

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

OBSERVAÇÕES SOBRE O USO CLÍNICO DE INTERFERON ALFA COMO  
MODULADOR DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE EM  
MELANOMA MALIGNO METASTÁTICO

BELMONTE J. MARRONI

PORTO ALEGRE  
1994

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

OBSERVAÇÕES SOBRE O USO CLÍNICO DE INTERFERON ALFA COMO  
MODULADOR DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE EM  
MELANOMA MALIGNO METASTÁTICO

BELMONTE J. MARRONI

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Clínica Médica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.*

PORTO ALEGRE  
1994

---

## AGRADECIMENTOS

- ◆ É hora de parar e refletir sobre o caminho percorrido, as horas navegadas pelas tantas pousadas, lugarejos incomuns que habitam a ciência, a cultura, a paciência, a relação humana e a ética. Nesta busca em tempo, que faço no convívio de parentes, amigos e colegas, procuro a tudo, todos como a mim mesmo.
- ◆ Aos meus pais que lapidaram a pedra bruta, sem que eu muitas vezes percebesse que exemplo maravilhoso! À Isabel e ao Rodrigo, que sempre deixaram meus dias com jeito de primavera. Sem a compreensão de vocês não teria sido possível.
- ◆ Ao Serviço de Medicina Nuclear do HCPA, aos colegas e, em especial, ao Dr. Eduardo B. Ludwig, pelo esforço conjunto como amigo e colaborador nas dificuldades do projeto. À dedicação dos bioquímicos Maria Janilde Almeida, Osmar Magalhães e Heloisa Helena nas preparações *in vitro*.
- ◆ Aos colegas Dr. Cesar Santos e Renato Cunha, pelas excelentes dicas de computação.
- ◆ À equipe do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital São Lucas da PUC, pela compreensão quando da necessidade de utilização de seu computador para complementação das análises.
- ◆ À Prof. Aida Muradás, que gentilmente nos desvendou os mistérios da cromatografia, assim como ao Prof. Eloi Julius Garcia e ao Departamento de Biofísica da UFRGS, que nos cederam as sondas especiais para registros cromatográficos, nosso muito obrigado.
- ◆ Aos colegas, secretárias, à Luciane e ao Denis, do Serviço de Oncologia do HCPA, em especial à pessoa do Dr. Algemir Brunetto, pelo apoio, acolhida e esforços realizados para que nosso trabalho não sofresse descontinuidade.
- ◆ Ao colega Dr. Fernando T. Kreutz, pela competente e oportuna contribuição nas dosagens laboratoriais.
- ◆ Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA, pela verba necessária à aquisição de parte do material desta pesquisa.
- ◆ Ao Laboratório Schering, pela doação de parte do interferon alfa, e à SORIN - BIOMÉDICA, pelo kit- ETI-HAMAK, indispensável à análise crítica dos resultados obtidos.

- ◆ Ao amigo, mestre e maior exemplo de dedicação, Dr. Gilberto Schwartzmann, cuja ajuda ombro a ombro possibilitou a criação, o desenvolvimento e a conclusão desta pesquisa, gostaria de dizer que o sentimento de amizade que surgiu destes anos, com idas e vindas muitas vezes invadindo sua privacidade, reforçaram minha crença nos valores e na simplicidade da alma humana. Um especial obrigado pelas horas de trabalho a 10000 pés de altitude acrescido de um pedido de perdão ao Guilherme, Laura e Loi.
- ◆ Aos Professores do Pós-Graduação, pela dedicação, estímulo constante e valiosos ensinamentos.
- ◆ Aos pacientes e voluntários, pelo exemplo de altruísmo.
- ◆ Aos funcionários da Nuclimagem, pela compreensão de muitas ausências em momentos difíceis.
- ◆ Ao grupo de trabalho da Officiu, sob o comando da Profª. Maria do Horto, meu carinhoso abraço de respeito ao profissionalismo, cuja resposta está intimamente ligada à apresentação final deste trabalho.
- ◆ Imaginar é fácil, assim, com toda minha força, AGRADEÇO A TODOS que, de uma forma ou outra, ajudaram na conclusão deste trabalho. Entretanto, difícil é agradecer a cada um, pois mesmo com palavras de poeta serei sempre um aprendiz.

“NÃO ESMORECER PARA NÃO DESMERECEER”

*Oswaldo Cruz*

---

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1 - INTRODUÇÃO / 18

- 1.1 - O MÉTODO CINTILOGRÁFICO E A ONCOLOGIA / 18
- 1.2 - ASPECTOS GERAIS DA TERAPÊUTICA ANTINEOPLÁSICA / 21
- 1.3 - SELETIVIDADE DIAGNÓSTICA E TERAPÊUTICA / 22
- 1.4 - ANTICORPOS MONOCLONAIS / 22
- 1.5 - IMUNOCONJUGADOS / 25
- 1.6 - IMUNOMODULAÇÃO: OS INTERFERONS / 26
- 1.7 - O MELANOMA MALIGNO COMO MODELO EXPERIMENTAL / 28

2 - OBJETIVOS / 33

3 - PACIENTES E MÉTODOS / 35

- 3.1 - CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA / 35
- 3.2 - CARACTERÍSTICAS DO ANTICORPO UTILIZADO / 35
- 3.3 - ELABORAÇÃO DO IMUNOCONJUGADO / 36
- 3.4 - CONTROLE DE QUALIDADE DO IMUNOCONJUGADO / 36
- 3.5 - ESTUDOS IMUNOCINTILOGRÁFICO / 37
- 3.6 - TESTAGEM CLÍNICA DE CONTROLE COM RADIOISÓTOPO ISOLADO / 38
- 3.7 - ESTUDO-PILOTO DE SEGURANÇA E BIODISTRIBUIÇÃO DO IMUNOCONJUGADO / 38
- 3.8 - TESTAGEM CLÍNICA DE SEGURANÇA DO IMUNOCONJUGADO / 39
- 3.9 - ESTUDO IMUNOCINTILOGRÁFICO EM PACIENTES COM LESÕES METASTÁTICAS / 39
- 3.10 - EFEITO IMUNOMODULADOR DO INTERFERON ALFA / 40
- 3.11 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO INTERFERON ALFA / 41

4 - RESULTADOS / 43

- 4.1 - CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA / 43
- 4.2 - CARACTERÍSTICAS, ELABORAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO IMUNOCONJUGADO / 43
- 4.3 - ESTUDOS IMUNOCINTILOGRÁFICO INICIAIS E TESTAGEM DE CONTROLE / 47

5 - DISCUSSÃO / 69

6 - CONCLUSÕES / 80

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS / 82

ANEXOS

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAT	= antígenos associados a tumores
AcMc	= anticorpos monoclonais
AFP	= alfafetoproteína
AHAM	= anticorpos humanos antimurinos
AJCC	= Comitê Conjunto Norte-Americano para Câncer
BCG	= bacilo de Calmette e Guérin
Bx	= biópsia
CCDA	= citotoxicidade dependente do anticorpo
CEA	= antígeno carcinoembriônico
CMC	= citotoxicidade mediana por complemento
DNF	= grupo dinitrofenil
DTPA	= dietilenotriaminopentacético
EDTA	= etilenodiaminotetracético
EGF	= fator de crescimento epidérmico
Fab	= cadeia curta da imunoglobulina
F(ab') <sub>2</sub>	= cadeia curta da imunoglobulina
F ab'	= cadeia curta da imunoglobulina
Fc	= cadeia longa da imunoglobulina
FNT	= fator de necrose tumoral
GA <sub>2</sub> e GA <sub>3</sub>	= antígenos glicolipídios
GM - CSF	= fator de estimulação de colônias de granulócitos e monócitos
HAMA	= anticorpos humanos antimurinos
HCG	= gonadotrofina coriônica humana
HCPA	= Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HLA	= antígeno de histocompatibilidade leucocitária
ICT	= imunocintilografia
IFN	= interferon
IgG	= imunoglobulina
Igs	= imunoglobulinas
IMc	= imunoconjugado

Kcl	= quilo daltons
KeV	= quilo elétron volt
MBq	= mega bequerel
MCSP	= melanocondroitina sulfato proteoglican
MHC	= complexo de histocompatibilidade maior
MID	= membro inferior direito
MIRD	= Medical Internal Radiation Dose Committee
MM	= melanoma maligno
MMH	= melanoma maligno humano
MMM	= melanoma maligno metastático
Nacl	= cloreto de sódio
NK	= natural killer
OMS	= Organização Mundial de Saúde
Qc	= quociente
rad	= contagem de radiação
Sg	= subgrupo
SPECT	= tomografia com emissão de fóton único
UI	= unidades internacionais
<sup>123</sup> I	= Iodo
<sup>131</sup> I	= Iodo
<sup>111</sup> In	= Índio
<sup>99m</sup> Tc	= Tecnécio
<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	= Tecnécio pertecnetato meta-estável



---

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Cromatografia de coluna x grupos de estudo / 44
- TABELA 2** - Características dos pacientes com melanoma maligno metastático submetidos a exames imunocintilográficos com o anticorpo monoclonal 22825S marcado com  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  na vigência do uso de interferon alfa / 55
- TABELA 3** - Quocientes de captação (Qc) imunocintilográfica antes e após o uso de interferon alfa (IFN) em lesões metastáticas de pacientes portadores de melanoma maligno / 65
- TABELA 4** - Efeitos adversos pelo uso de interferon alfa em pacientes portadores de melanoma maligno metastático submetidos a imunocintilografia com anticorpo monoclonal 22825S (3 milhões UI/m<sup>2</sup>) / 66
- TABELA 5** - Efeitos adversos pelo uso de interferon alfa em pacientes portadores de melanoma maligno metastático submetidos a imunocintilografia com anticorpo monoclonal 22825S (5 milhões UI/m<sup>2</sup>) / 66
- TABELA 6** - Dosagens de anticorpos humanos antimurinos (AHAM) em pacientes submetidos a duas administrações endovenosas de anticorpo monoclonal 22825S com intervalo semanal (ELISA) / 67

---

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Representação esquemática da imunoglobulina. / 23
- FIGURA 2** - Curva biexponencial representativa do desaparecimento sérico das Igs. / 24
- FIGURA 3** - Incidência do melanoma - risco estimado. / 28
- FIGURA 4** - Cromatografia de coluna - Coluna de Bio-Gel tipo P-6. / 37
- FIGURA 5** - Sonda de detecção e sistema de registro gráfico. / 45
- FIGURA 6** - Cromatografia de coluna do grupo piloto. / 45
- FIGURA 7** - Cromatografia de coluna do grupo segurança. / 46
- FIGURA 8** - Cromatografia de coluna do grupo confirmação. / 46
- FIGURA 9** - Cromatografia de coluna do grupo modulação. / 47
- FIGURA 10** - Distribuição do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  no sítio tumoral. Paciente com MM (2,0 x 2,0) em região inguinal esquerda. / 48
- FIGURA 11** - Distribuição do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  em área de linfonodo metastático em região supraclavicular direita. / 48
- FIGURA 12** - Resultados de estudos de cinética de captação até 24 horas pós-injeção endovenosa do imunoconjugado na projeção das lesões metastáticas de melanoma maligno. / 49
- FIGURA 13** - Exemplo de estudo imunocintilográfico com o anticorpo 22825S marcado com  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  em um paciente com melanoma maligno metastático. Nesta etapa, os autores buscaram definir os melhores tempos e relações de retenção do imunoconjugado no tumor/tecido de fundo para a seleção das imagens subsequentes. / 50

**FIGURA 14** - Nota-se a ausência do imunocombinado em glândulas salivares, tireóide e estômago enquanto que altas concentrações são observadas no fígado, baço e rins. / 51

**FIGURA 15** - Nesta figura, observa-se uma concentração preferencial do IMc no cólon ascendente, ilustrando uma das formas de sua desativação. / 51

**FIGURA 16** - Nesta figura, observa-se uma grande concentração do IMc na região correspondente a uma massa metastática no terço proximal da coxa esquerda (setas). / 52

**FIGURA 17** - Nesta figura, observa-se uma maior concentração do IMc em área de fossa supraclavicular direita e ombro esquerdo, correspondendo a sítios de envolvimento metastático (setas). / 53

**FIGURA 18** - Hiper captação do imunocombinado em região axilar esquerda e hemitórax superior esquerdo. / 53

**FIGURA 19** - Hipocaptação do imunocombinado em nódulo palpável na região cervical. Biópsia confirmou o diagnóstico de MMH. / 54

**FIGURA 20** - Fluxograma de estudo em relação à administração de interferon alfa no grupo modulação. / 56

**FIGURA 21** - Nesta figura, observa-se uma baixa concentração do IMc no sítio tumoral. Ressalta-se a elevada eliminação urinária do IMc. / 57

**FIGURA 22** - Como na figura acima, observa-se uma baixa concentração do IMc no sítio tumoral. / 57

**FIGURA 23** - Nesta figura, pode-se observar um aumento da concentração do IMc em massa metastática localizada na cadeia de linfonodos inguinais superficiais à esquerda, após a administração de interferon alfa. / 58

**FIGURA 24** - Nesta figura, observa-se uma mínima concentração do IMc em linfonodo intraclavicular esquerdo, o qual não sofreu modificação significativa após a administração de interferon alfa. / 59

**FIGURA 25** - Nesta figura, pode-se observar um discreto aumento da concentração do IMc em grande inguinal esquerda, após a administração de interferon alfa. / 59

**FIGURA 26** - A figura acima ilustra o caso de um paciente com linfonodo metastático em axila esquerda, cuja concentração do IMc não sofreu modificações significativas com administração de interferon alfa. / 60

**FIGURA 27** - Nesta figura, observa-se reduzida concentração do IMc no calcâneo, antes e após o uso do interferon alfa. / 60

**FIGURA 28** - Nesta figura, observa-se baixa concentração do IMc em lesão primária na região torácicaposterior direita, a qual também não sofreu modificação. / 61

**FIGURA 29** - Nesta figura, observa-se expressiva concentração do IMc (pré-interferon) em região posterior da coxa direita em linfonodo metastático. Houve redução da concentração pós-interferon. / 61

**FIGURA 30** - Nesta figura, observa-se linfonodo captante em região axilar direita. / 62

**FIGURA 31** - Nesta figura, observa-se linfonodo em região axilar esquerda. Nota-se um (A e B) aumento marcante na concentração IMc em área metastática inicial não-captante. / 63

**FIGURA 32** - Nesta figura, observa-se redução da concentração do IMc pós-interferon em linfonodo localizado em axila esquerda. / 64

---

---

RESUMO

---

---

---

## RESUMO

O autor avaliou a capacidade de retenção do anticorpo monoclonal 22528S, o qual reconhece antígenos de alto peso molecular na superfície de células de melanoma maligno humano, em 49 pacientes com confirmação histopatológica da neoplasia, após a administração endovenosa do anticorpo marcado com tecnécio, e posterior quantificação da captação tumor/tecido normal, através de imunocintilografia. Uma vez confirmada a segurança do método e a localização preferencial do imunoc conjugado no tecido tumoral, o autor estudou o efeito do interferon alfa como modulador da expressão de antígenos de superfície e, por conseguinte, o seu potencial impacto na retenção do imunoc conjugado no tecido tumoral. Utilizando o paciente como seu próprio controle, foi possível observar um incremento na retenção do imunoc conjugado em sítios metastáticos pré-definidos em 8/10 pacientes. Dada a complexidade do fenômeno e o limitado número de casos estudados, optou-se pelo não tratamento estatístico dos dados e sim por sua discussão sob a forma preliminar. Pôde-se caracterizar uma tendência à maior concentração do imunoc conjugado no tumor após o uso do interferon alfa. Cabe ressaltar que, em um caso, foi documentada conversão de uma metástase não-captante em uma lesão altamente captante após a administração do imunomodulador. Esta estratégia não havia sido estudada previamente em pacientes portadores desta neoplasia. Considerando a potencial aplicação diagnóstica e terapêutica do uso de anticorpos monoclonais em neoplasias malignas, esta observação de um efeito modulador da expressão de antígenos tumorais específicos, através da administração concomitante de interferon alfa, aumentando a retenção do anticorpo no tecido tumoral, poderá vir a representar um valioso recurso no futuro.

---

---

SUMMARY

---

---

---

## SUMMARY

The author evaluated the ability of the monoclonal antibody 22825S, which recognizes high-molecular weight cell surface antigens in human malignant melanoma, of being retained preferentially in 49 patients with histopathologically-proven malignant melanoma, following the intravenous administration of the technecium-labelled monoclonal antibody. The retention of the immunoconjugate in the tumor versus normal tissues was measured using immunocintilographic tools. Following the documentation of the safety, feasibility and preferential antibody retention in the tumor tissue of melanoma patients, the author studied the effect of alpha-interferon as a modulator of cell surface antigen expression and thus, its impact on the retention of the immunoconjugate in the tumor. Using each patient as his own control, an enhancement of antibody localization in the tumor was demonstrated in 8 out of 10 cases. Due to the complexity of this phenomenon and the limited number of patients, the author decided to describe the results as preliminary observations without application of statistical tools. Notably, the administration of alpha interferon was able to convert a "cold" but histopathologically-confirmed metastatic lesion in one patient in a highly positive site, as quantified by immunocintigraphy. To the knowledge of the author, the above strategy was never applied to malignant melanoma patients before. Considering the potential application of monoclonal antibodies in cancer diagnostic and therapy, the above mentioned provocative observation of a modulatory effect of tumor antigens expression by interferons in men, leading to an increased retention of the antibody at the tumor site, may have important applications in the future.



---

---

## 1 - INTRODUÇÃO

---

---

---

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - O MÉTODO CINTILOGRÁFICO E A ONCOLOGIA

Nas últimas décadas, a tentativa de localização de tumores *in vivo* através do uso de material radioativo tem sido objeto de intensa investigação. Estes esforços têm uma dimensão histórica que se confunde com o próprio desenvolvimento da Medicina Nuclear, uma vez que esta incorpora princípios químicos, físicos e biológicos de interesse na composição da imagem (75).

A localização de tumores intracranianos com isótopos iniciou a partir de 1948 com o uso da diiodofluoresceína marcada com  $^{131}\text{I}$  e envolvendo o uso de detectores tipo Geiger-Müller (168). Logo após, em 1949, foram desenvolvidos métodos através de contadores proporcionais na tentativa de caracterizar a captação de tumores cerebrais pelo uso do  $^{32}\text{P}$  (150, 196). Na época, os aparelhos permitiam apenas a localização do tumor, já que a visualização só se tornou possível com a introdução do detector à cintilação, com a conseqüente representação do fenômeno em papel ou filme (32).

Em 1953, Moore (151) introduziu o uso da albumina humana marcada com  $^{131}\text{I}$  na investigação diagnóstica de tumores do sistema nervoso central, contando com suas características físicas favoráveis, fácil ligação a moléculas carreadoras e incorporação pelo tecido tumoral. Assim como outros pesquisadores como Beierwalters, Boyd, Day, Markwell e Counsell exploraram o uso do  $^{131}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$  através de derivados da quinolona, análogos das cloroquinas, fibrinogênio e estenóides do colesterol (2, 16, 20, 23, 39, 42, 65, 141).

Ainda na busca do material ideal, Blau e Bender (18), em 1962, propuseram o uso do mercúrio radioativo na forma de Clomerodrin- $^{203}\text{H}$  (diurético mercurial) para visualização de tumores do sistema nervoso central, enquanto Wolf e Fischer (226), em 1965, procuraram usar o cloreto de mercúrio na pesquisa de tumores pulmonares. O mecanismo de

captação parecia depender da ligação a proteínas citoplasmáticas nas células tumorais. Seu uso, no entanto, foi abandonado por sua incapacidade de diferenciar tecidos neoplásicos dos normais.

A adoção de aminoácidos marcados teve seu início a partir de 1966, através da selenometionina na avaliação de tumores pancreáticos (34). Entretanto seu uso se tornou restrito, devido a suas características físicas inadequadas e ao fato de a concentração do material radioativo nas zonas-alvo não ser significativamente superior à dos tecidos vizinhos.

Em 1966, Blau (17) formulou a hipótese de um mecanismo não metabólico e não específico para concentração do radiotraçador no tecido tumoral cerebral, relacionando-o ao rompimento da barreira hematoencefálica e suas alterações de permeabilidade vascular. Deste modo, foi introduzida a teoria da permeabilidade vascular alterada, como forma de explicar a maior concentração do radiotraçador no tecido tumoral.

