatividade observada em anticorpo anti-CD20 marcado com alta atividade específica de iodo-131 (325,6 MBq/mg) [38].

Todavia, acredita-se que a taxa não significativa de imunoreatividade do anticorpo anti-CD20 marcado que obteve-se no ensaio de imunoreatividade realizado neste estudo pode ser atribuído a vários fatores, principalmente, à metodologia utilizada na separação de leucócitos, material de fundamental importância na realização do ensaio. Acredita-se, que estudos mais detalhados usando-se outras ou até novas técnicas, de separação de leucócitos, além de estudos realizados com Ac marcados com diferentes atividades específicas, podem resultar em resultados satisfatórios.

Realizou-se o ensaio biológico do produto marcado em camundongos *Swiss* normais para verificar o seu comportamento, ou seja, seu perfil de distribuição *in vivo*. Pulmão, fígado, rins e o intestino delgado foram os órgãos que apresentaram maior captação do produto, além da tireóide, embora isso já fosse esperado pela sua afinidade pelo iodo, e pela ausência de bloqueio prévio da glândula.

O grau de captação apresentado pelos órgãos está em consonância com os resultados obtidos em outros estudos realizados por outros pesquisadores em ensaios clínicos em humanos com anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131 e ítrio-90. A captação apresentada pelo sangue pode ser considerada como o reflexo de radioatividade circulante nos órgãos e tecidos [84,87,88].

A principal via de eliminação da atividade é renal, o que explica a captação alta demonstrada por esses órgãos. O decréscimo progressivo na captação de atividade apresentado pelos órgãos em função do tempo, assemelhou-se aos resultados obtidos em estudos feitos em humanos, compatível com a biodistribuição e a farmacocinética do anticorpo anti-CD20 quimérico IDEC-C2B8 (rituximab) marcado com 250 MBq de atividade de iodo-131 [87]. Obteve-se resultado

similar ao apresentado por Scheidhauer e colaboradores [87], no qual se observa captação alta nos rins e o decréscimo progressivo de captação nos órgãos normais (TAB. 21).

Os dados de clareamento sanguíneo do anticorpo marcado foram analisados pelo programa BIEXP [82] que decompôs a curva em 2 componentes, mostrando um 1º t_{1/2} (meia-vida) mais rápida (0,8 h) e um 2º t_{1/2} mais longa (19,14 h) compatível com a distribuição de um IgG radiomarcada (FIG. 5). Esses dados comprovou-se que o clareamento sanguíneo do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo -131 sendo lento.

Scheidhauer e colaboradores [87] concluíram que a administração do anticorpo anti-CD20 marcado foi bem tolerado e apropriado para a dosimetria pré-terapêutica. Além disso, concluíram que o anticorpo marcado demonstrou ótima ligação específica em órgãos e tecidos. Concluíram também que além de indicar uma tolerância satisfatória, ainda oferece expectativa para o uso repetitivo, sendo um anticorpo quimérico [58,87].

Finalmente, Behr e colaboradores [58], demonstraram num ensaio clínico a capacidade em potencial desse anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131, na indução de remissões duráveis após tratamento com atividade alta ou terapêutica [58].

Skivortsova e colaboradores [35] realizaram estudo onde avaliaram os efeitos de radiação ionizante em combinação com a Rituximab (Mabthera[®]), sobre a proliferação, distribuição do ciclo celular e apoptoses em células de modelo tumoral de linfomas-B (células Rajji e Daudi).

Constataram que a exposição dessas células à radiação ionizante de aproximadamente 9Gy induziu o retardamento de crescimento celular e apoptose em células Daudi, enquanto que, as células Rajji demonstraram-se moderadamente radio-resistente. Observaram que a exposição simultânea dessas células à radiação ionizante e Rituximab (10mg/ml) intensificou significativamente as apoptoses e retardamento no crescimento celular dessas células. Constataram também que o efeito antiproliferativo e apoptótico tanto do Rituximab como da radiação são cooperativos [35,89].