Outros isótopos, como o  $^{67}\text{Ga}$  (citrato de gálio) e o  $^{111}\text{In}$  (cloreto de índio), tiveram seu uso também difundido com fins diagnósticos em Oncologia. A base teórica que justifica a utilização destes isótopos envolve múltiplos mecanismos inespecíficos, tais como: ligação com proteínas plasmáticas (transferrinas) e teciduais (lactoferrinas) e captação direta por leucócitos e lisossomos, na área de reação inflamatória peritumoral (12, 59, 82, 102, 220).

A bleomicina, produto de fermentação do *Streptomyces verticillus* marcado com  $^{131}\text{I}$ , foi introduzida por Fugita e Kimura (68) em 1970. Pela alta toxicidade e rápida de-halogenação antes mesmo de o material atingir uma concentração satisfatória no tecido tumoral, essa substância foi também de uso limitado.

Mais recentemente, após o reconhecimento de suas características de íon monovalente positivo, relacionado ao sistema ATPase da membrana celular, o  $^{201}\text{Tl}$  (cloreto de tálio) passou a ser utilizado com finalidades diagnósticas em Oncologia. Seu uso tem sido reconhecido na identificação de metástases no encéfalo e de neoplasias do tórax, tireóide e esqueleto (115, 198).

Como se pode depreender, os mecanismos formadores de imagem em relação a técnicas de Medicina Nuclear em Oncologia têm se utilizado de alterações não específicas

do tumor e tecidos do órgão hospedeiro. Como exemplo destas situações, cabe lembrar a captação focal no sistema esquelético (resposta osteoblástica) ou mesmo a perda de células de Kupfer produzindo "zona fria" hepática.

Desta forma, o rompimento do equilíbrio celular, pelas características de invasibilidade do tumor, concentra argumentos a favor das alterações descritas. Entretanto, com a finalidade de aumentar a especificidade dos mecanismos envolvidos na formação da imagem, muitos pesquisadores têm utilizado técnicas nucleares que explorem o sistema imunológico (73, 76).

Os primeiros estudos imunocintilográficos foram realizados em 1948 por Presmann (168), utilizando anticorpos policlonais marcados com  $^{131}\text{I}$  em rins de cobaios. Portanto o reconhecimento de um mecanismo imunológico para formação da imagem passou a ser incorporado.

Subseqüentemente, Gold e Freedmann (73), em 1965, utilizaram o antígeno carcinoembriônico (CEA), uma glicoproteína de soro heterólogo produzida por células do câncer de cólon, bem como a alfafetoproteína (AFP), uma alfa-globulina produzida pelo fígado fetal, trato intestinal e células germinativas, como marcadores tumorais. Entretanto foi com os trabalhos de Goldenberg (77, 78, 79) após 1978, utilizando-se também da gonadotrofina coriônica humana (HCG), que os marcadores tumorais se tornaram úteis no monitoramento da atividade da doença.

Progressos no entendimento da biologia tumoral e no entendimento acerca das relações tumor-hospedeiro permitiram grandes avanços no reconhecimento de antígenos associados a tumores (AAT). Estes passaram a ser considerados como substâncias capazes de promover uma reação no sistema imunológico e determinar a fixação de anticorpos específicos (31, 73, 108, 139).

Na última década, estudos de radioimunodeteção com anticorpos marcados gradualmente passaram do uso de anticorpos policlonais predominantemente marcados com  $^{131}\text{I}$  para anticorpos monoclonais (AcMc), ou seja, de maior especificidade, marcados com diversos rádioisótopos como o  $^{111}\text{In}$ , o  $^{123}\text{I}$ , o  $^{125}\text{I}$  e o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (12, 20, 35, 50, 58, 78, 90, 101, 109, 154, 158, 159, 170, 185).

Um dos maiores desafios no tratamento das doenças malignas consiste na identificação de estratégias terapêuticas capazes de destruir seletivamente as células neoplásicas, sem produzir efeitos adversos nos tecidos saudáveis do organismo (7, 44, 45, 130, 205). A vasta maioria dos agentes antineoplásicos em uso clínico, porém, apresenta, quando muito, uma baixa seletividade pelo tecido tumoral, exercendo sua ação terapêutica através da síntese de ácidos nucleicos relevantes para a duplicação do DNA e/ou RNA, ou promovendo distúrbios no processo normal de divisão celular (86, 194).

Uma vez que as diferenças bioquímicas entre células normais e neoplásicas parecem ser mais de tipo quantitativo do que qualitativo, os agentes antineoplásicos tendem a apresentar significativa toxicidade nos tecidos saudáveis nas doses utilizadas na rotina clínica, sobretudo naqueles tecidos caracterizados por uma alta taxa de auto-renovação, como a medula óssea, a mucosa do trato digestivo e os folículos pilosos (55, 227).

A despeito das óbvias limitações inerentes ao baixo índice terapêutico dos agentes antineoplásicos disponíveis, importantes avanços têm sido observados na curabilidade de algumas neoplasias avançadas, antes consideradas fatais. São exemplos a leucemia linfoblástica, a doença de Hodgkin, os linfomas não-Hodgkin e os tumores germinativos. Como seria desejável, o sucesso obtido no tratamento dos tumores acima mencionados não pode ser estendido à maioria dos tumores sólidos do adulto, como o câncer de pulmão, mama e colorretal. Nessas neoplasias, tão frequentes na população adulta, o impacto do tratamento sistêmico permanece ainda modesto (193, 227).

Torna-se imperativo, portanto, que novas estratégias terapêuticas anticâncer sejam desenvolvidas. Neste sentido, esforços têm sido dirigidos quanto à identificação de novos alvos bioquímicos e/ou moleculares presentes na célula tumoral, os quais possam favorecer a identificação de agentes com uma ação mais seletiva sobre o tecido neoplásico (7, 160, 162, 190).

### 1.3 - SELETIVIDADE DIAGNÓSTICA E TERAPÊUTICA

A reação antígeno-anticorpo obedece a um princípio essencial da Imunologia, segundo o qual cada linfócito B produz somente um tipo específico de imunoglobulina (Ig). Esse fenômeno é contemplado pela Teoria da Seleção Clonal (29, 41, 45, 60, 61, 62, 131, 166, 180, 181) a qual viabiliza uma explicação para a memória imunológica, através da distinção do que pertence ao indivíduo e do que não lhe pertence, da tolerância imunológica e da patogenia de várias doenças auto-imunes.

O uso de AcMc dirigidos a antígenos tumorais específicos parece representar uma das estratégias terapêuticas experimentais com maior potencial de seletividade. Uma vez que vários antígenos de superfície têm sua expressão aumentada em tecidos neoplásicos, quando comparados aos tecidos normais de mesma origem, estes assumem grande interesse como sítios potenciais para a ligação de AcMc, isolados ou conjugados a radioisótopos, imunotoxinas ou quimioterápicos, com finalidades diagnósticas e/ou terapêuticas (95, 163, 164, 206, 225, 229). Presentemente, vários AcMc têm sido testados com relativo sucesso em pacientes com tumores sólidos e hematológicos, antecipando a importância do seu papel no manejo de pacientes oncológicos no futuro (7, 8, 9, 12, 13, 14, 20, 25, 26, 28, 59, 64, 66, 87, 88, 89, 142, 147, 156, 212).

### 1.4 - ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os AcMc foram desenvolvidos em 1975 por Kohler e Milstein (123). Esta técnica revolucionou o estudo e a prática da Imunologia com a introdução do conceito de hibridoma, célula fusionada originária de um linfócito B sensibilizado e células de mieloma múltiplo, que mantêm, respectivamente, suas características de produção ilimitada de anticorpos específicos e imortalidade. Por esse método, cada linfócito B produzirá uma única Ig específica em resposta a um determinante antigênico. Esses anticorpos ou Igs são proteínas constituídas por duas cadeias peptídicas pesadas (longas) e iguais e duas leves (curtas) ligadas por pontes-dissulfeto. As cadeias podem ser separadas por mecanismos de

redução e acidificação, tornando o conjunto vulnerável a uma ação proteolítica, como a desencadeada pela papaína, que libera fragmentos Fab e Fc, assim como a pepsina que, com a clivagem da cadeia longa, libera fragmentos F (ab')<sub>2</sub>, Fab' e porção Fc. O sítio antigênico localiza-se na porção terminal da cadeia leve, e sua configuração contém o grupo dinitrofenil (DNF) em zona chamada de hipervariável (117, 138, 144, 181, 213, 225) (figura 1).

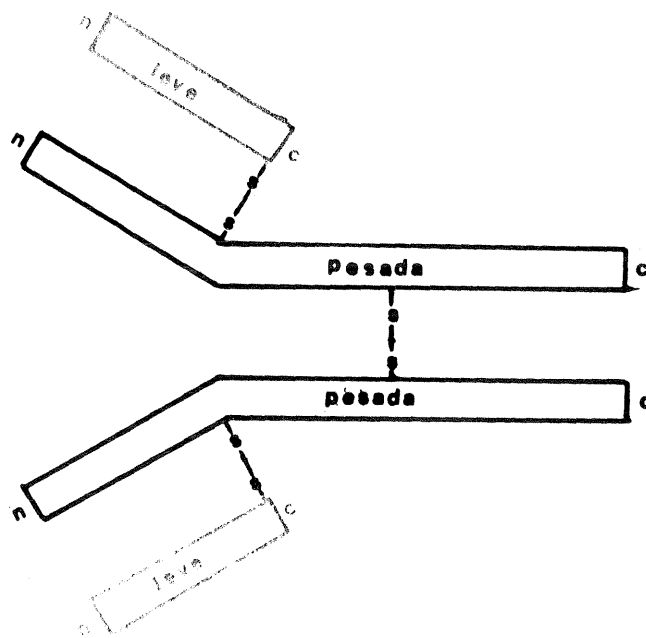


Fig. 1 - Representação esquemática da imunoglobulina.

Com relação a sua biodistribuição, é importante considerar a natureza da Ig, a espécie produtora e o hospedeiro, assim como os métodos de purificação e análise (3, 16, 19, 21, 29, 41, 53, 199).

Outro fator importante na biodistribuição é o catabolismo das Igs. Apesar de todas as variáveis técnicas e biológicas envolvidas, o estudo do metabolismo das Igs tem demonstrado que seus níveis plasmáticos são precisamente regulados, isto é, mediados por um mecanismo de reconhecimento de sua concentração plasmática sugerindo a presença de algum tipo de receptor para mediar trocas entre os diferentes compartimentos biológicos (53, 207, 229).

Nos anticorpos homogêneos e não-fragmentados, o desaparecimento sérico apresenta uma curva biexponencial (figura 2), com um rápido decréscimo na concentração intravascular do anticorpo, seguido por outro lento que sugere a presença de processo catabólico. A fase inicial de queda intravascular rápida acredita-se ser atribuída à necessidade de equilíbrio dos níveis de Igs nos compartimentos intra e extravascular (135, 137).

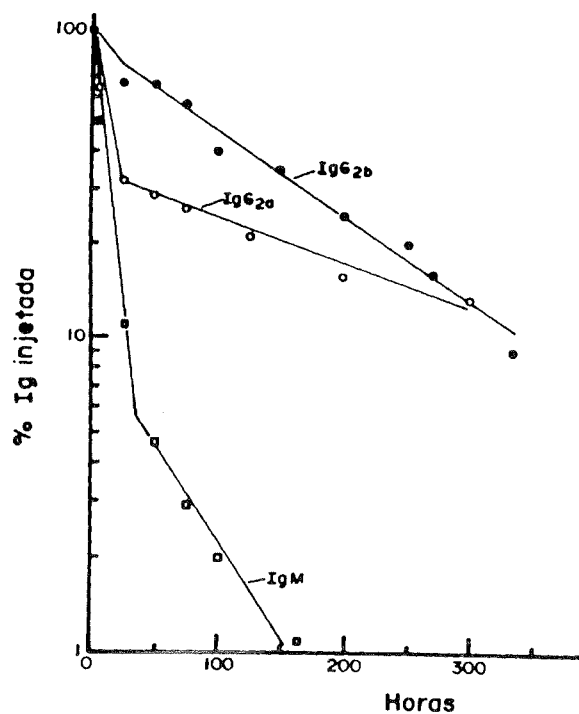


Fig. 2 - Curva biexponencial representativa do desaparecimento sérico das IgS.



AcMc associados a marcadores ou agentes terapêuticos são potencialmente úteis para imunodeteção de tumores assim como para imunoterapia. Os radioisótopos mais utilizados no momento são os derivados do iodo (halogênios) e os íons metálicos divalentes (15, 16, 35, 48, 60, 61).

Os AcMc têm sido empregados na localização de processos tumorais, uma vez que os mesmos expressam proteínas de superfície portadoras de diversos grupos funcionais, tais como sulfidril, carboxil e amino, os quais produzem reações específicas com os traçadores radioativos e antígenos tumorais (58, 88).

A marcação de AcMc com isótopos radioativos envolve modificações na estrutura molecular das proteínas, e o resultado final não deverá trazer prejuízos à afinidade e à avidéz do anticorpo em relação ao seu antígeno (19, 90, 127, 128, 163).

A escolha de um determinado radioisótopo em um dado sistema é condicionada por muitos fatores, entre eles a meia-vida biológica e efetiva do material radioativo no sistema biológico, porém o mais importante deles é a meia-vida física, uma vez que ela deve ser adequada à finalidade da investigação. A emissão de energia é ótima entre 100 e 200 Kev, promovendo com isso maior eficiência no sistema de detecção das gamas câmaras. O iodo ( $^{131}\text{I}$ ) é um dos isótopos radioativos mais utilizados, devido a suas propriedades fisico-químicas e baixo custo. Já o iodo ( $^{123}\text{I}$ ), que tem energia de 159 Kev e meia-vida física de 13 horas, seria ideal para imagem quanto a seus aspectos físicos, mas é de alto custo e disponibilidade limitada. Uma das maiores desvantagens dos isótopos iodados é sua de-halogenação nos tecidos alvo.

O  $^{111}\text{In}$  tem sido muito utilizado, sua meia-vida física é de 68 horas e seu custo é moderadamente elevado. O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  tem características ótimas para imagem com meia-vida física de 6 horas, o que permite doses maiores e, conseqüentemente, melhor qualidade de imagem que os demais isótopos.

O método de marcação de um determinado isótopo em relação a um anticorpo leva em conta o metabolismo do isótopo e a acessibilidade aos grupos funcionais do anticorpo.

Os principais métodos utilizados no momento são: a) substituição (no qual o radioisótopo é acrescentado na cadeia lateral da proteína); b) conjugação (no qual uma nova molécula orgânica, geralmente não aminoácido, é ligada ao grupo funcional da cadeia lateral da proteína). A associação de AcMc com elementos quelantes tais como dietilenotriaminopentacético (DTPA) ou etilenodiaminotetracético (EDTA), tem sido utilizada explorando sua atividade biológica *in vivo* como transportadores de íons metálicos (124, 129).

#### 1.6 - IMUNOMODULAÇÃO: OS INTERFERONS

Os interferons (IFNs) são uma família complexa de proteínas naturais ou glicoproteínas com peso molecular variando de 15 a 21 kd, as quais são elaboradas por certas células do organismo em resposta a distintos antígenos.

Desde sua descoberta por Isaacs e Lindemann em 1957 (110), foram isolados e classificados com base em suas características bioquímicas três grupos de IFNs: alfa, beta e gama. Os dois primeiros são também referidos na literatura como tipo I e são produzidos por leucócitos e fibroblastos, respectivamente, em resposta a vírus ou RNA. Da mesma forma, o tipo gama é reconhecido como tipo II, exibe pequena homologia com os demais, sendo produzido primariamente por linfócitos T em resposta a mitógenos ou exposição a antígeno.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, tornou-se possível a clonagem de genes humanos e a produção de grandes quantidades de material altamente purificado para investigação clínica (10, 22, 85, 172). Os genes responsáveis pela mensagem para síntese de interferon alfa e beta residem no braço curto do cromossoma 9, enquanto os genes responsáveis pela mensagem para a síntese de seus receptores se encontram no cromossoma 21. O gene para síntese do interferon gama está localizado no cromossoma 12, e o de seu receptor se situa no cromossoma 6.

Para que desempenhem suas funções biológicas, as moléculas devem se ligar a receptores específicos na membrana celular, produzindo efeitos como a inibição da atividade viral, ação microbicida, efeito antiproliferativo a um grande número de células neoplásicas, transformação e diferenciação celular, modulação do metabolismo lipídico, inibição da angiogênese, regulação da expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classes I e II, receptores Fc para Ig e antígenos associados, aumento da citotoxicidade das células T e das células natural killer (NK), além de outras funções imunomodulatórias ainda em estudo (7, 112, 143, 183, 216).

Antígenos tumorais podem ser expressos tanto na superfície de células normais como neoplásicas. Entretanto a quantidade de certos antígenos expressos nas células tumorais pode ser consideravelmente maior do que nos tecidos normais. Tal diferença quantitativa parece de crucial importância na identificação mais seletiva desses tecidos (22, 219).

Tanto na célula normal como na neoplásica, os IFNs se ligam a receptores específicos, os quais "disparam sinais regulatórios" ao núcleo, modulando a síntese protéica. A ação desencadeada pode ser de caráter inibitório ou estimulante, e tem sido demonstrado que aproximadamente 100 de 10000 proteínas celulares são modificadas na presença de interferon alfa como, por exemplo, aumento na expressão de antígenos classe I-histocompatibilidade leucocitária (HLA) e a síntese de polimerase 2-5A sintetase. Além disto, os IFNs têm sido associados à modulação de antígenos de superfície em vários tumores murinos e humanos em cultura (10, 11, 132, 219, 221).

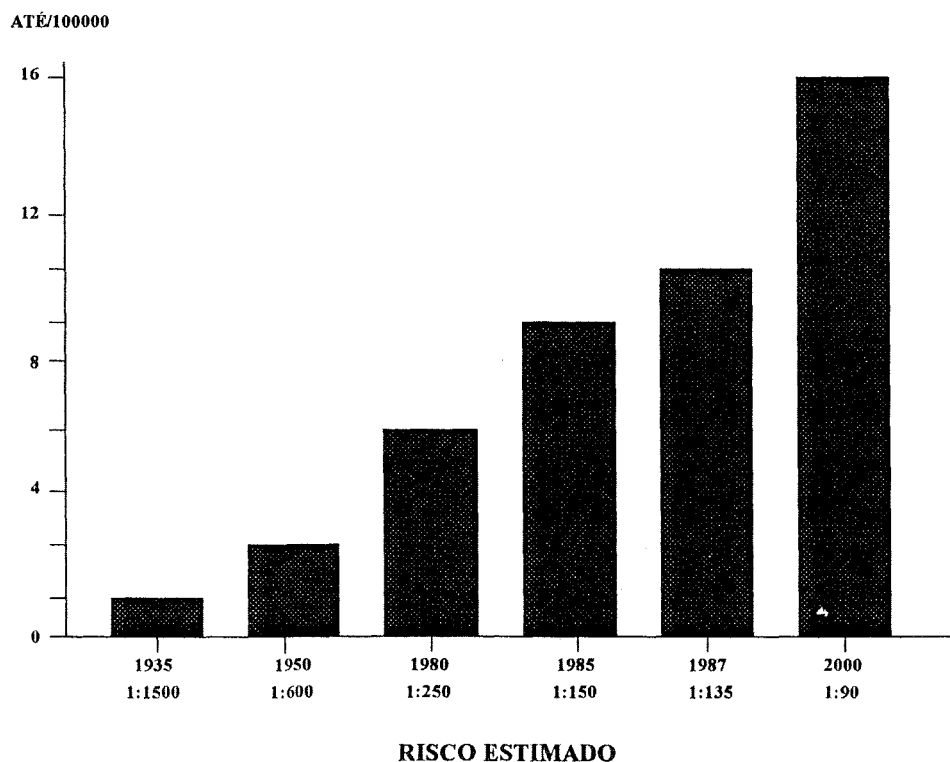
Deve-se salientar que a expressão de antígenos de superfície presentes na membrana de células neoplásicas pode ser modificada pela ação de hormônios, fatores de crescimento ou citocinas em modelos experimentais. Portanto torna-se atraente o estudo de substâncias que possam modular a expressão desses antígenos, favorecendo assim a ligação de AcMc a esses sítios tumorais específicos. Neste sentido cabe observar a capacidade de os IFNs modularem a expressão de antígenos tumorais em várias linhagens celulares (33, 51, 71, 84, 85, 221).

A imunomodulação por IFNs parece seguir um modelo de reação bimodal à dosagem. Dependendo da dosagem e do período de administração, os IFNs podem tanto estimular como inibir funções imunológicas (71, 85, 216, 219, 221).