Contudo, as descobertas de Skivortsova e colaboradores [35] confirmaram o que já foi relatado em outros trabalhos de que Rituximab é capaz de intensificar sinergicamente a apoptose radio – induzida e retardamento do crescimento celular através de bloqueio protéico envolvido tanto na morte programada como na regulação das etapas do ciclo celular [35,89].

Conclusões

- 1) Os dados apresentados neste estudo demonstram que o anticorpo anti-CD20 pode ser marcado usando-se o método de substituição eletrofilica oxidativa, utilizando-se a Cloramina-T como agente oxidante.
- 2) A metodologia (ITLC-SG) utilizada para determinar a pureza radioquímica do Ac marcado demonstrou-se adequada e simples.
- 3) A metodologia de purificação do anticorpo anti-CD20 marcado demonstrou-se apropriada e eficiente na separação do Ac marcado e o iodo livre.
- 4) Foi apresentado no estudo uma abordagem, que considerou-se inédita, no que diz respeito à estabilidade do composto marcado com alta atividade do iodo-131 que viabilizaria o transporte e comercialização do produto marcado.
- 5) Resultados do ensaio de imunoreatividade do composto marcado demonstraram-se insatisfatórias e parecem indicar que a marcação do anticorpo anti-CD20 pelo método direto, tanto para marcação com alta ou baixa atividade promoveu a perda de imunoreatividade do anticorpo. No entanto, ensaios clínicos poderão demonstrar a viabilidade da utilização do anticorpo anti-CD20-¹³¹I com baixa atividade específica (e alta imunoreatividade) na terapia do linfoma do tipo não Hodgkin.
- 6) Dados obtidos no estudo da distribuição *in vivo* do composto marcado demonstraram-se compatíveis com a biodistribuição do Ac íntegro e estabilidade relativa *in vivo*, indicando a potencialidade do anticorpo anti-CD20 marcado com iodo-131 na terapia do linfoma do tipo não Hodgkin pelo princípio de radioimunoterapia.

REFERÊNCIAS

1. Mousas, B. MD., Coia, L. R. MD. Lymphomas and Hematologic Malignances In: Coia, L.R. MD.; Meyland, D.J. MD. **Introduction to Clinical Radiation Oncology**. 3 Ed., Madison; Wisconsin: Medical Physics Publishing, 1998. p.177-216.
2. Cancer Backup booklet series: Non-HodgkinLymphoma (<<http://www.cancerbackup.org.uk/cancertype/lymphomanon-Hodgkins>>). Acesso em 14 junho 2004.
3. Jack, A.S. The classification of lymphomas: a new beginning or the end of an era? **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.**, v. 30, n.1, p.S13-S18, 2003.
4. Juweid, M. E. MD. Radioimmunotherapy of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: From Clinical Trials to Clinical Practice. **J. Nucl. Med.**, v. 45, p. 1507-1529, 2002.
5. Coffey, J.; Hodgson, D.C.; Godspodarowicz, M.K. Therapy of non-Hodgkin's Lymphoma. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.**, v. 30, n. 1, p. 528-536, 2003.
6. Swedlow, A.J. Epidemiology of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's Lymphoma. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.**, v. 30, n. 1, p. S3-S12, 2003.
7. Hartge, P.; Devesa, S. S.; Fraumeni, J. F. Jr. Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. In: Doll, R., Fraumeni, J. F.; Muir,; eds. Trends in cancer incidence and mortality. p. 19-20. **Cold Springs Harbor: Cold Springs Harbor Laboratory Press; 1994: 423-453.**
8. Sant, M.; Capocaccia, R.; Colman, M.P.; Berrino, F.; Gatta, G.; Micheli, A; Verdecchia, A.; Faivre, J.; Hakulinen, T.; Coebergh, J.W.W.; Martinez-Garcia, C; Forman, D.; Zappone, A.; and the EURO CARE Working Group. Cancer survival increases in Europe, but international differences remain wide. **Eur. J. Cancer 2001; 37: 1659-1667.**
9. Pastore, G.; Magnani, C.; Verdecchia, A.; Pession, A.; Viscomi, S.; Coebergh, J.W.W, and the EUROPE Working Group. Survival of childhood lymphomas in Europe, 1978-1992: a report from the EURO CARE study. **Eur. J. Cancer 2001; 37: 703-710.**
10. Associação Brasileira de Câncer: (<<http://www.abcancer.org.br/sobre.php>>). Acesso em 20 maio 2005.

11. Goding, J.W. **Monoclonal Antibodies: Principles and Practice**. Australia; Academic Press, 1986, p. 5-58.
12. Cersosimo, R. J. Monoclonal antibodies in treatment of cancer: Part 1. **Am. J. Health. Syst. Pharm.**, v. 60, n. 1, p. 1531-1548, 2003.
13. Press, O.W.; Leonard, J.P.; Coiffier, B.; Levy, R.; Timmerman, J. Immunotherapy of non-Hodgkin's Lymphomas. **American Society of Hematology.**, v. 5, p. 221-240, 2001.
14. Fischer, R.I. MD. Treatment of aggressive non-Hodgkin's Lymphomas. Lessons from the past 10 years. **Cancer.**, v. 74, n. 9, p. 2657-2661, 1994.
15. Goldenberg, D.M. ScD. MD. Targeted Therapy of Cancer with Radiolabeled Antibodies. **J. Nucl. Med.**, v. 43, p. 693-713, 2002.
16. Hernandez, M.C. MD; Knox, S.J. PhD. Radiobiology of Radioimmunotherapy: Targeting CD20 B-Cell Antigen in non-Hodgkin's Lymphoma. **Int. J. Radiation Oncology. Boil. Physics.**, v. 59, n. 5, p. 1274-1287, 2004.
17. Illidge, T.M.; Brock, S. Radioimmunotherapy of Cancer: Using Monoclonal Antibodies to Target Radiotherapy. **Current Pharmaceutical Design.**, v. 6, p. 1399-1418, 2000.
18. Rose, A.L.; Smith, B.E.; Maloney, D.G. Glucocorticoids and rituximab *in vitro*: Synergistic direct antiproliferative and apoptotic effects. **Blood.**, v. 100, n.5, p. 1765-1773, 2002.
19. Kaminski, M.S.; Ester, J.; Zasadny, K.R. ; Francis, I.R. ; Ross, C.W. ; Tuck, M. ; Regan, D. ; Fisher, S. ; Gutierrez. ; J. ; Kroll, S. ; Stagg, R. ; Tidmarsh, G. ; Wahl, R.L. Radioimmunotherapy with Iodine-131-Tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphomas: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. **Blood.**, v. 96, p. 1259-1266, 2000.