Por sua crescente incidência, apreciável capacidade imunogênica, reconhecida sensibilidade à terapêutica imunológica inespecífica e refratariedade ao tratamento antineoplásico convencional, o melanoma maligno (MM) se constitui em um modelo clínico adequado para estudos com AcMc e imunomoduladores.

Os melanomas são tumores malignos derivados dos melanócitos, os quais têm origem ectodérmica e são encontrados na pele, meninges, trato uveal do sistema ocular e mucosa ectodérmica. Os melanócitos sintetizam melanina através de organelas chamadas melanosomos.

Nos últimos anos, o MM tem apresentado um aumento de incidência em vários países (4, 6, 122). Ele costuma ocorrer sobretudo em indivíduos de cor branca, com uma taxa de incidência ajustada à faixa etária de 12 casos para cada 100.000 habitantes nos Estados Unidos, podendo chegar a 30 casos por cada 100.000 habitantes em outras regiões geográficas. Estatísticas anteriores oriundas dos Estados Unidos revelam que 1 em cada 1500 indivíduos desenvolveu MM no ano de 1935, ao passo que, em 1987, a relação passou a ser de 1 para cada 135 indivíduos. Para o ano 2000 estima-se que 1 caso de MM será diagnosticado para cada 90 indivíduos (figura 3) (6, 63).



Fonte: U.S.- J. Am. Acad. Dermatol., 1987

Fig. 3 - Incidência do melanoma - risco estimado.

Dados epidemiológicos oficiais referentes ao ano de 1991 naquele país indicam que cerca de 32000 indivíduos desenvolveram MM, dos quais mais de 6000 foram a óbito. Na última década, à exceção do câncer de pulmão em mulheres, o MM foi o tumor com maior aumento de incidência. As causas do fenômeno não estão esclarecidas, mas devem ter relação com a maior exposição a raios de tipo ultravioleta e com os avanços observados em sua detecção precoce (6).

No Brasil, não se dispõe de dados estatísticos quanto à incidência desta neoplasia. Entretanto poder-se-ia inferir que, uma vez possuindo uma latitude próxima à da Austrália, além do predomínio de correntes de imigração européia de países com populações de pele clara, os estados do sul devam ter uma incidência superior à dos demais estados brasileiros e, talvez, muito próxima à de países como a Austrália.

Esta neoplasia tem sido associada à expressão de vários antígenos de superfície, os quais podem ser potencialmente reconhecidos através da ligação a anticorpos específicos (1, 5, 15, 20, 24, 28, 30, 33, 35, 37, 52, 69, 70, 71, 72, 81, 96, 99, 100, 104, 108, 111, 136, 161, 228).

Análises de metástases de melanoma revelam uma grande heterogeneidade de expressão de antígenos de membrana. Dois tipos de antígenos vêm merecendo particular atenção: a) antígenos expressos durante a diferenciação melanocítica; b) antígenos expressos durante a transformação maligna dos melanócitos (38, 43, 58, 98, 105, 126, 162, 167, 191).

Dentre os antígenos expressos na superfície de células de melanoma, alguns têm recebido especial atenção da investigação e terapêutica experimental dos melanomas. Dentre eles, podem ser citados a melanotransferrina, também conhecida como P97/GP95, a melanocondroitina sulfato proteoglican (mCSP) e os antígenos glicolipídios GD2 e GD3. (169, 173, 174)

A melanotransferrina é uma glicoproteína de 95000 a 97000 daltons, identificada por mais de 10 diferentes AcMc. Usando AcMc contra epítomos distintos sobre a melanotransferrina, tem sido possível medir a expressão deste antígeno em tumores e tecidos normais. Pequenas quantidades são expressas na maioria dos tecidos normais, particularmente útero, bexiga, músculos, cólon e fígado. A mais alta expressão tem sido encontrada

na musculatura lisa, com 8000 moléculas por célula. A maioria dos melanomas expressa níveis mais elevados por célula, variando de 50000 a 500000 moléculas por célula. Assim, existe uma relação de 10 a 1000 vezes maior quando comparada a expressão tumoral com a das células normais (1).

Uma série de AcMc reconhece o complexo acima descrito (mais de 500 kd) (24, 28, 30, 126). O antígeno mCSP é expresso na maioria dos melanomas e nevos assim como nos tecidos normais, em pequenos vasos sanguíneos e em irregularidades da superfície celular das células de melanoma no domínio que envolve a interação de célula a célula e contatos da célula com seus substratos. Esses achados sugerem que o mCSP tenha uma relevante função na adesão a outras células e outros tecidos, podendo ter um papel importante no mecanismo das metástases. O gene que codifica a principal parte da proteína do mCSP é codificado ou regulado por um locus do cromossoma 15. Este antígeno não tem sido encontrado, em níveis significativos, no soro de pacientes portadores de melanoma em qualquer estágio clínico da doença (69, 126).

A diversidade dos gangliosídeos é determinada extensamente pela composição das cadeias de oligossacarídeos, posição e número do ácido siálico. Um grande número de AcMc parece reagir com carboidratos, e muitos antígenos tumorais são determinantes oligossacarídeos. Células de melanoma são ricas em gangliosídeos, sendo o GD3 o de maior expressão, seguido pelo GD2 (31). O disialogangliosídeo GD3 é expresso em muitos tecidos normais, incluindo subpopulações de neurônios, medula da adrenal, melanócitos e tecido conectivo em uma grande variedade de órgãos (34, 52, 41, 73). Melanócitos normais em cultura expressam somente baixos níveis de GD3, enquanto células de melanoma expressam altos níveis (133).

Deve-se ressaltar que a sobrevida de pacientes com melanoma maligno metastático permanece extremamente limitada, a despeito de quaisquer abordagens terapêuticas sistêmicas disponíveis: quimioterapia, imunoterapia ou hormonioterapia. Os pacientes apresentam, via de regra, sobrevida média inferior a 10% nos primeiros 24 meses após o diagnóstico (122).

Devido a fatores constitucionais, o melanoma passou a ser objeto de análise e fonte de estudos imunocitoquímicos como comprovam os trabalhos do *workshop* sobre hibridoma

(114, 182). Essas pesquisas utilizaram diversos AcMc que se encontravam disponíveis para testagem clínica. Assim sendo, o AcMc 22528S da classe IgG2a, capaz de reconhecer antígenos de alto peso molecular associados a esta neoplasia, foi desenvolvido na Universidade de Columbia (USA) por Imai, Ferrone e colaboradores (108, 109) e teve reconhecimento de sua especificidade (Anexo 1). Dos trabalhos que se seguiram, pode-se caracterizar como o mais significativo sobre o uso deste AcMc o estudo multicêntrico coordenado por Siccardi (204), em 1986, no qual 254 pacientes portadores de MM foram investigados em dez diferentes serviços através do AcMc 22528S com uma sensibilidade de 70%.

Por esta razão, o presente trabalho avaliou pacientes portadores dessa neoplasia como modelo para testar a hipótese de que, uma vez existindo uma retenção preferencial do AcMc no tecido neoplásico, ela poderia ser modulada pela administração de IFNs.

---

---

## 2 - OBJETIVOS

---

---



---

## 2 - OBJETIVOS

- 1) Estudar a segurança do AcMc 22528S, quando conjugado ao radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$ , após administração endovenosa em pacientes portadores de MM.
- 2) Documentar a capacidade do IMc em se localizar preferencialmente no tecido tumoral.
- 3) Avaliar o potencial do interferon alfa como modulador da expressão do(s) antígeno(s) de membrana presente(s) em melanoma maligno humano (MMH), através do estudo imunocintilográfico com o IMc acima mencionado.
- 4) Gerar observações preliminares a cerca da potencialidade diagnóstica e terapêutica desta nova estratégia.

---

---

### 3 - PACIENTES E MÉTODOS

---

---

---

### 3 - PACIENTES E MÉTODOS

#### 3.1 - CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Foram incluídos no estudo 49 pacientes adultos, com idade entre 18 e 75 anos e diagnóstico de MM, os quais buscaram atendimento ambulatorial no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no período compreendido entre agosto de 1990 e maio de 1991. A confirmação diagnóstica foi obtida a partir da revisão do exame anatomopatológico original por especialista do Serviço de Patologia do HCPA. Antes de ingressarem no estudo, os pacientes foram informados do protocolo e assinaram um termo de consentimento pelo qual eram informados não só sobre a natureza da investigação como também sobre os potenciais riscos a que estariam submetidos (Anexo 2).

#### 3.2 - CARACTERÍSTICAS DO ANTICORPO UTILIZADO

O AcMc utilizado foi o denominado 22528S da classe IgG2a (Tecnimab-K-1; Sorin Biomédica, Saluggia, Vercelli, Itália). O mesmo foi gerado a partir de células de MMH, sendo capaz de reconhecer antígenos de alto peso molecular em membrana celular deste tipo de neoplasia. A dose média utilizada do anticorpo foi de 0,0025 mg/kg, a qual foi semelhante à adotada em experimentações prévias (108, 188, 197), e sua correspondente dosimetria corporal encontra-se no Anexo 3.

### 3.3 - ELABORAÇÃO DO IMUNOCONJUGADO

Para a formação do imunoc conjugado, procedeu-se à marcação *in vitro* do anticorpo 22528S com tecnécio ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), utilizando 1100 MBq em 1 ml de volume máximo para 0,350 mg/frasco de anticorpo "frio" liofilizado, por um tempo padronizado de 15 minutos. Posteriormente, levou-se este conteúdo a uma coluna de cefadex, com a finalidade de reter microorganismos e material livre. A essa preparação, adicionaram-se 3 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%), para facilitar o preparo das dosagens para uso clínico e controle cromatográfico.

### 3.4 - CONTROLE DE QUALIDADE DO IMUNOCONJUGADO

O controle de qualidade do imunoc conjugado foi efetuado através de cromatografia em coluna de Bio-Gel de poliacrilamida tipo P-6 na proporção de uma coluna para cada cinco frascos de AcMc. Esta técnica discrimina frações moleculares da solução, utilizando resinas sintéticas granuladas, as quais imitam a ação do cefadex, mas com a vantagem de serem inorgânicas e não sofrerem a ação bacteriana. O método de separação tem como princípio a retenção de íons livres de tecnécio nos poros do polímero, através da estrutura da coluna, sem que ocorra troca iônica. A molécula ligada não sofre esta ação devido a suas dimensões, passando ao lado dos poros da coluna, precipitando-se rapidamente na porção mais inferior da mesma e expressando, portanto, a quantidade total de material conjugado na amostra (figura 4).

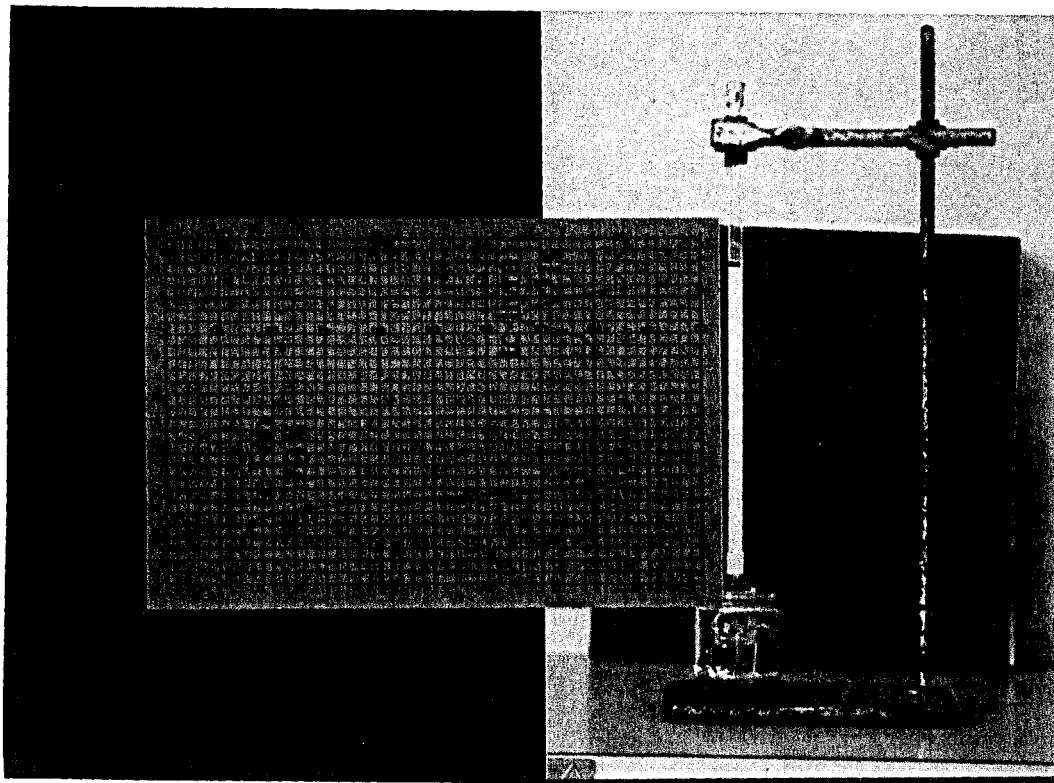


Fig. 4 - Cromatografia de coluna. Coluna de Bio-Gel tipo P-6.

### 3.5 - ESTUDOS IMUNOCINTILOGRÁFICOS

Os estudos imunocintilográficos foram realizados através de injeção endovenosa do IMc, sempre em membro oposto ao do local de investigação, utilizando gama câmara com sistema computadorizado CGR-ADAC e OHIO-Nuclear com matriz 128x128, magnificação 2.0 e pré-seleção temporal de 10 minutos por imagem. A quantificação dos mesmos foi feita através da relação entre a contagem de radiação (rad) proveniente da região em estudo (ou *tumoral*) e o tecido de fundo (*background*). Os resultados foram expressos como quociente (Qc) normalizado por pixel em relação à radiação total de cada área. Esta relação pode ser representada como se segue:

$$Qc = \text{captação tumor} / \text{fundo}$$

ou

$$\text{contagem rad/área do tumor} / \text{contagem rad/área do tecido de fundo}$$

Assim, o Qc resultante expressa o número de vezes em que a captação do IMc é superior no tumor em relação ao tecido normal de fundo. Os cálculos foram efetuados por um observador independente, no sentido de evitar a interferência do autor na coleta dos resultados.

### 3.6 - TESTAGEM CLÍNICA DE CONTROLE COM O RADIOISÓTOPO ISOLADO

Em sua fase preparatória, imagens cintilográficas com  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  isolado na dose de 5,55 MBq/kg de eluato de tecnécio foram obtidas em pacientes com melanoma metastático diagnosticado através de métodos convencionais (exame clínico e/ou métodos diagnósticos complementares, tais como exame radiológico, ecográfico, tomográfico ou ressonância magnética) e com confirmação anatomopatológica. Tal procedimento tinha em vista confirmar a ausência de retenção seletiva do radioisótopo no tecido tumoral, bem como nas áreas de maior fluxo sanguíneo e/ou atividade metabólica inespecífica.

### 3.7 - ESTUDO-PILOTO DE SEGURANÇA E BIODISTRIBUIÇÃO DO IMUNOCONJUGADO

Posteriormente, um grupo de 5 pacientes (piloto) foi submetido à administração endovenosa do IMc na concentração de 0,175 mg do anticorpo 22528S com uma dose de 5,55 MBq/kg de eluato de tecnécio, para se proceder a uma testagem-piloto de segurança do anticorpo e confirmar as descrições prévias quanto à biodistribuição do IMc. Na seqüência, foram caracterizados os melhores tempos para a realização de imagens imunocintilográficas. Desta forma, procurou-se avaliar a captação do IMc nas áreas de lesões metastáticas, levando em consideração a biodistribuição do anticorpo em vários intervalos de tempo previamente estabelecidos (1, 2, 4, 6, 8, 12, 20 e 24 horas).

Os intervalos de tempo 1-2, 6-8 e 20-24 horas foram tomados como referenciais, sendo que o intervalo 6-8 horas pós-administração do IMc foi selecionado para imagens no seguimento do estudo, uma vez que a relação tumor versus tecido normal mais favorável para a obtenção de imagens foi documentada nesse intervalo.

### 3.8 - TESTAGEM CLÍNICA DE SEGURANÇA DO IMUNOCONJUGADO

Foram então estudados 20 pacientes consecutivos (grupo segurança) com diagnóstico anatomopatológico de MM sem evidência de processo metastático, os quais foram submetidos a uma testagem de segurança do anticorpo. Os critérios básicos de inclusão consideraram a idade entre 18-75 anos, diagnóstico confirmado de MM, performance clínica entre 0-2 estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e consentimento informado previamente aprovado pela Comissão de Ética do HCPA (Anexos 2 e 4). Esta etapa teve como finalidade confirmar a ausência de riscos aos pacientes pela administração do IMc, além de permitir a padronização da técnica de marcação, controle de qualidade do anticorpo e das imagens *in vivo*.

### 3.9 - ESTUDO IMUNOCINTILOGRÁFICO EM PACIENTES COM LESÕES METASTÁTICAS

Na seqüência, um grupo de 10 pacientes adicionais (grupo confirmação) foi incluído, com o objetivo de estudar a hipótese de que o imunoc conjugado, uma vez contendo um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer antígenos de alto peso molecular MMH, levaria a uma maior captação do mesmo na região correspondente ao tecido neoplásico.

Uma vez estabelecidas as condições de utilização do IMc e comprovada a sua capacidade de concentração preferencial no tecido tumoral versus tecido normal nos pacientes acima descritos, procedeu-se à realização da etapa seguinte do estudo. Nesta fase, o autor avaliou o efeito do interferon alfa como modulador da expressão dos antígenos de superfície reconhecíveis pelo AcMc 22528S. Para tanto, utilizou-se a análise de imagens cintilográficas e quantificação da captação antes e após o uso de interferon alfa.

Uma vez que este estudo seria inviável do ponto de vista logístico através de um desenho prospectivo e randomizado, optou-se pelo uso de uma avaliação seqüencial não-randomizada de cada paciente, utilizando-se o mesmo indivíduo como seu próprio controle. Os pacientes incluídos nesta fase (grupo modulação) possuíam lesões metastáticas em zonas previamente selecionadas através de uma baixa captação de fundo, por exemplo, nas regiões axilar e/ou inguinal. Inicialmente, os pacientes foram submetidos a um exame imunocintilográfico de base com o IMc acima descrito, seguido, após 24 horas, da administração de interferon alfa (3 milhões de UI/m<sup>2</sup>) por via subcutânea diária, por 5 dias consecutivos. Ao final desse intervalo, uma nova imunocintilografia (ICT) era realizada. Desta forma, as imagens pré e pós-interferon alfa puderam ser comparadas em cada um dos paciente.

Uma vez que não houve toxicidade demonstrável nos primeiros 7 pacientes incluídos nesta fase e que receberam interferon alfa, foram incluídos 3 pacientes adicionais em um nível de dose mais elevado, isto é, 5 milhões de UI/m<sup>2</sup> por via subcutânea diária durante 5 dias. Ainda que cada paciente tenha sido utilizado como seu próprio controle, 2 casos adicionais foram avaliados segundo o mesmo protocolo, mas com a administração de solução fisiológica em substituição ao interferon alfa. Com isto, poder-se-ia afastar o risco de grandes variações de captação do IMc que ocorressem de forma independente do efeito do interferon alfa em estudo.



Todos os pacientes foram submetidos a exames laboratoriais de rotina, incluindo hemograma, eletrólitos, provas de função renal e hepática, bem como dosagem de anticorpos humanos antiimunoglobulinas de origem murina (Etihamak-Sorin Biomédica, Itália). A performance clínica dos pacientes e os efeitos adversos foram descritos e quantificados segundo os critérios estabelecidos pela OMS.

---

---

## 4 - RESULTADOS

---

---

---

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Com base em dados históricos da instituição, pode-se inferir que as características dos 49 pacientes incluídos nas diferentes etapas deste estudo não diferiram das observadas na população de indivíduos portadores de MMH que normalmente buscam atendimento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sobretudo no que diz respeito ao sexo, idade, performance clínica, tipo de lesão primária e estadiamento da doença. Além disto, as revisões anatomopatológicas realizadas no material oriundo da peça cirúrgica confirmaram o diagnóstico de MMH em todos os casos estudados.

### 4.2 - CARACTERÍSTICAS, ELABORAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO IMUNOCONJUGADO

A preparação sistemática do controle cromatográfico resultou no aprimoramento da técnica e do resultado final conforme os dados abaixo (tabela 1). A análise cromatográfica de coluna utilizando gel de poliacrilamida tipo P6 foi realizada imediatamente após a marcação *in vitro*, por seis oportunidades durante os estudos, através de sonda especial (figura 5). Estes resultados, representados pela chamada “Relação de Frente”, ou seja, a correlação da migração da molécula e do elemento livre contra a do tampão fosfato-albumina (sempre 100%), permitem avaliar o grau de ligação do IMc. O grupo piloto, agrupado com a finalidade de definir o melhor momento para investigação imunocintilográfica, foi

composto por cinco pacientes e apresentou a relação de 57% para a fração Tc-Fab e de 43% para a fração livre (figura 6). No grupo segurança, assim caracterizado por avaliar a segurança na administração do anticorpo em relação a um grupo de 20 pacientes com diagnóstico de MMH sem evidência clínica ou laboratorial de metástase, a relação foi de 74% para a fração ligada e de 26% para a fração livre (figura 7), assim como no grupo confirmação, composto por pacientes portadores inequívocos de lesão metastática (n=10), o resultado obtido foi de 79% para a fração ligada e de 21% para a fração livre (figura 8). O último, chamado de grupo modulação e composto por 12 pacientes, teve a seguinte “Relação de Frente”: 83% para a fração ligada e 17% para a fração livre, com a finalidade de avaliar a modulação do AcMc 22528S em relação ao interferon alfa nos subgrupos referidos na seção 3.10 (figura 9).

**REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA QUANTIFICAÇÃO DO ANTICORPO 22825S MARCADO COM TECNÉCIO (Tc-Fab) VERSUS TECNÉCIO LIVRE NOS DIVERSOS MOMENTOS.**

**TABELA 1 - CROMATOGRAFIA DE COLUNA X GRUPOS DE ESTUDO**

VALORES MÉDIOS Tc-Fab / Tc-Livre	GRUPO	Nº DE PACIENTES	Nº DE EXAMES
57% / 43%	piloto	5	5
74% / 26%	segurança	20	20
79% / 21%	confirmação	10	10
83% / 17%	modulação	12	24

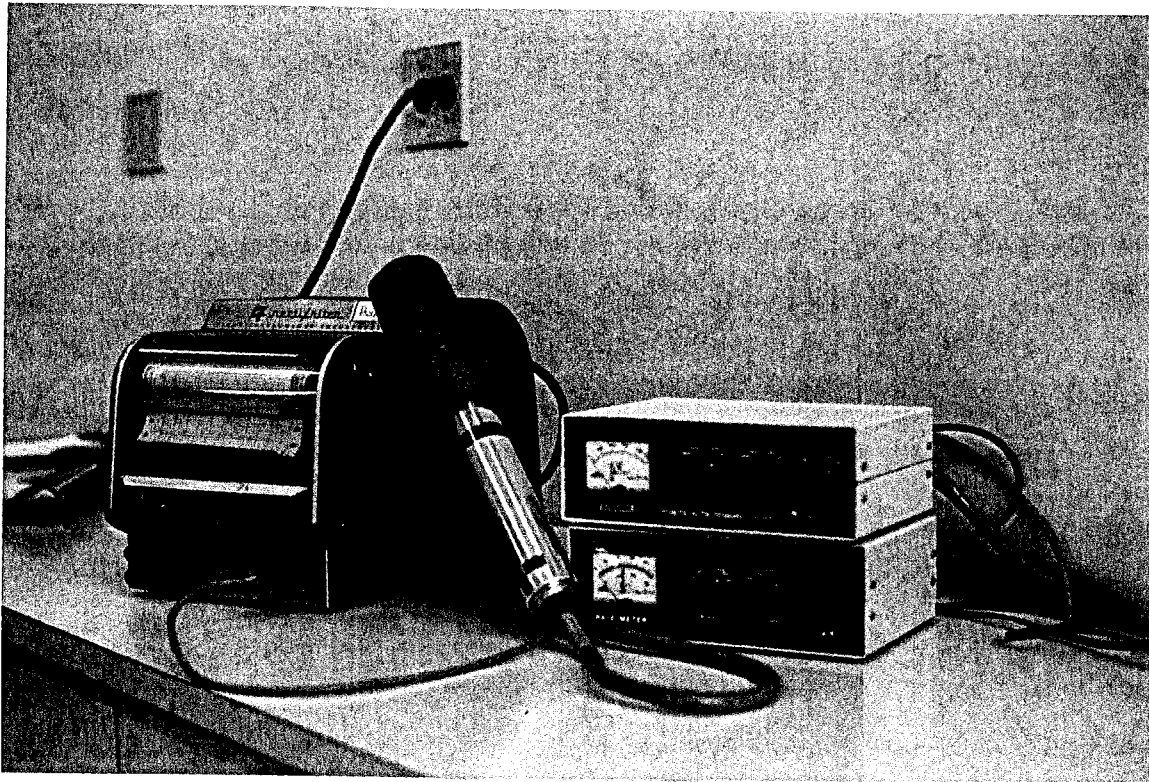


Fig. 5 - Sonda de detecção e sistema de registro gráfico.

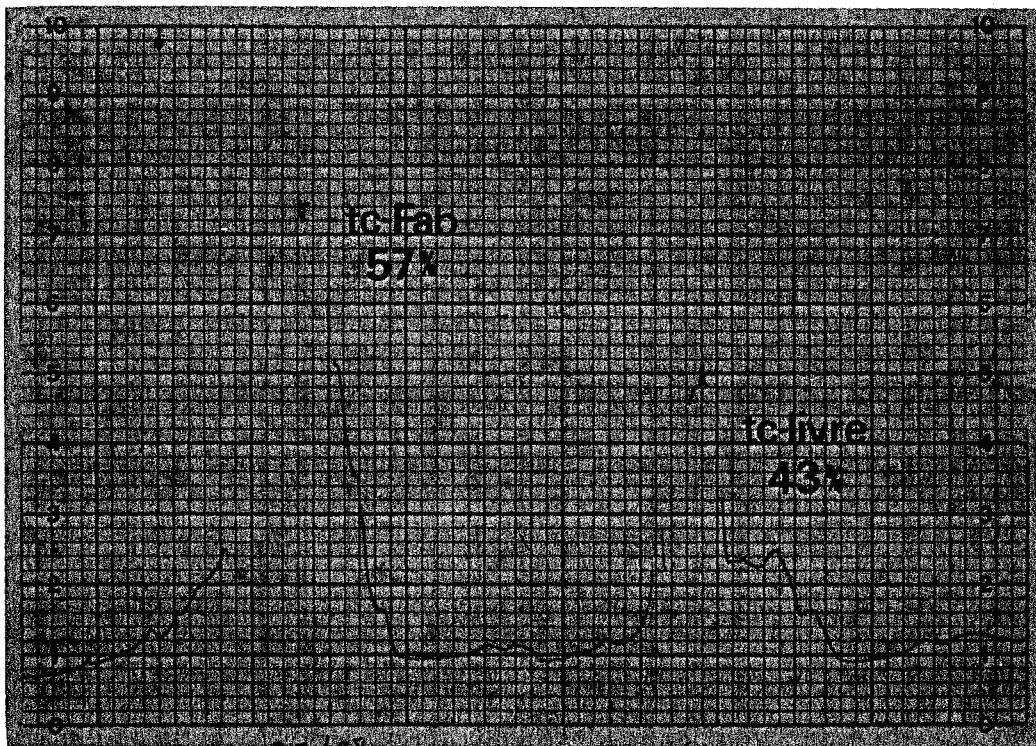


Fig 6 - Cromatografia de coluna do grupo piloto.

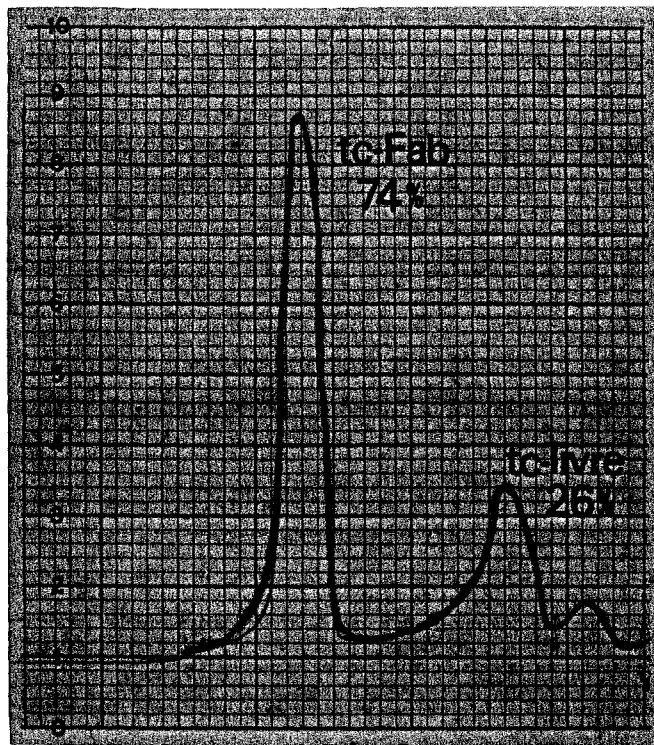


Fig. 7 - Cromatografia de coluna do grupo segurança.

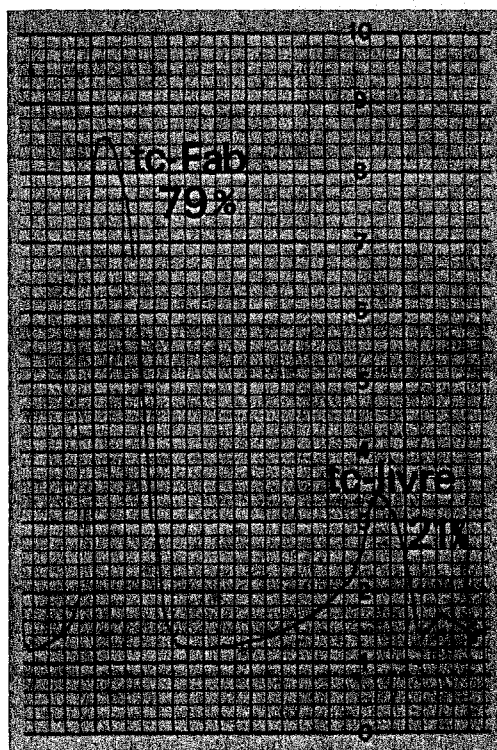


Fig. 8 - Cromatografia de coluna do grupo confirmação.

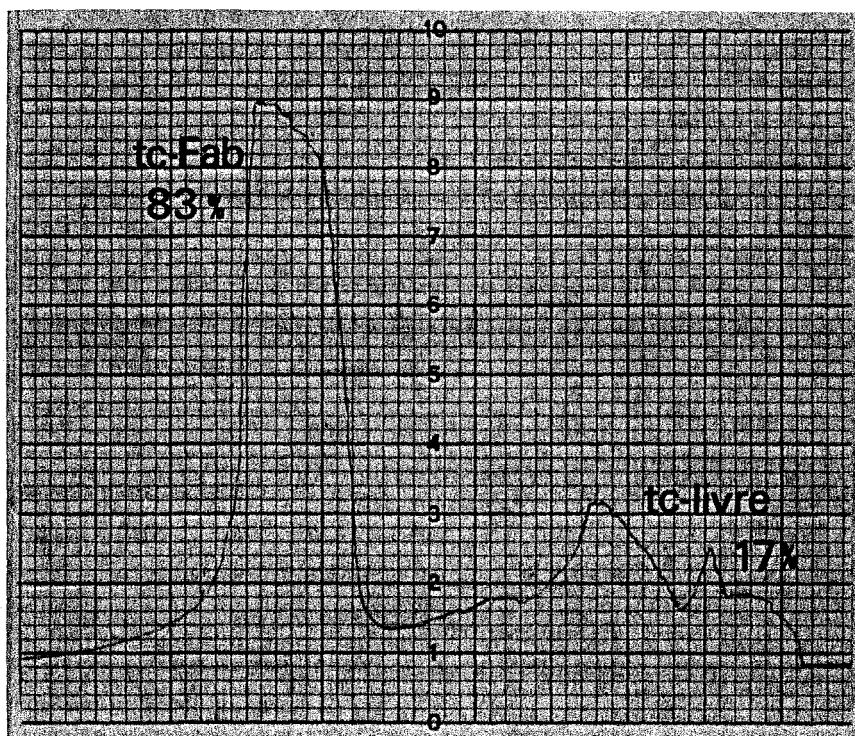
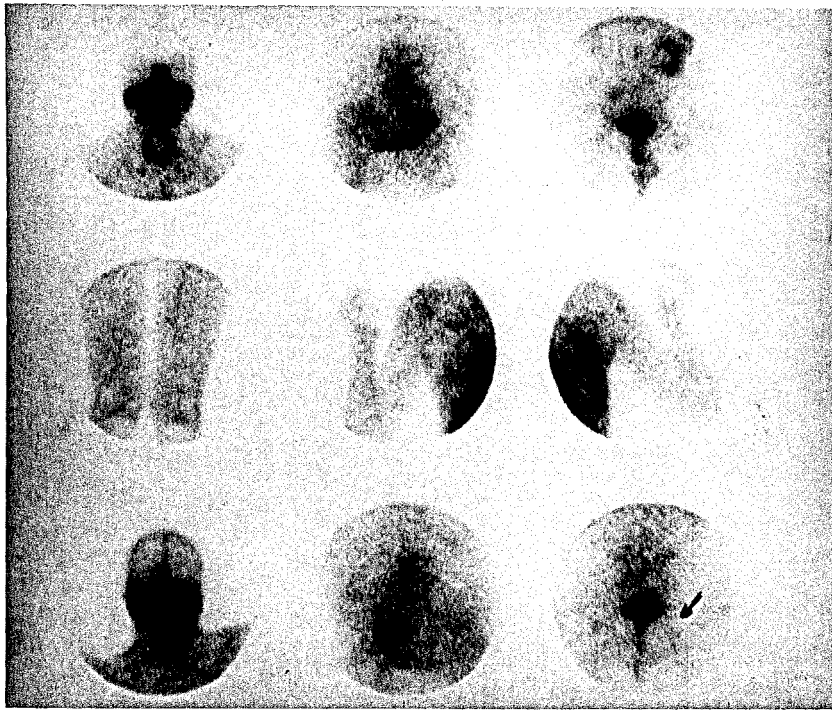


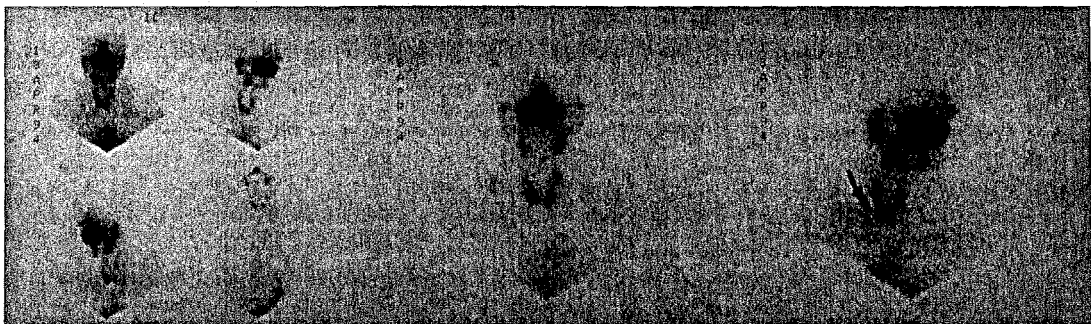
Fig. 9 - Cromatografia de coluna do grupo modulação.

#### 4.3 - ESTUDOS IMONOCINTILOGRÁFICOS INICIAIS E TESTAGEM DE CONTROLE

Com o objetivo de aferir a distribuição do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  isolado nos diferentes tecidos do organismo, o radioisótopo não-ligado ao AcMc foi injetado por via endovenosa em dois pacientes com melanoma metastático portadores de lesões em áreas de baixa captação de fundo. O Qc de captação foi próximo a 1.0, não revelando captação seletiva do radioisótopo nas lesões metastáticas (figuras 10 e 11).



**Fig. 10** - Distribuição do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  no sítio tumoral. Paciente com MM (2,0 x 2,0 cm) em região inguinal esquerda. Observa-se apenas a distribuição característica do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  com evidência para glândulas salivares, estômago, tireóide e bexiga.



**Fig. 11** - Distribuição do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  em área de linfonodo metastático em região supraclavicular direita.



A avaliação imunocintilográfica seqüencial em até 24 horas após a administração do IMc foi realizada em cinco pacientes (grupo piloto), permitindo a padronização da técnica de injeção bem como a definição do momento mais adequado para as imagens subseqüentes. Nesse sentido, os tempos 6-8 horas foram considerados os de maior relação de captação no tecido tumoral versus tecido normal de fundo. Os achados estão resumidos nas figuras 12 e 13.

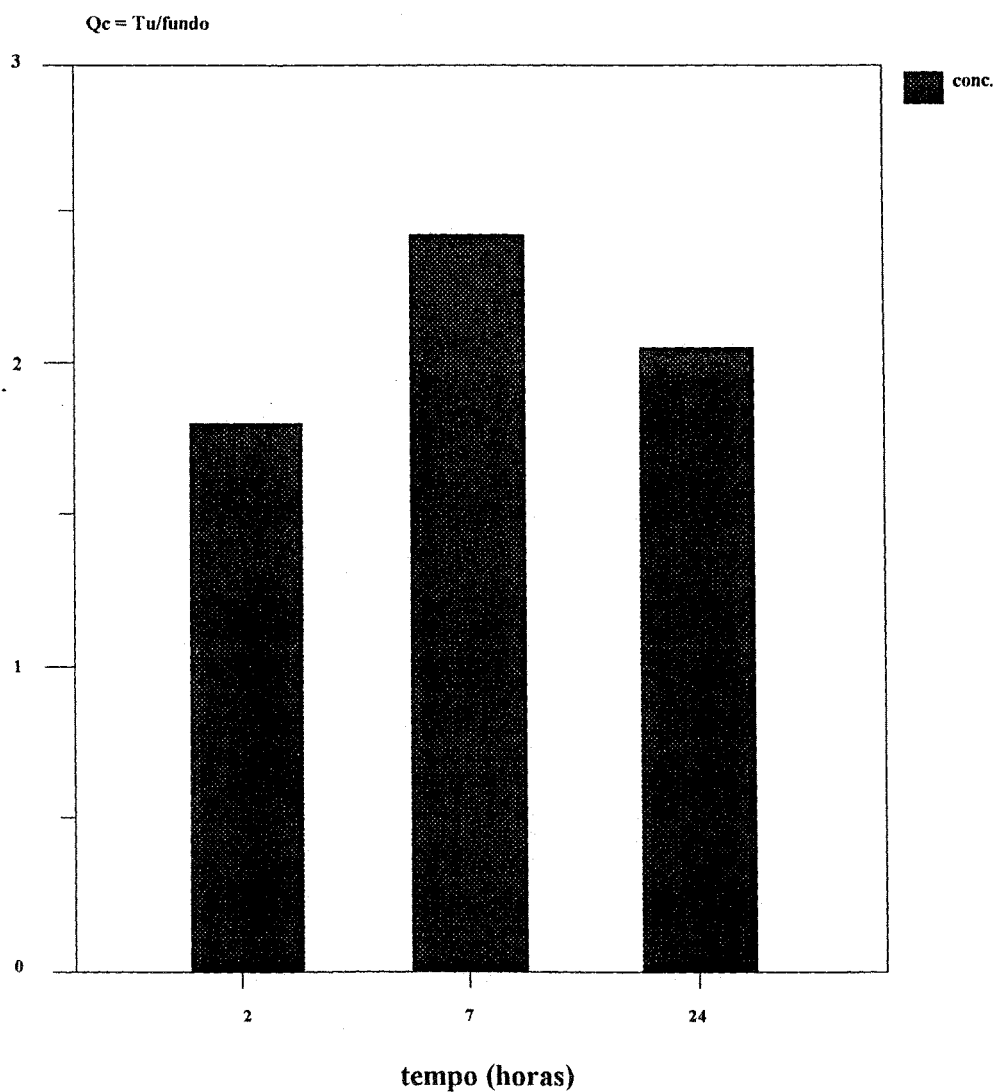


Fig. 12 - Resultados de estudos de cinética de captação até 24 horas pós-injeção endovenosa do IMc na projeção das lesões metastáticas de MM.