20. Vose, J.M.; Wahl, R.L.; Salch, M. ; Mansoor, S. ; Rohatiner, A.Z. ; Knox, S.J. ; Radford, J.A. ; Zelenetz, A.D. ; Tidmarsh, G.F. ; Stagg, R.J. ; Kaminski, M.S. Multicenter phase II study of Iodine-131-Tositumomab for chemotherapy relapsed/refractory low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p.1316-1323, 2000.
21. Dixon, K.L. The radiation biology of radioimmunotherapy. **Nucl. Medicine Communications.**, v. 24, p. 951-957, 2003.
22. Behr, T.M.; Goldenberg, D.M; Becker, W.S. Radioimmunotherapy of Solid Tumors: A Review " of Mice and Men". **Hybridoma.**, v. 16, n. 1, p.101-107, 1997.
23. Chin, P.; Braslauky, G.; White, C.; Hanna, N. Antibody therapy of non-Hodgkin's B-Cell lymphoma. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 52, p. 257-280, 2003.
24. Milenic, D.E.; Brechbiel, M.W. Targeting of Radio-Isotopes for Cancer Therapy. **Cancer. Biology and Therapy.**, v. 3, n. 4, p. 361-370, 2004.
25. Volkert, W.A.; Hoffman, T.J. Therapeutic Radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2269-2292, 1999.
26. Kaminski, M.S.; Zasadny, K.R. PhD.; Francis, I.R.; Francis, I.R.; Milik, A.W.; Ross, C.W.; Moon, S.D.; Crawford, S.M.; Burgess, J.M.; Petry, N.A.; Butchko, G.M. et al. Radioimmunotherapy of B-Cell lymphoma with [¹³¹I] anti-B1 (anti-CD20) antibody. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 329-465, 1993.
27. DeNardo, S.J.; DeNardo, G.L.; O'Grady, L.F.; Macey, D.J.; Mills, S.L.; Epstein, A.L.; Peng, J.S.; McGahan, J.P. Treatment of a patient with B-cell lymphoma by I-131 Lym-1 monoclonal antibodies. **Int. J. Biol. Markers.**, v. 2, p. 49-53, 1987.
28. Bienert, M.; Reisinger, I.; Srock, S.; Humplick, B.I.; Reim, C.; Kroessin, T.; Avril, N.; Pezzutto, A.; Munz, D.L. Radioimmunotherapy using ¹³¹I-Rituximab in patients with advanced stage B-cell non-Hodgkin's lymphoma: initial experience. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.**, v. 32, p. 1225-1233, 2005.