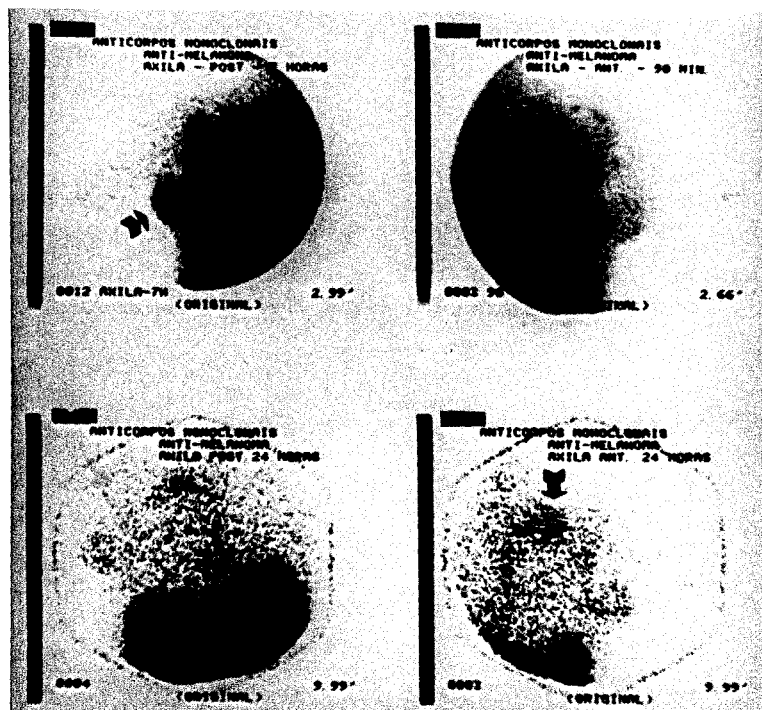


Fig. 13 - Exemplo de estudo imunocintilográfico com o anticorpo 22825S marcado com  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  em um paciente com MMM. Nesta etapa, os autores buscaram definir os melhores tempos e relações de retenção do Imc no tumor/tecido de fundo para a seleção das imagens subsequentes.

Os estudos de biodistribuição do anticorpo e do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  puderam confirmar dados previamente observados quanto aos sítios de captação fisiológica e zonas correspondentes a possíveis concentrações do IMc no tecido tumoral. Os resultados estão ilustrados nas figuras 14 e 15.

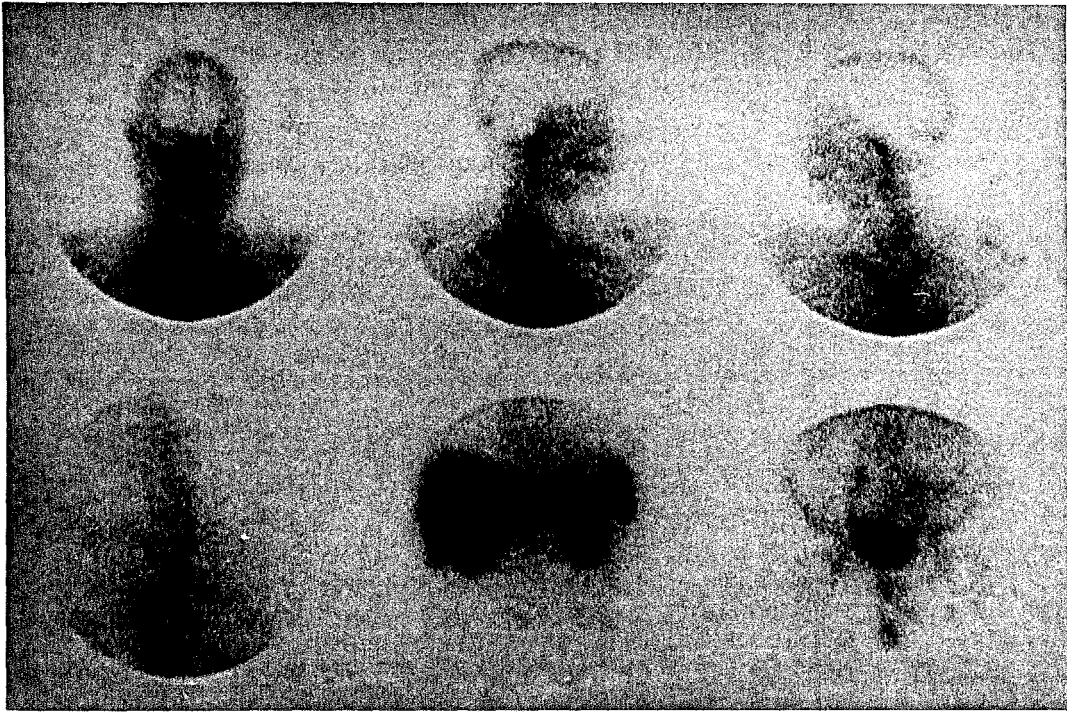


Fig. 14 - Nota-se ausência do IMc em glândulas salivares, tireóide e estômago enquanto que altas concentrações são observadas no fígado, baço e rins.



Fig. 15 - Nesta figura, observa-se uma concentração preferencial do IMc no cólon ascendente, ilustrando uma das formas de sua desativação.

Quanto à testagem de segurança do IMc em pacientes (grupo segurança), pode-se concluir pela ausência de quaisquer efeitos adversos significativos, mesmo após uma observação ambulatorial de quatro semanas. Queixas isoladas de dor leve a moderada no sítio de administração do IMc foram documentadas em apenas três casos. As queixas foram sempre inespecíficas e se resolveram em curto espaço de tempo, não tendo sido seguidas por sinais inflamatórios ou infecciosos locais. Os resultados confirmam a total ausência de efeitos adversos decorrentes da administração do IMc.

Na seqüência, um grupo de 10 pacientes (grupo confirmação) com lesões metastáticas em sítios de baixa captação de fundo foi analisado quanto à capacidade de retenção seletiva do IMc na região da massa tumoral. As características de alguns destes pacientes estão ilustradas abaixo (figuras 16, 17, 18 e 19).

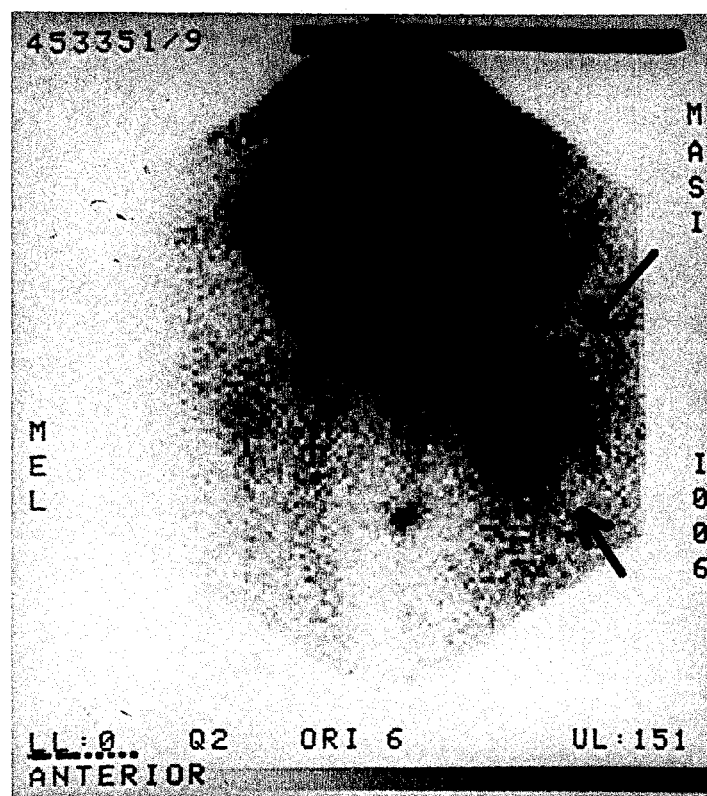


Fig. 16 - Nesta figura, observa-se uma grande concentração do IMc na região correspondente a uma massa metastática no terço proximal da coxa esquerda (setas).

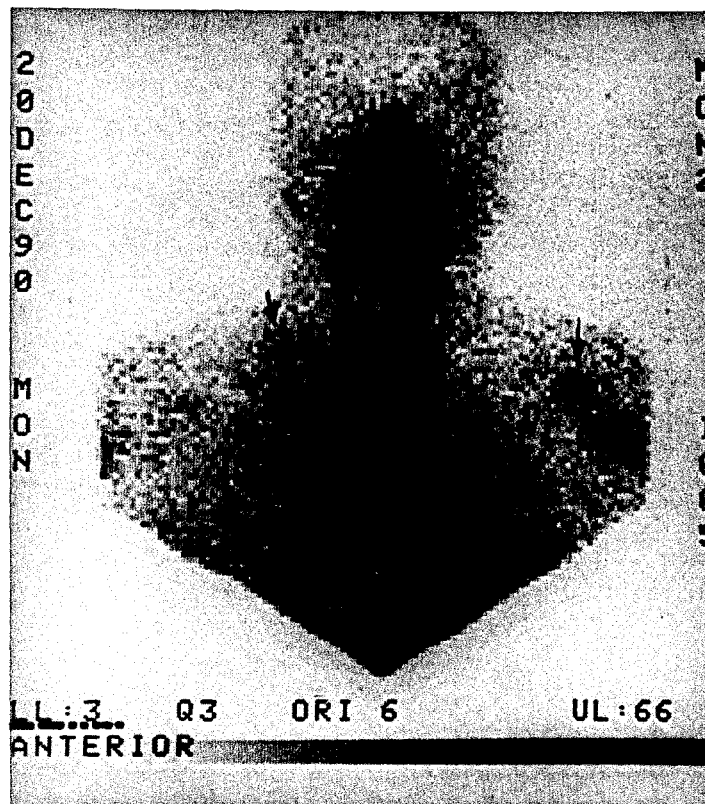


Fig. 17 - Nesta figura, observa-se uma maior concentração do IMc em área da fossa supraclavicular direita e ombro esquerdo, correspondendo a sítios de envolvimento metastático (setas).

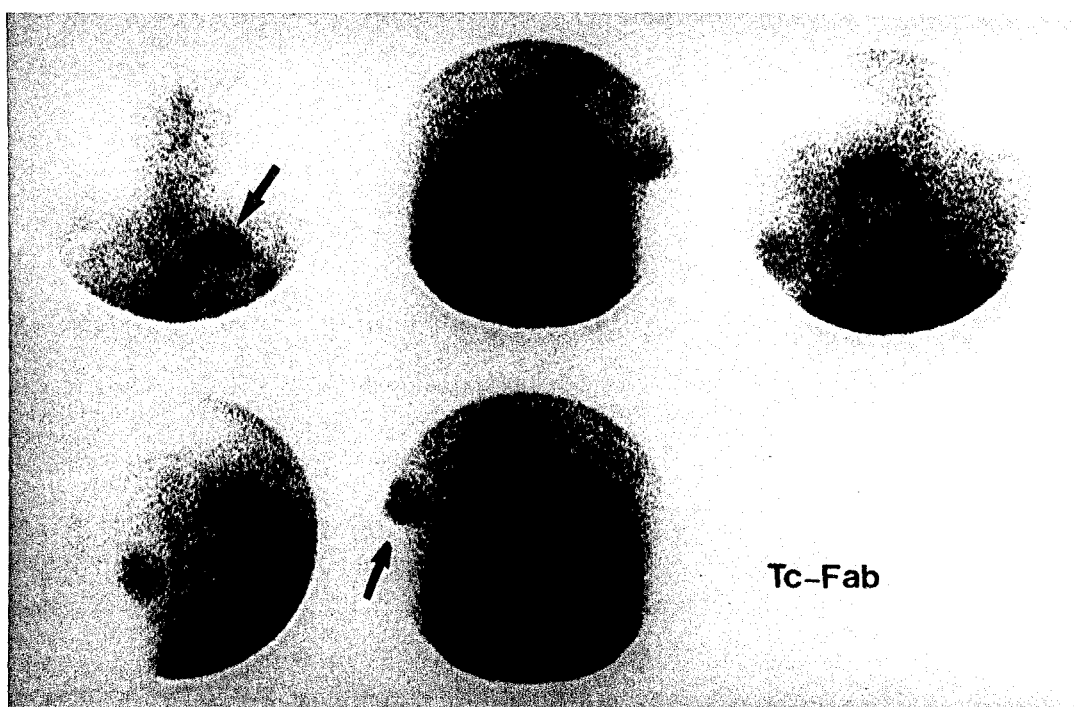
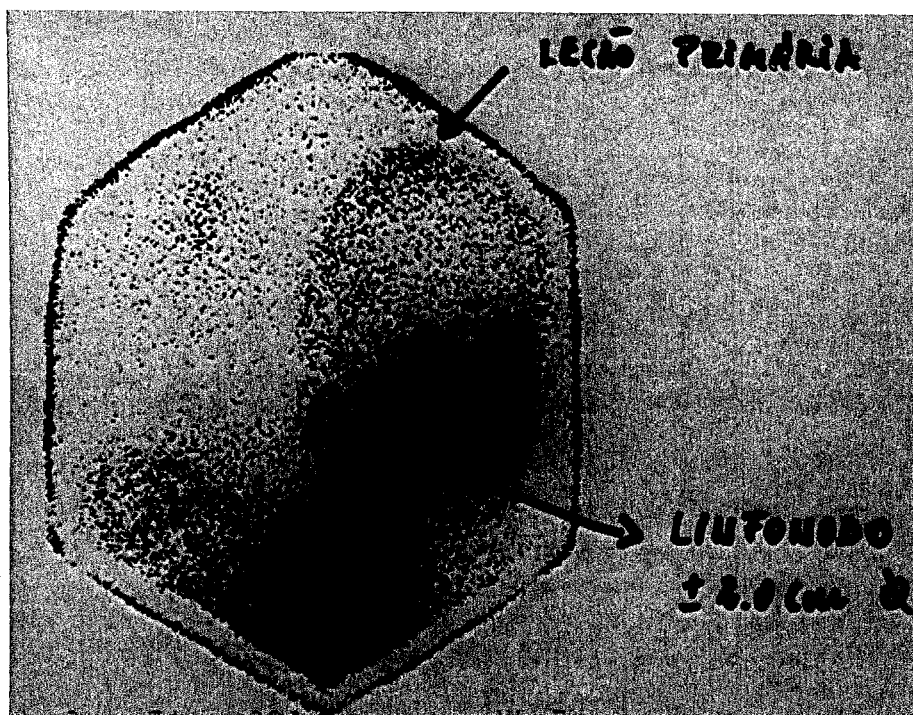


Fig. 18 - Hiper captação do IMc em região axilar esquerda e hemitórax superior esquerdo.



**Fig. 19** - Hipocaptação do ITC em nódulo palpável na região cervical. Biópsia confirmou o diagnóstico de MMH.

Com o objetivo de estudar o efeito do interferon alfa como modulador da expressão de antígenos de alto peso molecular na membrana celular de MMH, foram avaliados 12 pacientes adicionais (grupo modulação) (tabela 2). Nestes, foram realizados 24 procedimentos cintilográficos. Os estudos obedeceram ao fluxograma representado na figura 20. Em dois pacientes estudados nesta fase (pacientes 11 e 12), o ITC não foi administrado, tendo sido as imagens imunocintilográficas obtidas nos dias 1 e 7, com a administração de solução fisiológica diária nos dias 2 a 6. Nestes pacientes, não houve variação significativa na retenção do ITC no tecido tumoral versus tecido normal. Nos sete pacientes seguintes, as imagens foram obtidas 24 horas antes (dia 1) e após (dia 7) a administração subcutânea de

interferon alfa na dose diária de 3 milhões de UI/m<sup>2</sup> durante 5 dias (dias 2 a 6) (figuras 21 a 29). Nos pacientes 8, 9 e 10 foram utilizados 5 milhões de UI/m<sup>2</sup> durante 5 dias (figuras 30, 31 e 32).

**TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM MELANOMA MALIGNO METASTÁTICO SUBMETIDOS A EXAMES IMUNOCINTILOGRÁFICOS COM O ANTICORPO MONOCLONAL 22825S MARCADO COM <sup>99m</sup>Tc04<sup>-</sup> NA VIGÊNCIA DO USO DE INTERFERON ALFA**

PACIENTE	SEXO	IDADE (ANOS)	TIPO	IB (mm)	ESTADIAMENTO (AJCC)
1	F	43	ES	1,2	IV
2	F	34	NOD	2,2	IV
3	F	23	NOD	3,4	IV
4	M	39	NOD	0,4	IV
5	F	43	NOD	1,2	IV
6	F	30	ES	0,4	IV
7	M	62	NOD	NI	IV
8	M	44	NOD	2,0	IV
9	F	62	NOD	1,9	IV
10	F	78	NOD	1,9	IV
11	M	39	NI	NI	IV
12	M	58	NOD	NI	IV

IB = índice de Breslow

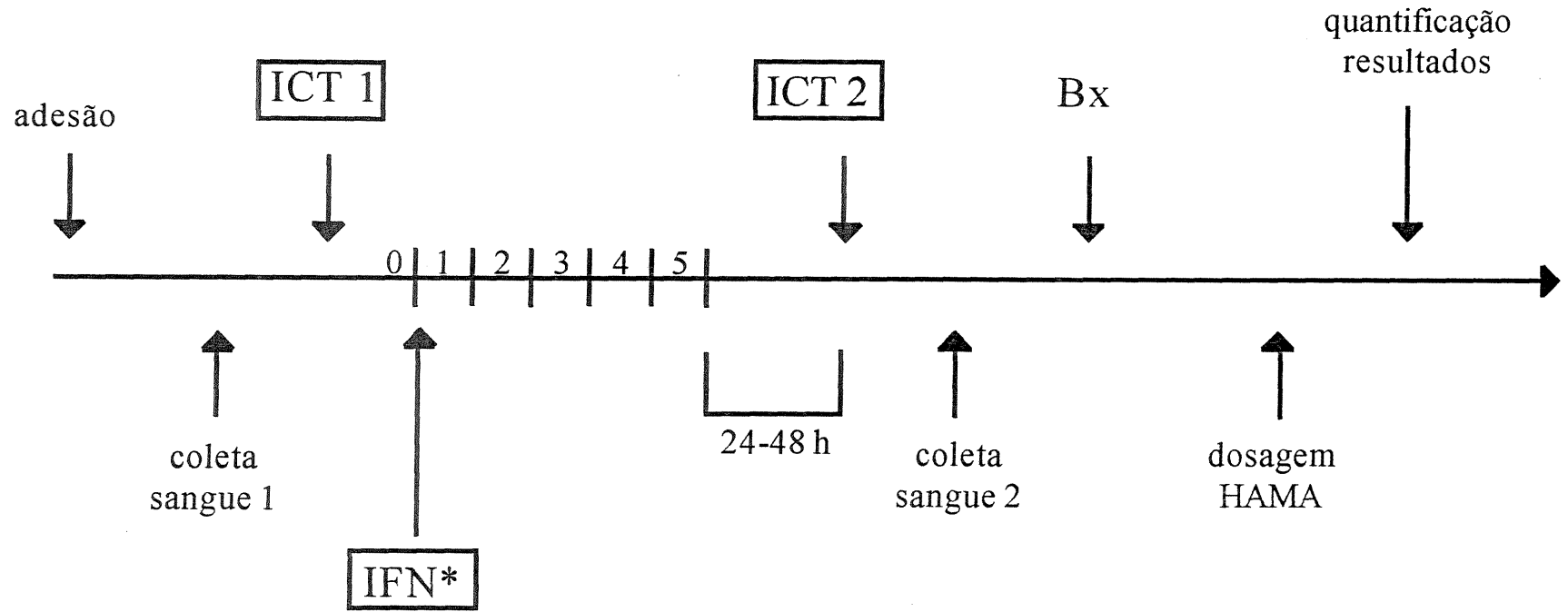
NOD = nodular

NI = não informado

ES = espalhamento superficial

AJCC = American Joint Committee for Cancer

# Fluxograma



\* SG 3 MUI/m2 IFN; SG 5 MUI/m2 IFN; SG controle; ICT = imunocintilografia; Bx = biópsia área afetada.

Fig. 20 - Fluxograma de estudo em relação à administração de interferon alfa no grupo modulação.



Na seqüência, estão resumidos os casos clínicos de pacientes incluídos no grupo modulação (controles 11 e 12; pacientes de 1 a 7 submetidos ao uso de interferon alfa 3 MUI e pacientes de 8 a 10 submetidos a uma dose de interferon alfa de 5 MUI).

Subgrupo controle: paciente 11 - NAGO, 39 anos, masculino, branco, portador de melanoma primário ressecado em MID, tipo histológico não identificado. Atualmente com adenomegalia inguinal direita (fusionada), com biópsia que confirmou a existência de melanoma maligno metastático (figura 21).

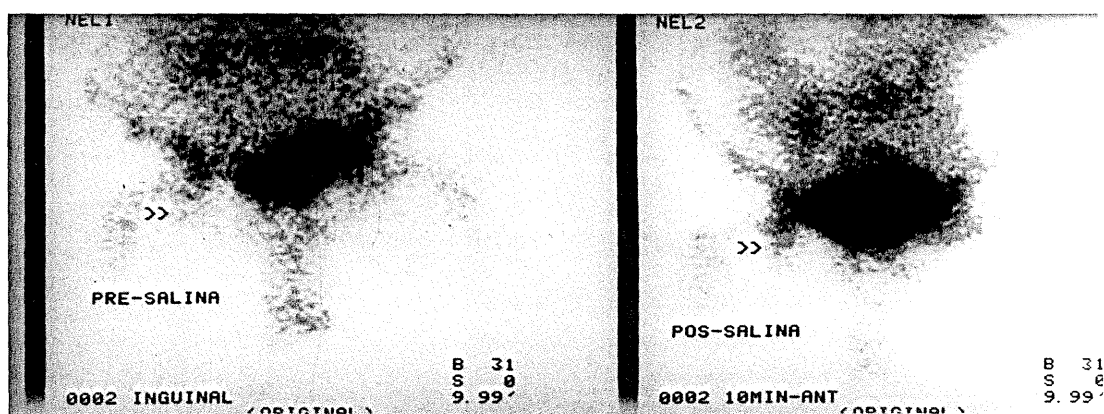


Fig. 21 - Nesta figura, observa-se uma baixa concentração do IMc no sítio tumoral. Ressalta-se a elevada eliminação urinária do IMc.

Subgrupo controle: paciente 12 - ABG, 58 anos, masculino, branco, portador de melanoma ressecado, em membro inferior esquerdo, tipo histológico não identificado. Atualmente com adenopatia inguinal esquerda (3,0 x 2,0 cm), confirmada por biópsia ser MMM (figura 22).

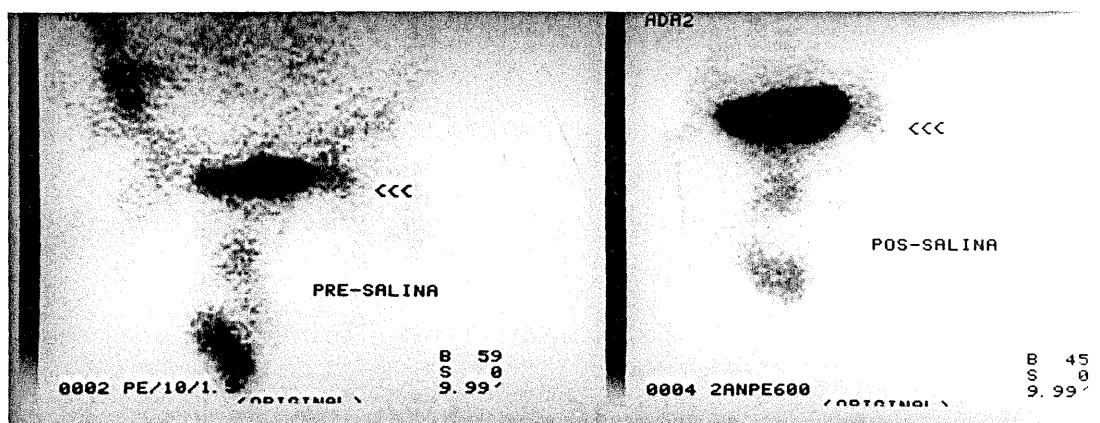


Fig. 22 - Como na figura acima, observa-se uma baixa concentração do IMc no sítio tumoral.

Subgrupo 3MUI: paciente 1 - MB, 43 anos, feminina, branca, portadora de melanoma nodular, Breslow 1,2 mm, Clark IV, ressecado na face medial da coxa esquerda. Atualmente com adenomegalia inguinal superficial esquerda (3,8 x 3,0 cm). Biópsia comprovou a hipótese de metástases de melanoma. Paciente em controle ambulatorial (figura 23).

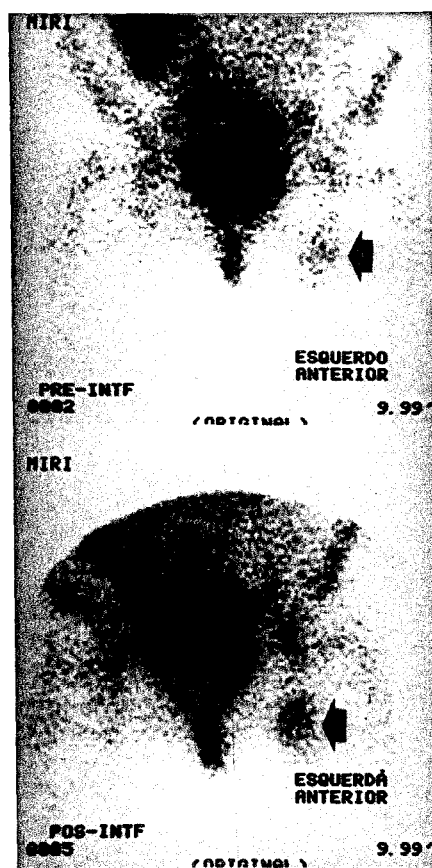
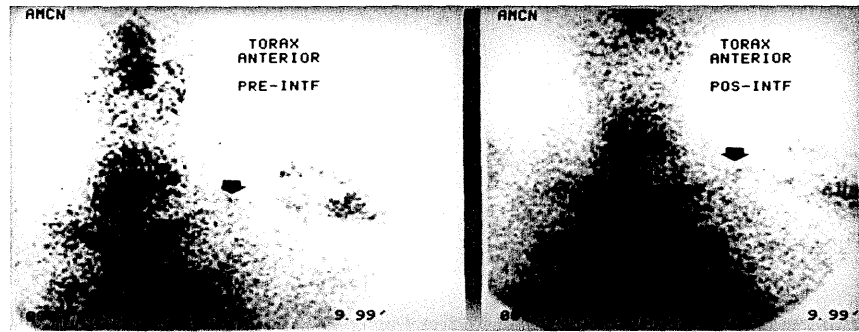


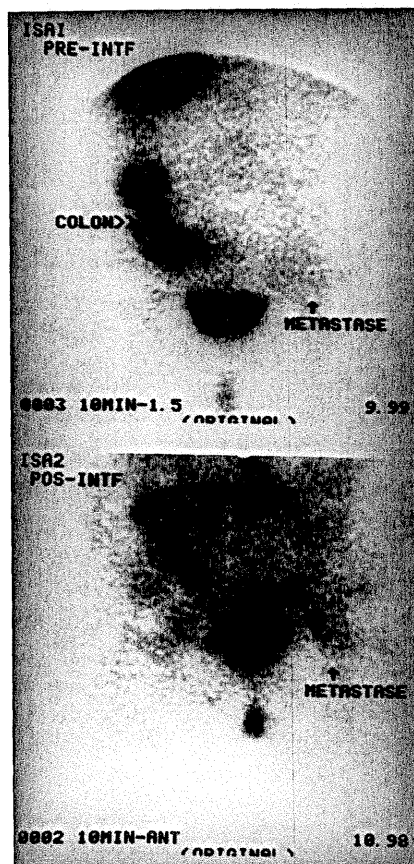
Fig. 23 - Nesta figura, pode-se observar um aumento da concentração do IMc em massa metastática localizada na cadeia de linfonodos inguinais superficiais à esquerda, após a administração de interferon alfa.

Subgrupo 3MUI: paciente 2 - AMCN, 34 anos, feminina, branca, portadora de metástases linfáticas múltiplas em região torácica e abdominal. Tipo histológico da lesão primária desconhecido. Fez imunoterapia com BCG. Atualmente com múltiplos linfonodos subcutâneos. Área de estudo em linfonodo medindo aproximadamente 1,5 x 1,0 cm, em localização infraclavicular esquerda. Biópsia comprovou a hipótese de metástase de melanoma. Visualização considerada precária, foi a óbito seis meses após a investigação (figura 24).



**Fig. 24** - Nesta figura, observa-se uma mínima concentração do IMc em linfonodo intraclavicular esquerdo, o qual não sofreu modificação significativa após administração de interferon alfa.

Subgrupo 3MUI: paciente 3 - IIS, 23 anos, feminina, branca, portadora de melanoma nodular Breslow 3 mm, Clark III, ressecado na coxa esquerda. Atualmente com adenomegalia recidivada em cadeia inguinal profunda ipsilateral (gânglios fusionados 6,0 x 9,0 cm). Cirurgia comprovou a existência de MM. Evoluiu rapidamente para o óbito (figura 25).



**Fig. 25** - Nesta figura, observa-se um discreto aumento de concentração do IMc em grande massa inguinal esquerda, após a administração de interferon alfa.

Subgrupo 3MUI: paciente 4 - INHL, 39 anos, masculino, branco, portador de melanoma nodular Breslow 4 mm, Clark V na projeção da linha médio-torácica posterior do tórax. Atualmente com adenomegalia axilar esquerda (2,0 x 1,5 cm). Biópsia comprovou ser MMM. Paciente encontra-se em controle ambulatorial (figura 26).

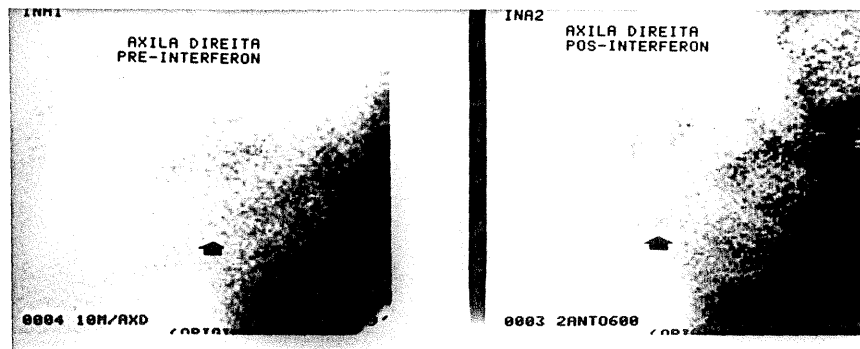


Fig. 26 - A figura acima, ilustra o caso de um paciente com linfonodo metastático em axila esquerda, cuja concentração do IMc não sofreu modificações significativas com administração de interferon alfa.

Subgrupo 3MUI: paciente 5 - GGS, 43 anos, feminina, branca, portadora de melanoma na região do calcâneo, com características de espalhamento superficial, Breslow 1,2 mm e Clark III. Tumor primário ressecado e atualmente com suspeita de recidiva local. Biópsia confirmou a presença de MM. Paciente em acompanhamento ambulatorial (figura 27).

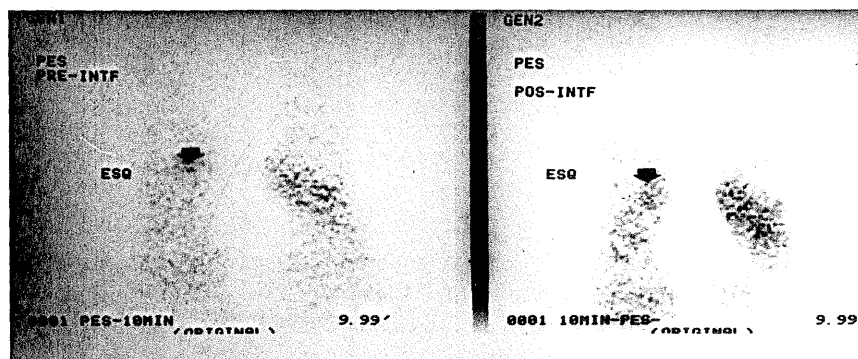


Fig. 27 - Nesta figura, observa-se reduzida concentração do IMc no calcâneo antes e após o uso de interferon alfa.

Subgrupo 3MUI: paciente 6 - MAAQ, 30 anos, feminina, branca, portadora de melanoma primário tipo espalhamento superficial, Breslow 0,42 mm e Clark IV medindo 3,0 x 2,5 cm na região torácica posterior. Biópsia confirmou a presença de MMM (figura 28).

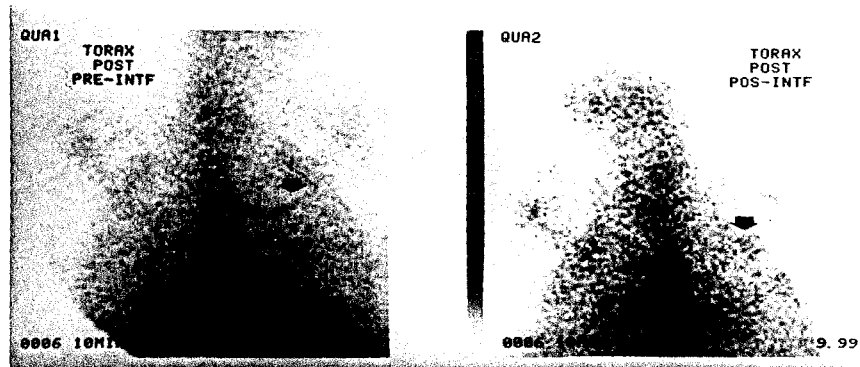


Fig. 28 - Nesta figura, observa-se baixa concentração do IMc em lesão primária na região torácica posterior direita, a qual também não sofreu modificação.

Subgrupo 3MUI: paciente 7 - SMZ, 62 anos, masculino, branco, portador de melanoma primário (tipo histológico não identificado) na perna direita, com metástase em víscera oca (confirmada por biópsia de duodeno) assim como em adenomegalia de aspecto fusionado 3,0 x 2,5 cm na porção posterior da coxa direita cuja biópsia evidenciou MMM. Paciente evoluiu para o óbito (figura 29).

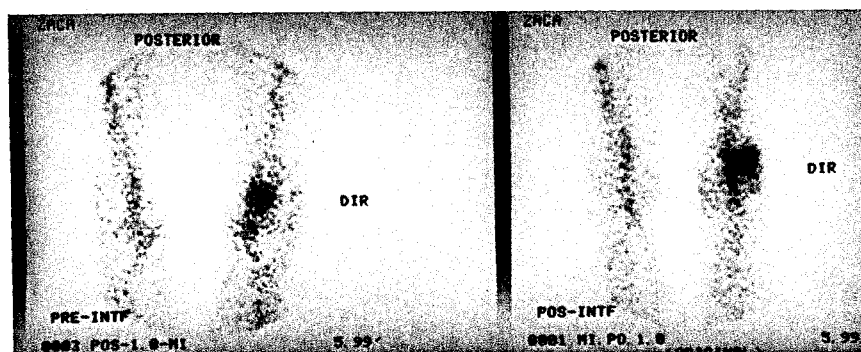
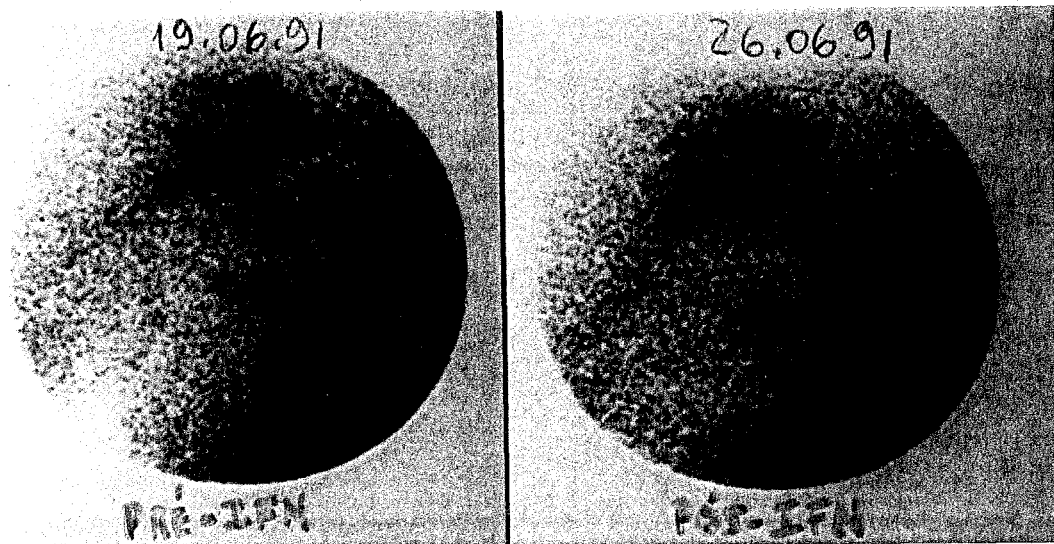


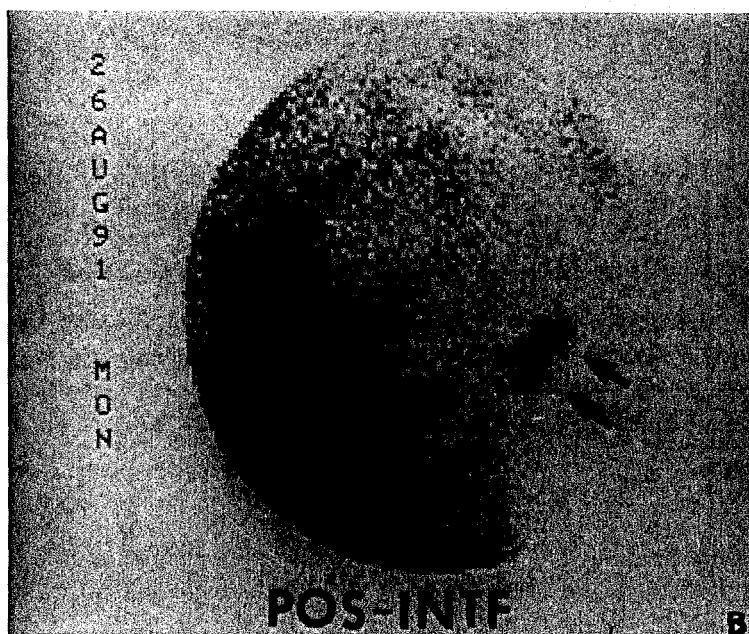
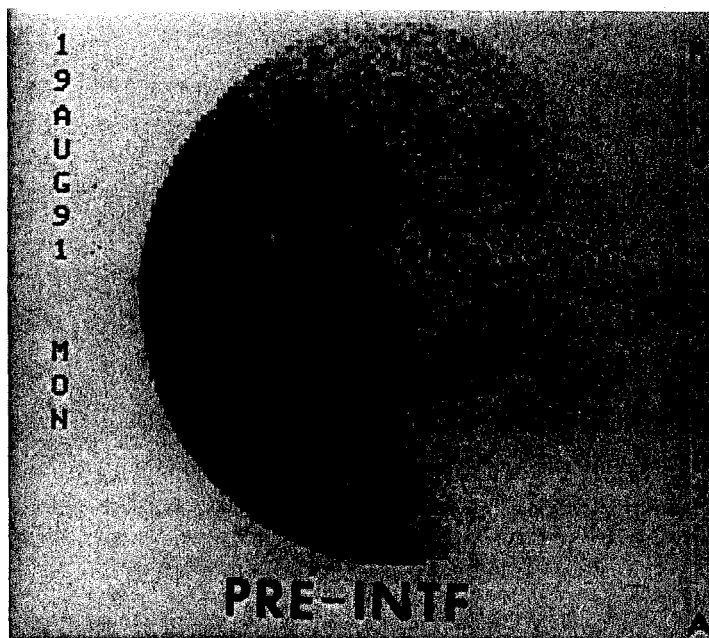
Fig. 29 - Nesta figura, observa-se expressiva concentração do IMc (pré-interferon) em região posterior da coxa direita em linfonodo metastático. Houve redução da concentração pós-interferon.

Subgrupo 5MUI: paciente 8 - CBC, 62 anos, feminina, branca, portadora de melanoma nodular Breslow 7 mm e Clark IV ressecado em braço direito. Apresentou linfadenomegalia axilar direita 2,5 x 2,0 cm com biópsia positiva para o diagnóstico de MMM (figura 30).



**Fig. 30** - Nesta figura, observa-se linfonodo captante em região axilar direita.

Subgrupo 5MUI: paciente 9 - AM, 44 anos, masculino, branco, portador de melanoma nodular ressecado, Breslow 16 mm e Clark V em região epigástrica. Área de observação em adenomegalia axilar esquerda (2,0 x 2,5 cm). Biópsia confirmou hipótese diagnóstica de MMM. Atualmente encontra-se em controle ambulatorial (figura 31 a, b).



**Fig. 31 (A e B)** - Nesta figura, observa-se linfonodo em região axilar esquerda. Nota-se um aumento marcante na concentração do IMc em área metastática inicialmente não-captante.

Subgrupo 5MUI: paciente 10 - PB, 78 anos, masculino, branco, portador de melanoma primário de tipo histológico desconhecido em região toracoabdominal anterior. Atualmente apresenta adenopatia axilar esquerda (2,0 x 2,0 cm) que confirmou, por biópsia, a presença de MMM (figura 32).