29. Kaminski, M.S.; Fig, L.M.; Zasadny, K.R.; Koral, K.F.; DelRosario, R.B.; Francis, I.R.; Hanson, C.A.; Normolle, D.P.; Mudgett, E.; Liu, C.P. Imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with Iodine-131-labeled anti-CD37 antibody in B-cell lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 10, p. 1711-1992.
30. DeNardo, G.L.; Lewis, J.P. MD.; DeNardo, S.J. MD.; O'Grady, A.F. MD. Effect of Lym-1 Radioimmunotherapy on Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cancer.**, v. 73, p. 1425-32, 1994.
31. Weiden, P.L.; Breitz, H.B.; Press, O.; Appelbaum, J.W.; Bryan, J.K.; Gaffigan, S.; Stone, D.; Axworthy, D.; Fisher, D.; Reno, J. Pretargeted Radioimmunotherapy (RIT) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): initial phase I/II study results. **Cancer Biother Radiopharm.**, v. 15, p. 15-29, 2000.
32. Press, O.W. MD. PhD; Eary, J. F. MD.; Appelbaum, F.R. et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. **N. Engl. J. Med.**; v. 329, p. 1219-24, 1993.
33. Wiseman, G.A.; White, C.A.; Witzig, T.E. Gordon, L.I.; Emmanouilides, C.; Raubitschek, A.; Janakiraman, N.; Gutheil, J.; Schilder, R.J.; Spies, S.; Silverman, D.H.; Grillo-Lopez, A.J. Radioimmunotherapy of relapsed non-Hodgkin's lymphoma with Zevalin, a ⁹⁰Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, n. 10, p. 3281s-3286s, 1999.
34. Press, O.W.; Farr, A.G.; Borroz, K.I.; Anderson, S.K.; Martin, P.J. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. **Cancer Res.**, v. 49, p. 4906-4912, 1989.
35. Skavortsova, I.; Popper, B.A.; Skvostsov, S.; Saurer, M.; Auer, T.; Moser, R.; Kamleitner, H.; Zwierzina, H.; Lukas, P. Pretreatment with Rituximab Enhances Radiosensitivity of non-Hodgkin's Lymphoma cells. **J. Radiat. Res.**, v. 46, p. 241-248, 2005.
36. Knox, S.J.; Goris, M.L.; Trisler, K. Negrin, R.; Davis, T.; Liles, T.M.; Grillo-Lopez, A.; Chinn, P.; Vans, C.; Ning, S.C.; Fowler, S.; Deb, N.; Becker, M.; Marques, C.; Levy, R. Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 2, p. 457-470, 1996.
37. Knox, S.J. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphomas. **Semin. Radiat. Oncol.**, v. 5, p. 331-341, 1995.
38. Schaffland, A.O. PhD.; Buchegger, F.MD.; Kosinski, M. PhD.; Antonescu, C. MD.; Paschoud, C.G. MSc.; Pellikka, R.; Delaloye, A.B. MD. ¹³¹I-Rituximab: Relationship Between Immunoreactivity and Specific Activity. **J. Nucl. Med.**, v. 45, p. 1784-1790, 2004.
39. Rakesh, K.J.; Baxter, L.T. Mechanisms of Heterogeneous Distribution of Monoclonal Antibodies and other Macromolecules in Tumor: Significance of Elevated Interstitial Pressure. **Cancer Research.**, v. 48, p. 7022-7032, 1988.
40. Juweid, M.; Newmann, R.; Paik, C.; Perez-Bacete, M.J.; Sato, J.; Osdoe, W.; Weinstein, J.N. Micropharmacology of Monoclonal Antibodies in Solid Tumors: Direct Experimental Evidence for a Binding Site Barrier. **Cancer Research.**, v. 52, p. 5144-5153, 1992.
41. McDevitt, M.R.; Sgouros, G.; Finn, R.D.; Humm, J.L. Jurcic, J.G.; Larson, S.M.; Ssheinberg, D.A. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 25, p. 1341-1351, 1998.
42. Rajendran, J.G. Radioimmunotherapy for the 21st century: An old approach with a new Paradigm. **Ind. J. Nucl. Med.**, v. 19, n. 3, p. 81-88, 2004.
43. Hunter, W.M.; Greenwood, F.C. Preparations of Iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. **Nature.**, v. 194, p. 495-496, 1962.