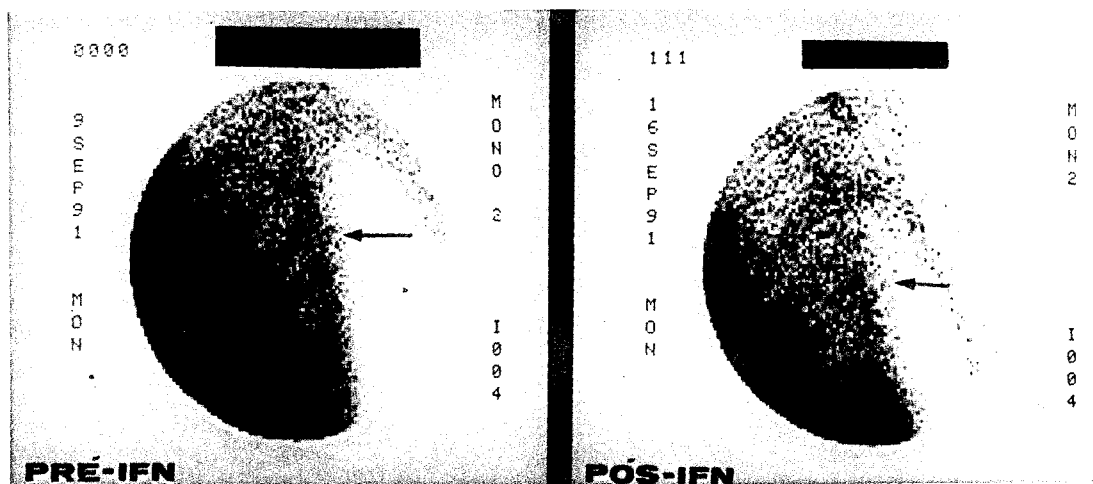


Fig. 32 - Nesta figura, observa-se redução da concentração do IMc pós-interferon em linfonodo localizado em axila esquerda.

Na tabela 3, estão apresentados os resultados correspondentes aos Qc antes e após o uso de interferon alfa no grupo de pacientes acima descrito. Pode-se observar um aumento relativo nos Qc após o uso de interferon alfa na maioria dos pacientes, com a ocorrência de "conversão" de uma área metastática pouco captante em altamente captante após a administração de interferon alfa (figura 31). Na tabela 4, estão resumidos os efeitos adversos observados após o uso de interferon-alfa 3 milhões de UI/m<sup>2</sup> por via subcutânea nos dias 2-6. Os resultados estão codificados segundo os critérios e graduação de severidade estabelecidos pela OMS (Anexo 4). Como pode ser observado, predominaram os sintomas gerais, como fadiga, anorexia, mialgia, artralgia, coriza, calafrios e febre, mas



sempre com intensidade moderada. Náusea e vômitos, diarreia e *rash* cutâneo ocorreram em casos isolados.

Uma vez que nas doses de interferon alfa estudadas não foram verificados efeitos colaterais significativos, foi efetuado escalonamento de dose, isto é, 5 milhões de UI/m<sup>2</sup> diárias nos dias 2-6 em três pacientes adicionais (n<sup>os</sup> 8, 9 e 10 da tabela 2). Abaixo, estão representados os Qc desses pacientes antes e após a administração de interferon alfa (n<sup>os</sup> 8, 9 e 10 da tabela 3). Neste grupo tratado com intensificação de dose de interferon alfa, pode-se observar um maior número de eventos tóxicos de moderada intensidade, mas com padrão semelhante aos casos anteriormente descritos. Astenia, mialgia, artralgia, coriza, calafrios e febre com intensidade moderada foram observados em vários pacientes (tabela 5).

A tabela 6 apresenta os dados relativos às dosagens de anticorpos humanos anti-imunoglobulinas de origem murina (AHAM) neste grupo de pacientes. Nota-se positividade em um dos pacientes submetidos ao uso repetido do imunoconjugado em estudo.

**TABELA 3 - QUOCIENTES DE CAPTAÇÃO (Qc) IMUNOCINTILOGRÁFICA ANTES E APÓS O USO DE INTERFERON ALFA (IFN) EM LESÕES METASTÁTICAS DE PACIENTES PORTADORES DE MELANOMA MALIGNO**

PACIENTES	Qc PRÉ-IFN	Qc PÓS-IFN
1	2,85	3,52
2	2,03	2,61
3	2,24	2,64
4	1,50	1,73
5	2,24	2,85
6	1,61	2,31
7	3,78	3,42
8	1,01	1,71
9	2,67	4,30
10	3,23	1,59

**TABELA 4 - EFEITOS ADVERSOS PELO USO DE INTERFERON ALFA EM PACIENTES PORTADORES DE MELANOMA MALIGNO METASTÁTICO SUBMETIDOS A IMUNOCINTILOGRAFIA COM O ANTICORPO MONOCLONAL 22825S (3 MILHÕES UI/m<sup>2</sup>)**

<b>EFEITOS ADVERSOS</b>	<b>G<sub>0</sub></b>	<b>G<sub>1</sub></b>	<b>G<sub>2</sub></b>	<b>G<sub>3</sub></b>
Astenia / Fadiga	1	6	-	-
Anorexia	1	6	-	-
Mialgia / Artralgia	1	6	-	-
Cefaléia	1	6	-	-
Coriza / Calafrios	-	7	-	-
Febre	2	5	-	-
Náusea / Vômito	5	2	-	-
Diarréia	5	2	-	-
Rash cutâneo	5	2	-	-

\* n = 7

g = grau de severidade

**TABELA 5 - EFEITOS ADVERSOS PELO USO DE INTERFERON ALFA EM PACIENTES PORTADORES DE MELANOMA MALIGNO METASTÁTICO SUBMETIDOS A IMUNOCINTILOGRAFIA COM O ANTICORPO MONOCLONAL 22825S (5 MILHÕES UI/m<sup>2</sup>)**

<b>EFEITOS ADVERSOS</b>	<b>G<sub>0</sub></b>	<b>G<sub>1</sub></b>	<b>G<sub>2</sub></b>	<b>G<sub>3</sub></b>
Astenia / Fadiga	-	2	1	-
Anorexia	-	3	-	-
Mialgia / Artralgia	-	-	3	-
Cefaléia	-	2	1	-
Coriza / Calafrios	-	2	1	-
Febre	-	2	1	-
Náusea / Vômito	1	2	-	-
Diarréia	1	2	-	-
Rash cutâneo	3	-	-	-

\* n = 3

g = grau de severidade

**TABELA 6 - DOSAGENS DE ANTICORPOS HUMANOS ANTIMURINOS (AHAM) EM PACIENTES SUBMETIDOS A DUAS ADMINISTRAÇÕES ENDOVENOSAS DO ANTICORPO MONOCLONAL 22825S COM INTERVALO SEMANAL (ELISA)**

<b>PACIENTE</b>	<b>GRUPO I</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>
MB	0,069		
AMCN	0,550*		
IIS	0,076		
INHL	0,057		
GGG	0,089		
MAAQ	0,146		
SMZ	0,044		
CCB		0,053	
AM		0,091	
PB		0,114	
ABG			0,075
NAGO			0,088

\* Caso positivo

Obs.: por esta técnica são consideradas positivas as concentrações acima de 0,2 unidade de absorção.

---

---

## 5 - DISCUSSÃO

---

---

---

## 5 - DISCUSSÃO

O tratamento quimioterápico do câncer possui, via de regra, um baixo índice terapêutico. Ao contrário de outras especialidades médicas, tolera-se a ocorrência de efeitos colaterais significativos nos pacientes oncológicos mesmo nas doses consideradas convencionais (103, 193, 194, 205). Visando aumentar a eficiência do tratamento quimioterápico, várias estratégias experimentais têm sido desenvolvidas. A técnica mais difundida consiste na intensificação de doses dos agentes citotóxicos, associada ao uso de fatores de estimulação da medula óssea, transplante alogênico e/ou autólogo e reinfusão de células-tronco periféricas. Por esta estratégia, aumenta-se a exposição tecidual ao agente, mas de forma inespecífica, ou seja, expondo ao mesmo tempo o tecido tumoral e o sadio, o que acarreta um significativo incremento na morbidade e mortalidade (44, 227).

Dentre as abordagens experimentais que visam elevar o índice terapêutico das drogas anticâncer, incluem-se aquelas que buscam favorecer o acúmulo de agentes terapêuticos seletivamente no tecido tumoral, minimizando seus efeitos indesejáveis nos tecidos sadios. Neste sentido, o uso de anticorpos monoclonais constitui uma estratégia terapêutica potencialmente mais seletiva, uma vez que os mesmos atuam através da ligação a antígenos específicos espessos na membrana celular (7, 15, 25, 27, 36, 37, 60, 104, 106, 107, 140, 145, 146, 176, 177, 195).

Os mecanismos pelos quais os anticorpos monoclonais podem causar efeitos antineoplásicos envolvem o desenvolvimento do fenômeno de imunização, ativação de componentes do sistema imunológico e/ou a interferência no crescimento tumoral através da ligação em receptores de membrana para fatores de proliferação tumoral, como também a liberação seletiva de agentes tóxicos no sítio do tumor, como, por exemplo, radioisótopos, drogas citotóxicas ou toxinas (57).

Células-alvo circulantes ligadas a anticorpos monoclonais são removidas pelo sistema retículo-endotelial do fígado, pulmões e baço, devido à existência de receptores Fc nos macrófagos teciduais existentes nesses sítios (21, 53). Em relação aos anticorpos

humanos, a ligação a macrófagos do sistema retículo-endotelial se restringe às subclasses de anticorpos IgG1 e IgG3, não ocorrendo de forma significativa com anticorpos de tipo IgM e outras subclasses de IgG. Por sua vez, os anticorpos monoclonais de origem humana diferem dos murinos quanto aos subtipos preferenciais para ligação. Anticorpos murinos de subclasse IgG2a parecem superiores aos demais quanto à ocorrência de citotoxicidade dependente de anticorpo (CCDA), devido a uma maior afinidade na ligação em receptores Fc (166).

Obviamente, a natureza e o número de antígenos tumorais influenciam na qualidade e intensidade da CCDA (178). Deve-se destacar que o anticorpo 22528S, objeto desta dissertação, pertence às imunoglobulinas IgG2a. Outra técnica recente envolve o uso de anticorpos ligados à galactose, os quais são rapidamente removidos pelo fígado. Isto permite o uso destes conjugados em altas concentrações por via intraperitoneal, com baixa exposição sistêmica a altas concentrações do anticorpo, seguido da rápida eliminação após a suspensão do agente inibidor hepático (213).

Os anticorpos monoclonais podem exercer diretamente o seu efeito antitumoral, ativando o complemento e as células efectoras do sistema imunológico, atuando como vacinas antiidiotípicas, ou provocando efeitos inibidores na regulação da proliferação tumoral (206, 217, 222, 223, 229).

A citotoxicidade mediada por complemento (CMC) requer a fixação do mesmo pela porção Fc da imunoglobulina, com a subsequente ativação da cascata do complemento e ruptura da membrana celular (166, 181, 199, 200, 201). *In vitro*, a maioria dos anticorpos monoclonais de origem murina é relativamente ineficiente na fixação de complemento humano. Alguns estudos sugerem que os anticorpos monoclonais murinos de classe IgM podem fixar complemento com maior facilidade em relação aos demais tipos de anticorpos (por exemplo, IgG1, IgG2 e IgG3). Entretanto, o maior peso molecular e menor mobilidade entre compartimentos limitam sobremaneira o seu acesso ao sítios de ação terapêutica (171, 178). Além disto, quando administrados em altas concentrações, esses anticorpos podem induzir fenômenos de hiperviscosidade (47, 50, 171, 199).

Outro mecanismo de ação dos AcMc envolve a CCDA. Da mesma forma que na CMC, o sítio de ligação de células efectoras é o receptor Fc, necessitando, portanto, da

presença de uma imunoglobulina intacta (47, 50). Vários tipos de linfócitos, monócitos, macrófagos teciduais, granulócitos e eosinófilos expressam receptores Fc e podem efetuar citólise por esse mecanismo. A CCDA pode ocorrer através da ligação do anticorpo ao seu alvo celular e posterior ligação de células efetoras ao anticorpo, como também através da fixação inicial da célula efetora à porção Fc do anticorpo, com a ligação na célula alvo após a sua circulação na corrente sanguínea. Por ambas as vias, pode ser observada citotoxicidade *in vitro* e em animais (47, 50).

Anticorpos monoclonais biespecíficos ligam células tumorais que expressam antígenos específicos a células efetoras citotóxicas, provocando a sua destruição por um efeito tóxico direto. Após a sua ativação, esses complexos promovem a liberação do fator de necrose tumoral (FNT), interleucina-2 e interferon-gama por linfócitos efetores, o que indiretamente inibe o crescimento tumoral (202, 209).

No sentido de aumentar a eficiência da ligação entre células efetoras e antígeno, várias estratégias têm sido estudadas, como, por exemplo, a leucoforese para coleta de células hematopoiéticas circulantes, seguida de incubação das mesmas com anticorpos (44). O interferon gama pode elevar os níveis de receptores Fc em células efetoras, aumentando a CCDA (10, 51, 71). Por sua vez, o FNT e a interleucina-II podem também ser úteis, modulando a resposta imunológica e/ou interferindo com os mecanismos de regulação da microcirculação (217). Além disto, certos anticorpos monoclonais podem ser dirigidos contra receptores CD2 e CD3 em linfócitos T, aumentando o seu potencial citotóxico (44, 186, 187).

Tanto em relação à CCDA como à CMC, os efeitos antitumorais *in vivo* dependem da habilidade do sistema imunológico em prover suficientes níveis de complemento e células efetoras para a produção de citotoxicidade. Várias linfocinas e modificadores da resposta biológica, como o fator de necrose tumoral, a interleucina-2, os interferons e o GM-CSF podem ser úteis no provimento dos elementos necessários para a reação imunológica contra a neoplasia (7, 44, 184).

À semelhança do efeito radiosensibilizante de certos agentes químicos em células expostas à radiação ionizante externa, estudos em camundongos imunossuprimidos utilizando um anticorpo monoclonal antiantígeno carcinoembriônico (CEA) conjugado a  $^{131}\text{I}$

na presença de mizonidazole têm revelado regressões tumorais superiores às observadas após o imunoconjugado isoladamente (74, 76, 77, 78, 79) .

Uma estratégia de interesse na terapêutica anticâncer envolve a utilização de anticorpos monoclonais gerados contra a glicoproteína P, responsável por uma forma característica de resistência a múltiplas drogas antineoplásicas (152).

Ensaio clínico com anticorpos monoclonais isoladamente têm revelado resultados limitados (44, 91). Portanto, devem ser exploradas formas de utilização de anticorpos conjugados a substâncias citotóxicas, como as imunotoxinas, quimioterápicos e radioisótopos. Estes últimos apresentam uma vantagem potencial, uma vez que não necessitam internalização pela célula tumoral, sendo também tóxicos em células tumorais vizinhas que não expressam os antígenos em questão. Tal fato parece muito relevante, uma vez que as neoplasias são altamente heterogêneas em sua expressão antigênica (67, 98).

Estudos preliminares utilizando a administração sistêmica de anticorpos monoclonais conjugados a radioisótopos têm produzido efeitos antitumorais em linfomas, leucemias, mieloma múltiplo, hepatomas, neuroblastoma, sarcomas e melanoma maligno (5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 25, 26, 33, 49, 54, 64, 66, 80, 89, 94, 148, 149, 176). Além disso, anticorpos monoclonais gerados a partir de receptores de membrana para fatores de crescimento, como o ECF (fator de crescimento epidérmico), estão sendo introduzidos em testagem clínica em pacientes com vários tipos de carcinomas (179, 203).

O uso intracavitário de imunoconjugados tem apresentado resultados iniciais animadores (7, 229). Em pacientes com doença residual mínima após tratamento quimioterápico de câncer de ovário, a administração intraperitoneal de anticorpos monoclonais tem sido associada a respostas objetivas. Da mesma forma, o seu uso intravesical tem sido avaliado em carcinoma superficial de bexiga recidivante (44).

Com relação ao uso clínico de anticorpos monoclonais, existem múltiplas utilizações potenciais tanto no diagnóstico como na terapêutica do câncer. No sentido de localizar neoplasias, têm-se utilizado anticorpos monoclonais com técnicas de tomografia computadorizada (SPECT), associadas a radionuclídeos de meia-vida curta e/ou fragmentos de anticorpos monoclonais (56).



A maioria dos anticorpos monoclonais desenvolvidos contra antígenos oriundos de tumores sólidos foi gerada a partir de antígenos expressos em células de melanoma maligno. Halpern e colaboradores (90) e Dilman e colaboradores (47, 50) testaram um anticorpo murino antimelanoma humano em pacientes portadores dessa neoplasia, nas doses entre 1-50 mg e em infusão endovenosa de 2 horas. Na maioria dos casos, uma dose-teste de 1 mg de anticorpo marcado com  $^{111}\text{In}$  foi também administrada. Vinte e quatro pacientes receberam anticorpos monoclonais da classe IgG1 dirigidos contra o antígeno P97 (44), enquanto outros 28 receberam o anticorpo IgG2a dirigido contra o antígeno p240. Tanto nesses estudos como em outros similares (119, 158, 159), não foram observadas respostas tumorais objetivas.

Ainda que sem obter respostas tumorais objetivas, Oldham e colaboradores (165) puderam observar uma maior retenção do imunoconjugado no leito tumoral versus tecidos saudáveis em 6 de 8 pacientes após a administração do anticorpo antimelanoma da classe IgG2a denominado 9.2.27, o qual reage com o antígeno p240.

Goodman e colaboradores (80, 81) estudaram a combinação de um anticorpo monoclonal murino IgG1 anti-p97 com um anticorpo IgG1 anti-p240 em 4 pacientes portadores de MMM. Novamente, nenhum efeito antitumoral pôde ser observado. Pode-se atribuir a ausência de efeitos antitumorais com anticorpos anti-p97 e anti-p240 em pacientes com melanoma maligno pelo fato de que esses anticorpos talvez não sejam capazes de produzir uma CCDA ou CMC. Em contraste, anticorpos murinos IgG3 gerados contra os antígenos GD3 e GD2 são capazes de promover CCDA e CMC *in vitro* com complemento e células efectoras humanas, o que pode ser confirmado em estudos animais (80, 81, 104, 155).

A seqüência de estudos apresentados nesta dissertação ilustra de forma objetiva as diferentes etapas do processo de utilização clínica de anticorpos monoclonais conjugados a radioisótopos. A escolha do AcMc 22528S, o qual reconhece antígenos de alto peso molecular expressos na membrana celular de melanoma maligno, se baseou em estudos prévios que revelaram uma satisfatória capacidade de ligação do mesmo a preparações de tecido tumoral humano (56, 203, 204). Isto pode ser observado na tabela constante do Anexo 1, a qual indica a ligação de vários anticorpos monoclonais murinos a tumores de origem humana.

As características da população de pacientes incluídos neste estudo refletem o espectro clínico de manifestações do melanoma maligno em nosso meio. Os critérios de inclusão se restringiram à idade de 18-75 anos, performance clínica de 0-2 (OMS), confirmação histopatológica da doença e à obtenção de termo de consentimento pós-informação. Nas etapas iniciais, foram incluídos pacientes em qualquer estadiamento (grupos piloto e segurança), ao passo que apenas indivíduos portadores de lesões em áreas de baixa captação de fundo foram aceitos nas fases subseqüentes (grupos confirmação e modulação), visando melhor quantificar a variação da captação do IMc nos sítios tumorais.

Nesta dissertação, procurou-se desenvolver a técnica de marcação de anticorpos monoclonais com radioisótopos com vistas ao seu uso clínico para o diagnóstico e terapêutica no futuro. Deve-se ressaltar que a experiência com a técnica de imunoc conjugação com anticorpos monoclonais para uso humano não era disponível até então em nosso meio. Portanto, buscou-se inicialmente uma familiaridade com método de preparação e controle de qualidade do imunoc conjugado. Os resultados desse processo estão indicados na tabela 1, a qual evidencia um progressivo aumento na qualidade da conjugação obtida, expressa pela relação entre o elemento marcado e o livre, traduzindo o ganho de experiência com a técnica. Esta observação vem ao encontro dos interesses centrais do tema, uma vez que o material obtido para as testagens nos grupos confirmação e modulação, objeto maior do presente trabalho, foram considerados de melhor rendimento, ainda que abaixo das referências de literatura (56, 108, 197, 210).