44. Greenwood, F.C.; Hunter, W.M.; Glover, J.S. The preparation of ^{131}I -labeled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. **Biochem. J.**, v. 89, p.114-123, 1963.
45. Bolton, A.E.; Hunter, W.M. The labeling of Proteins to High Specific Radioactivities by Conjugation to a ^{125}I -Containing Acylating Agent. **Biochem. J.**, n. 133, p. 529-539, 1973.
46. Seevers, R.H.; Counsell, R.E. Radioiodination Techniques for Small Organic Molecules. **Chem. Rev.**, v. 82, p. 575-590, 1982.
47. Vaidyanathan, G.; Affleck, D.J.; Zalutsky, M.R. Method for Radioiodination of Proteins Using N-Succinylacidyl 3-Hydroxy-4-iodobenzoate. **Bioconjugate chem.**, v. 8, p. 724-729, 1997.
48. Fraker, P.J.; Speck, J.C. Protein and Cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α diphenylglycouril. **Biochem. Biophys.**, v. 80, p. 849-857, 1978.
49. Kozak, R.W.; Ranbitscheck, A.; Miradeh, S.; Brechbiel, M.W.; Junghans, R.P.; Gansow, O.A.; Waldmann, T.A.; Junghaus, R. Nature of bifunctional chelating agent used for radioimmunotherapy with Yttrium-90 monoclonal antibodies: critical factors in determining in vivo survival and organ toxicity. **Cancer Res.**, v. 49, p. 2639-2644, 1989.
50. Washburn, L.C.; Sun, T.H.; Lee, Y.C.; Byrd, B.L.; Holloway, E.C.; Crook, J.E.; Stubbs, J.B.; Stabin, M.G.; Brechbiel, M.W.; Gansow, O.A.; Steplewski, Z. Comparison of five bifunctional chelate techniques for ^{90}Y -labeled monoclonal antibody CO17-1A. **Nucl. Med. Biol.**, v.18, p. 313-321, 1991.
51. Wilbur, D.S. Radiohalogenation of Proteins: an overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling. **Bioconjugate chem.**, v. 3, n. 6, p. 433-470, 1992.
52. Bolton, A.E.; LeeOwn, V.; McLean, R.K.; Challand, G.S. Three different Radioiodination Methods for Human Spleen Ferritin Compared. **Clin Chem.**, v. 25, p. 1826-1830, 1979.
53. Hutchinson, H.D.; Ziegler, D.W. Criteria for Preparing, Evaluating, and Standardizing Iodinated Globulins for Radioimmunoassay Procedures. **Applied Microbiology.**, v. 28, p.935-942, 1974.
54. Behr, Th. M.; Gottardt, M.; Becker, W.; Behé, M. Radioiodination of Monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. **Nuclearmedizin.**, v. 41, p.71-79, 2002.
55. Weadock, J.S.; Sharkey, R.M.; Varga, D.C.; Goldenberg, D.M. Evaluation of a Remote Radioiodination System for Radioimmunotherapy. **J. Nucl. Med.**, v. 31, p. 508-511, 1990.
56. Breuwers, A. H.MD.; Julliette, E.M.MSc.; Frielink, C. MSc.; Oosterwijk, E. PhD.; Oyen, W.J.G.MD. PhD.; Corstens, F.H.M. PhD.; Boerman, O.C. PhD. Optimization of Radioimmunotherapy of Renal Cell Carcinoma: Labeling of Monoclonal Antibody cG250 with ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , or ^{186}Re . **J. Nucl. Med.**, v. 45, p.327-337, 2004.
57. Coiffer, B.; Haioun, C.; Ketterer, N.; Engert, A.; Tilly, H.; Ma, D.; Johnson, P.; Lister, A.; Feuring-Buske, M.; Radford, J.A.; Capdeville, R.; Diehl, V.; Reyes, F. Rituximab (Anti-CD20 Monoclonal Antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a Multicenter phase II study. **Blood.**, v. 92, p. 1927-1932, 1998.
58. Behr, Th. M.; Norman, B.; Gramatzki, M.; Riggert, J.; Gratz, S.; Béhé, M.; Griesinger, F.; Sharkey, R.M.; Kolb, H.J.; Hiddemann, W.; Goldenberg, D.M.; Becker, W. Low versus High-Dose Radioimmunotherapy with Humanized Anti-CD22 or chimeric Anti-CD20 Antibodies in a Broad Spectrum of B Cell associated Malignancies. **Clinical Cancer Research.**, v. 5, n. 1, p. 3304s-3314s, 1999.

59. Witzig, Th. E.; Gordon, L.I.; Cabanillas, F.; Czuczman, M. S.; Emmanouilides, C.; Joyce, R.; Pohlman, B.L.; Bartlett, N.L.; Wiseman, G.A.; Padre, N.; Grillo-López, A.J.; Multani, P.; White, C.A. Randomized controlled Trial of Yttrium-90-labeled Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy versus Rituximab Immunotherapy for Patients with Relapsed or Refractory Low-grade, Follicular, or Transformed B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, p. 2453-2463, 2002.
60. Shen, S.; DeNardo, G.L.; Yuan, A.; DeNardo, D.A.; DeNardo, S.J. Planar gamma camera imaging and quantitation of yttrium-90 bremsstrang. **J. Nucl. Med.**, v. 35, p. 1381-1389, 1994.
61. Mattes, M. J.; Griffiths, G. L.; Diril, H.; Goldenberg, D. M.; Ong, G. L.; Shih, L. B. Processing of antibody-radioisotope conjugates after binding to the surface of tumor cells. **Cancer.**, v. 73, p. 787-793, 1994.
62. Silverman, D. H.; Delparsand, E. S.; Torabi, F.; Goy, A.; McLaughlin, P.; Murray, J. L. Radiolabeled antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: radiation protection, isotope comparisons and quality of life issues. **Cancer Treatment Reviews.**, v. 30, p. 165-172, 2004.
63. Wagner, H. N. Jr.; Wiseman, G. A.; Marcus, C. S.; Nabi, H.; Nagle, C. Administration guidelines for radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with ⁹⁰Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody. **J. Nucl. Med.**, v. 43, p. 267-272, 2002.
64. Leonard, J. P.; Siegel, J. A.; Goldsmith, S. J. Comparative physical and pharmacologic characteristics of iodine-131 and yttrium-90: implications for radioimmunotherapy of patients with non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Invest.**, v. 21, n. 2, p. 241-52, 2003.
65. Postema, E.J.; Mandigers, C.M.; Oyen, W.J. Goldenberg, D. ; Boerman, O. Dose escalating of ¹⁸⁶Re-labeled humanized monoclonal antibody LL2 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. [abstract]. **J. Nucl. Med.**, v. 41, n. 1, p. 269p, 2000.
66. Reff, M.E.; Hariharan, K. PhD.; Braskinsky, G. PhD. Future of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Hematologic Malignancies. **Cancer Control.**, v. 9, n.2, p. 152-166, 2002.
67. DeNardo, G.L.; DeNardo, S.J.; Goldenstein, D.S. Kroger, L.A.; Lamborn, K.R.; Levy, N.B.; McGahan, J.P.; Salako, Q.; Shen, S.; Lewis, J.P. Maximum tolerated dose, toxicity, and efficacy of I-131 Lym-1 antibody for fractionated radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, p. 3346-3356, 1998.
68. Zelentz, A.D. A clinical and scientific overview of tositumomab and iodine- I131 tositumomab. **Sem. Oncol.**, v, 30, p. 22-30, 2003.
69. Macklis, R.M.; Beresford, B. A.; Humm, J.L. Radiobiologic studies of low-dose rate Y-90 lymphoma therapy. **Cancer.**, v, 73, p. 966-973, 1994.
70. O'Donoghue, J.A. The impact of tumor cell proliferation in radioimmunotherapy. **Cancer.**, v. 73, p.974-980, 1994.
71. Kaminski, M.S.; Zasadny, K.R.; Francis, I.R. Fenner, M.C. ; Ross, C.W. ; Milik, A.W. ; Estes, J. ; Tuck, M. ; Regan, D. ; Fisher, S. ; Glenn, S.D. ; Wahl, R.L. Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-Cell lymphoma. **J.Clin.Oncol.**, v,14, p.1974-1981, 1996.
72. Wahl, R.L.; Wissing, J.; Rosario, R.; Zasadny, K.R. Inhibition of Autoradiolysis of Radiolabeled Monoclonal Antibodies by Cryopreservation. **J. Nucl. Med.**, v. 31, p. 84-89, 1990.
73. Kishore, R.; Early, J.F.; Krohn, K.A. Nelp, W.B.; Menard, T.W.; Beaumier, P.L.; Hellstrom, K.E.; Hellstrom,I. Autoradiolysis of iodinated monoclonal antibody preparations. **Int. J. of Radiat. Appl. Instrum. Part. B. Nucl. Med and Biol.**, v. 4, p. 457-459, 1986.
74. Liu, S.; Edward, D.S. Stabilization of (90) y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. **Bioconjug. Chem.**, v. 14, n. 5, p. 1052-6, 2003.

75. Field of invention: (<www.freshpatents.com/radiopharmaceuticals>) Acesso em 25 Dezembro 2005.
76. Marchalonis, J.J. An Enzymatic Method for the Trace Iodination of Immunoglobulins and other proteins. **Biochem. J.**, v. 113, p. 299-305, 1969.
77. Chakrabarti, M.C.; Le, N.; Paik, C.H.; DeGraff, W.G.; Carrasquillo, J.A. Prevention of radiolysis of monoclonal antibody during labeling. **J. Nucl. Med.**, v. 37, p. 1384-1388, 1996.
78. Chinn, P.C.; Leonard, J.E.; Rosenberg, J.; Hanna, N.; Anderson, D.R. Preclinical evaluation of ⁹⁰Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody for treatment of non-Hodgkin's lymphoma. **Int. J. Oncol.**, v. 15, p. 1017-1025, 1999.
79. DeNardo, G.L.; DeNardo, S.J.; Nessler, B.N.; Kukis, D.L.; Miyao, N.; Yuan, A. ¹³¹I-Lym-1 in mice implanted with human Burkitts lymphoma (Rajji) tumors: loss of tumor specificity due to radiolysis. **Cancer Biother Radiopharm.**, v. 15, p.547-560, 2000.
80. Salako, Q.A.; O'Donnell, R.T.; DeNardo, S.J. Effects of radiolysis on Yttrium-90-labeled Lym-1 antibody preparations. **J. Nucl. Med.**, v. 39, p.667-670, 1998.
81. Kinuya, S.; Yokoyama, K.; Tega, H.; Hiramatsu, T.; Konishi, S.; Yamamoto, W.; Shuke, N.; Aburano, T.; Watanabe, N.; Takayama, T.; Michigishi, T.; Tonami, N. Rhenium-186 mercaptoacetyltriglycine-labeled Monoclonal Antibody for Radioimmunotherapy: *In vivo* Assessment, *in vivo* Kinetics and Dosimetry in Tumor-bearing Nude Mice. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 89, p. 870-880, 1998.
82. Murphy, C. A. **Manual de Radiofarmacocinetica**. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Medicina Nuclear, México, 1992.
83. O' Donoghue, J. A. The impact of tumor cell Proliferation in Radioimmunotherapy. **Cancer.**, v. 73, p. 974-80, 1994.
84. Nikula, T. K.; Bocchia, M.; Curcio, M. J. Impact of high tyrosine fraction in complementarity determining regions: measured and predicted effects of radioiodination on IgG Immunoreactivity. **Mol. Immunol.**, v. 32, p. 865-872, 1995.
85. Matzku, S.; Kirchgessner, H.; Nissen, M. Iodination of monoclonal IgG antibodies at a Sub-stoichiometric level: Immunoreactivity changes related to the site of iodine incorporation. **Int. J. Rad. Appl. Instrum B.**, v. 14, p. 451-457, 1987.
86. Scheidhauer, K.; Wolf, I.; Baumgartl, H. J.; Schilling, C. Schmidt, G.R.; Peschel, C.; Schwaiger, M. Biodistribution and Kinetics of ¹³¹I-labeled anti-CD20 MAB IDEC-C2B8 (rituximab) in relapsed non-Hodgkin's lymphoma. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 29, p. 1276-1282, 2002.
87. Ranjendran, J.G.MD.; Fisher, D.R.PhD.; Gopal, A.K.MD. Durack, L.D.; Press, O.W.MD.; Eary, J.F.MD. High-Dose ¹³¹I-Tositumomab (Anti-CD20) Radioimmunotherapy for Non-Hodgkin's Lymphoma: Adjusting Radiation Absorbed Dose to Actual Organ Volumes. **J. Nucl. Med.**, v. 45, p. 1059-1064, 2004.
88. Wahl, R.L.MD. Tositumomab and ¹³¹I Therapy in Non-Hodgkin's Lymphoma. **J. Nucl. Med.**, v. 46, p. 128S140S, 2005.
89. Rose, A.L.; Smith, B.E.; Maloney, D.G. Glucocorticoids and rituximab in vivo: synergistic direct antiproliferative and apoptotic effects. **Blood.**, v. 100, n. 5, p. 1765-1773, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)