A administração do anticorpo não produziu quaisquer efeitos colaterais nos pacientes estudados no grupo piloto após um seguimento de 4 semanas. Isto responde claramente ao primeiro objetivo desta pesquisa, qual seja, aferir os riscos potenciais pela administração única ou por duas vezes do AcMc, em uma população de pacientes portadores de MM. Deve-se ressaltar, entretanto, que a administração repetida do imunoc conjugado pode levar a fenômenos de hipersensibilidade. Segundo dados da literatura, reações alérgicas têm sido observadas com o uso repetido de AcMc em pacientes portadores de neoplasias. Em um estudo publicado por Vadhan -Raj e colaboradores (215), 21 pacientes receberam o anticorpo monoclonal anti-GD3 R24 por via endovenosa em doses entre 1 e 50 mg/m<sup>2</sup> em dias alternados por duas semanas, até uma dose cumulativa de 400 mg/m<sup>2</sup>. Uma captação do anticorpo no tecido tumoral pode ser demonstrada nas doses

acima de  $30\text{mg}/\text{m}^2$  através de biópsias e estudos imuno-histoquímicos. Prurido e urticária foram observados na região em torno das lesões cutâneas nas doses mais elevadas. Mais importante, respostas objetivas foram verificadas em 4 dos 21 pacientes. Cheung e colaboradores (37) avaliaram o anticorpo monoclonal IgG3 anti-GD2 denominado 3F8 nas doses entre  $5\text{-}100\text{ mg}/\text{m}^2$  após infusão endovenosa de 8 horas. Os principais efeitos indesejáveis foram hipertensão arterial nas doses elevadas, dor e inflamação no local do tumor, abdômen, dorso e extremidades. Urticária, febre, náusea, vômitos e sudorese foram igualmente registrados. Novamente, respostas tumorais parciais foram observadas em 2 de 9 pacientes.

O desenvolvimento de anticorpos humanos antimurinos após a administração repetida do AcMc tem sido um dos maiores obstáculos ao seu uso clínico (40, 46, 118, 120, 175, 192, 224). Esse processo ocorre em cerca de 50% dos casos após uma única administração do anticorpo monoclonal, aumentando significativamente com o seu uso repetido. No material ora apresentado, pode-se observar um caso (paciente AMCN: tabela 6) de positividade para a presença de anticorpos humanos antimurino, o qual ilustra esse fenômeno. Nessa paciente, foi identificada uma baixa captação do imunoconjugado, provavelmente devido à inativação do anticorpo 22528S no organismo após o seu uso repetido. Neste sentido, a administração de agentes imunossupressores, como a ciclofosfamida e a ciclosporina, tem sido testada, visando reduzir a sensibilização dos pacientes ao anticorpo de origem murina (7). Outra estratégia com vistas a minimizar esse problema envolve o uso de fragmentos de anticorpos, anticorpos de origem humana ou de tipo quimérico (121, 135, 208).

O segundo objetivo desta dissertação, qual seja, documentar a capacidade do IMc de se localizar preferencialmente no tecido tumoral, inclui a observação seqüencial de pacientes com lesões metastáticas em região inguinal e axilar, zonas de baixa captação de fundo (grupo confirmação), as quais podem melhor comparadas com o sítio normal contralateral. Nos 10 pacientes avaliados nesta etapa, uma retenção preferencial do IMc na região do tumor pode ser documentada, traduzindo uma maior ligação do anticorpo marcado com os antígenos presentes na membrana celular. As observações acima per se oferecem ao investigador em Medicina Nuclear a oportunidade de explorar essas diferenças de retenção, vislumbrando no fenômeno uma nova estratégia de imagem potencialmente

válida para o imunodiagnóstico e terapêutica antineoplásica. Entretanto, a análise crítica das imagens obtidas em toda a amostra revela uma marcante discrepância nas captações entre pacientes com o mesmo diagnóstico histopatológico, sugerindo concentrações distintas entre sítios tumorais diversos em um mesmo paciente, bem como em áreas diferentes de um mesmo sítio tumoral. Isto traz à superfície um dos problemas centrais da biologia tumoral, qual seja, a questão da heterogeneidade entre as células que compõem o tumor.

Por sua inerente instabilidade genética e alta taxa de mutações espontâneas, as neoplasias apresentam uma expressão antigênica muito variável em suas células, tornando, por sua vez, também heterogênea a retenção do imunoconjugado no tecido neoplásico. A compreensão do fenômeno acima mencionado parece fundamental na interpretação do método imunocintilográfico e suas limitações, já que, por exemplo, a utilização pura e simples de um anticorpo para fins diagnósticos pode levar, muitas vezes, a resultados falso-negativos, pois a neoplasia poderá, entre outros motivos, não expressar o antígeno marcado.

Outra importante limitação ao uso de anticorpos monoclonais conjugados a radioisótopos na detecção e, mais especificamente, no tratamento de neoplasias tem sido a instabilidade do IMc, com a resultante exposição dos tecidos saudáveis ao radioisótopo livre. Com o advento de agentes quelantes macrocíclicos, estudos experimentais em animais têm revelado baixos níveis do radioisótopo livre no esqueleto, ou seja, um menor risco potencial de mielotoxicidade em relação aos quelantes clássicos, como o ácido pentacético (229).

A investigação de novas estratégias que possam promover uma maior retenção do agente terapêutico no seu sítio de ação, é de extrema importância (7). Uma alternativa no sentido de favorecer uma maior ligação do anticorpo ao seu antígeno consiste em aumentar a expressão deste último na superfície celular. Esse fenômeno tem sido demonstrado após a incubação de células tumorais com interferon alfa e gama (11, 25, 33, 51, 71, 84, 85, 132, 183). Os achados foram também confirmados *in vivo* através de tumores implantados em camundongos imunossuprimidos. Murray e colaboradores (158, 159) demonstraram um aumento da retenção de um anticorpo monoclonal antimelanoma em camundongos tratados com interferon alfa. Esse efeito decorreu do aumento da expressão de antígenos de superfície reconhecidos pelo anticorpo. Entretanto, é escassa descrição em literatura, até o presente, quanto à tentativa de modulação de antígenos em melanoma maligno com interferons em seres humanos (184).

Portanto, o terceiro e mais importante dos objetivos desta dissertação consistiu na avaliação do potencial modulador do interferon alfa na expressão do(s) antígeno(s) de membrana reconhecido(s) pelo imunocombinado 22528S-Tc em pacientes portadores de MMM. Para tal, optou-se pela avaliação seqüencial de pacientes submetidos a imunocintigrafia antes e após a administração de interferon alfa. Cada paciente atuou como o seu próprio controle, enquanto que as determinações quantificadas foram realizadas por um observador independente. Desta forma, procurou-se evitar a influência da heterogeneidade tumoral, assim como reduzir o viés metodológico. Na tabela 2 estão resumidas as características básicas dos pacientes incluídos no grupo modulação, e os respectivos quocientes de captação, antes e após o uso de interferon alfa, estão registrados na tabela 3. Ainda que uma tendência a uma maior concentração do imunocombinado no tumor após a administração continuada de INF alfa em 8/10 casos estudados tenha sido observada, sugere-se grande cautela na interpretação desses achados.

Foi objetivo documentar a ocorrência ou não do fenômeno de modulação da expressão de antígenos tumorais pelo interferon alfa em pacientes portadores de melanoma maligno, já que isto não havia sido descrito anteriormente em literatura. A sua comprovação com bases estatísticas se configurou extremamente complexa, sobretudo pelas dificuldades de pareamento de indivíduos com tamanha variabilidade de expressão antigênica. Dificuldades metodológicas semelhantes têm sido encontradas no estudo de outros moduladores da resposta imunológica, como as interleucinas (92, 93, 97, 113, 116, 129, 153, 157) e outros anticorpos monoclonais (189, 211) bem como os fatores de crescimento hematopoiético (125).

Com o objetivo de aumentar a atividade citotóxica dos anticorpos monoclonais, várias citocinas têm sido empregadas. Em especial, o uso de interleucina-2 tem despertado grande interesse. A interleucina-2 administrada conjuntamente com o anticorpo monoclonal pode aumentar o efeito antitumoral deste último, através da indução da atividade linfocítica citotóxica celular antitumoral IgG2a-dependente do anticorpo monoclonal por monócitos e macrófagos (83, 207, 214, 215, 217, 218, 223). A combinação de anticorpos monoclonais com fatores de estimulação de precursores hematopoiéticos, como o GM-CSF, pode também estimular a atividade CCDA. Da mesma forma, o FNT também potencializa a atividade citotóxica de anticorpos monoclonais e a sua localização na superfície tumoral.

Esse efeito do FNT-alfa parece dependente de um aumento na permeabilidade vascular, e não de uma ação citotóxica direta (209).

Nesta dissertação, além da observação de um incremento na retenção do imuno-conjugado no sítio tumoral após a exposição ao interferon alfa nos pacientes em estudo, torna-se extremamente provocativa a documentação de um caso de conversão de uma metástase, considerada pouco captante na primeira imunocintilografia, em altamente captante após a administração de interferon alfa (fig. 31 a e b). Esse fenômeno ilustra a importância potencial desta estratégia no aprimoramento de imagens e na busca de seletividade terapêutica através do uso de anticorpos monoclonais no futuro. Pode-se antecipar o surgimento de novas técnicas que venham a favorecer a visualização e identificação de lesões não diagnosticáveis pela imunocintilografia convencional. Mais do que isto, esta estratégia poderá permitir uma retenção mais favorável de radioisótopos, drogas citotóxicas e toxinas no tecido tumoral com finalidade terapêutica. Tendo em vista a alta heterogeneidade tumoral, a testagem da capacidade moduladora de agentes biológicos específicos poderá ser efetuada em cada paciente, visando a sua utilização diagnóstica e terapêutica apenas naqueles casos passíveis de modulação por esta técnica.

---

---

6 - CONCLUSÃO

---

---

---

## 6 - CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados permitem estabelecer as conclusões que seguem.

- 1) A administração do imunocjugado do anticorpo monoclonal 22528S com tecnécio<sup>(99m)</sup>, em pacientes portadores de melanoma maligno metastático, foi isenta de quaisquer efeitos adversos, portanto segura.
- 2) Houve uma retenção preferencial do imunocjugado no tecido tumoral na maioria dos pacientes estudados. A ocorrência de casos de não-retenção preferencial no tumor pode ser explicada com base na heterogeneidade da expressão antigênica característica das neoplasias.
- 3) Utilizando-se o paciente como seu próprio controle, ocorreu uma tendência a uma maior retenção do imunocjugado no tecido tumoral após a administração do interferon alfa.
- 4) A hipótese da ocorrência de um efeito modulador de antígenos de superfície em tumores, através de agentes biológicos (p.e. interferon alfa), é defensável com base nas observações clínicas preliminares desta dissertação. Estes achados reforçam a importância da testagem clínica desta hipótese em estudos prospectivos e randomizados no futuro.



---

---

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

---

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AH-KAV, N. G.; GIACOMINI, P.; KANTOR, R. et al. Molecular heterogeneity and shedding of a high-molecular-mass melanoma-associated antigen identified with monoclonal antibodies. **Clin. Chem.**, v.28, n.12, p.2347-2350, 1982.
2. ALLEN JR., H. C.; RISSER, J. R.; GRUNE, J. A. Improvements in outlining of thyroid and localization of brain tumors in the application of radium iodide gamma-ray spectrometry techniques. In: OXFORD RADIOISOTOPE ON REFERENCE, 2, 1954, Oxford. **Proceedings ...** London: Butterworth, 1954. v.1
3. ALLISON, A. C. Turnovers of erythrocytes and plasma proteins in mammals. **Nature**, v. 188, p. 37-40, 1960.
4. ARMSTRONG, B. K.; ENGLISH, D. R. Epidemiologic studies. In: BALCH, C. M.; HOUGHTON, A. N.; MILTON, G. W. et al. (eds.). **Cutaneous Melanoma**. 2nd. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. p.12-22.
5. BAJORIN, D. F.; CHAPMAN, P. B.; WONG, G. et al. Phase I evaluation of a combination of monoclonal antibody R24 and interleukin 2 in patients with metastatic melanoma. **Cancer Res.**, v.50, p.7490-7495, 1990.
6. BALCH, C. M.; HOUGHTON, A. N.; PETERS, L. J. Cutaneous melanoma. In: DEVITA JR., V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. (eds.). **Cancer Principles & Practice of Oncology**. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1993. Cap.46, p.1612-1661.
7. BALDWIN, R.W.; BYERS, V.S.; PIMM, M.V. Monoclonal antibodies and immunoconjugates for cancer treatment. In: PINEDO, H. M.; LONGO, D. L.; CHABNER, B. A. et al. (eds.). **Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers**. Elsevier Science Publishers, 1988. Cap.28, p.397-414.

8. BALL, E. D.; BERNIER, G. M.; CORNWELL III, G. G. et al. Monoclonal antibodies to myeloid differentiation antigens: in vivo studies of three patients with acute myelogenous leukemia. **Blood**, v.62, p.1203-1210, 1983.
9. BARKER, E.; MUELLER, B. M.; HANDGRETINGER, R. et al. Effect of chimeric anti-ganglioside G<sub>D2</sub> antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. **Cancer Res.**, v.51, p.144-149, 1991.
10. BASHAM, T. Y.; MERIGAN, T. C. Recombinant interferon-gamma increases HLA-Synthesis in vitro. **J. Immunol.**, v. 130, p. 1492-1494, 1983.
11. BASHAM, T. Y.; RACE, E. R.; CAMPBELL, M. J. et al. Synergistic antitumor activity with IFN and monoclonal antiidiotype for murine B cell lymphoma. **J. Immunol.**, v.141, p.2855-2860, 1988.
12. BEATTY, J. D.; DUDA, R. B.; WILLIAMS, L. E. et al. Preoperative imaging of colorectal carcinoma with 111-In-labeled anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody. **Cancer Res.**, v.46, p.6494-6502, 1986.
13. BERTOLI, L. F.; KUBAGAWA, H.; MAYUMI, M. et al. Immunotherapy of advanced B cell malignancies with mouse monoclonal antibodies. **Fed. Proc.**, v.43, p.1972, 1984.
14. BERTRAM, J. H.; GILL, P. S.; LEVINE, A. M. et al. Monoclonal antibody T101 in T-cell malignancies: a clinical, pharmokinetic and immunologic correlation. **Blood**, v.68, p.752-761, 1986.
15. BHARGAVA, K. K.; ACHARYA, S. Labeling of monoclonal antibodies with radionuclides. **Sem. Nucl. Med.**, v.19, n.3, p.187-201, July 1989.
16. BLAKE, G.; LILZEDAHL, S. O.; OLHAGEM, B. et al. Catabolism and distribution of gammaglobulin: a preliminary study with <sup>131</sup>I-labelled gammaglobulin. **Acta Med. Scand.**, v. 173, p. 589-603, 1963.
17. BLAU, M.; ANDREWS, G.A.; KNISELEY, R. M. et al. **Radioactive Pharmaceuticals U.S.A.** Washington D.C.: Atomic Energy Commission, 1966. p. 114.

18. BLAU, M.; BENDER, M. Radiomercury (203-Hg) labelled Neohydrin: a new agent for brain tumor localization. **J. Nuclear Med.**, v. 3, p.83, 1962.
19. BOGARD JR., W. C.; DEAN, R. T.; DEO, Y. et al. Practical considerations in the production, purification, and formulation of monoclonal antibodies for immunoscintigraphy and immunotherapy. **Sem. Nucl. Med.**, v.19, n.3, p.202-220, July 1989.
20. BOYD, C. M. et al. <sup>125</sup>I-labeled chlorofine analog in the diagnosis of ocular melanoma. **J. Nucl. Med.**, n. 12, p. 601, 1971.
21. BRAMBELL, F. W. R.; HEMMINGS, W. A.; MORRIS, I. G. A theoretical model of gammaglobulin catabolism. **Nature**, v. 203, p. 1352-1355, 1964.
22. BRANCA, A.; BAGLIONI, C. Evidence that types I and II interferons have different receptors. **Nature**, v. 294, p. 768-771, 1981.
23. BIERWALTES, W. H. et al. Scintillation scanning of malignant melanomas with radioiodinated quinoline derivatives. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 72, p. 485, 1968.
24. BROWN, J. P.; HEWICK, R. M.; HELLSTRÖM, I. et al. Human melanoma associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferin. **Nature**, v. 296, p. 171-173, 1982.
25. BROWN, S. L.; MILLER, R.A.; HORNING, S. J. et al. Treatment of B-cell lymphomas with anti-idiotypic antibodies alone and in combination with alpha interferon. **Blood**, v.73, p.651-661, 1989.
26. BROWN, S. L.; MILLER, R. A.; LEVY, R. Antiidiotypic antibody therapy of B-cell lymphoma. **Sem. Oncol.**, v.16, p.199-210, 1989.
27. BUCHLER, M.; FRIESS, H.; SCHULTHEISS, K-H. et al. A randomized controlled trial of adjuvant immunotherapy (murine monoclonal antibody 494/32) in resectable pancreatic cancer. **Cancer**, v.68, p.1507-1512, 1991.
28. BURAGI, G. L. Radioimmunodetection of malignant melanoma with the 225.28S monoclonal antibody to HMW-MAA. **Nucl. Med.**, v.25, p.220-224, 1986.

29. BURDETTE, S.; SCHWARTZ, R. S. Current concepts: immunology, idiotypes and idiotypic network. **N. Engl. J. Med.**, v.317, p.219-224, 1987.
30. CARREL, S.; SCHREYER, M.; SCHMIDT-KESSEN, A. et al. Reactivity spectrum of 30 monoclonal antimelanoma antibodies to a panel of 28 melanoma and control cell lines. **Hybridoma**, v.1, n.4, p.387-397, 1982.
31. CARUBIA, J. M.; YU, R. K.; MACALA, L. J. et al. Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 120, p. 500-504, 1984.
32. CASSEN, B.; CURTIS, L.; REED, C. et al. Instrumentation for I-131 use in medical studies. **Nucleonics**, v. 9, n. 2, p. 46, 1951.
33. CAUFIELD, M. J.; BARNA, B.; MURTHY, S. et al. Phase Ia/Ib trial of an anti-GD3 monoclonal antibody (R24) in combination with interferon alpha (rHuIFNa-2a) in patients with malignant melanoma. **J. Biol. Response Modif.**, v.9, p.319-328, 1990.
34. CAVALIERI, R. R.; SCOTT, K. G.; SAIRENJIE, E. Selenite (75Se) as a tumor localizing agent in man. **J. Nucl. Med.**, v. 7, p. 197-208, 1966.
35. CERNY, T.; OWNES, S. E.; MACKENZIE, S. A. Immunoscintigraphy with <sup>99m</sup>Tc labelled (Fab) 2 fragments of an antimelanoma monoclonal antibody (22528S) in patients with metastatic malignant melanoma. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 13, p. 130-133, 1987.
36. CHAPMAN, P. B.; LONBERG, M.; DUTEAU, C. et al. Analysis of variants of an anti-GD3 mouse monoclonal antibody: role of right chain in antigen binding effector function and tumor localization, abstracted. **Am. Assoc. Can. Res.**, v. 29, p. 1676, 1988.
37. CHEUNG, N. K. V.; LAZARUS, H.; MIRALDI, F. D. et al. Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.5, p.1430-1440, 1987.
38. COBB, L. M. Intratumour factors influencing the access of antibody to tumour cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.28, p.235-240, 1989.

39. CONSELL, R. E. et al. Tumor localizing agents IX radioiodinated cholesterol. **Henoids**, v. 16, p. 317, 1970.
40. COURTENAY-LUCK, N. S.; EPENETOS, A. A.; MOORE, R. et al. Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. **Cancer Res.**, v.46, p.6489-6493, 1986.
41. DAVID, R.J.; AWSTEN, K. F. **Structure and Function of Human Immunoglobulins: the biological principles of disease.** W. B. Saunders, 1981. p.174-188.
42. DAY, E. D. et al. Localization in vivo y radioiodinated rat fibrogen in the murphy rat lymphosarcoma and in other transplantable rat tumors. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 22, p. 413, 1959.
43. DEXTER, D. L.; LEITH, J. T. Tumor heterogeneity and drug resistance. **J. Clin. Oncol.**, v.4, n.2, p.244-257, Feb. 1986.
44. DILLMAN, R. O. Antibodies as cytotoxic therapy. **J. Clin. Oncol.**, v.12, n.7, p.1497-1515, July 1994.
45. DILLMAN R.O. Antibody therapy. In: OLDHAM, R. K. (ed.). **Principles of Cancer Biotherapy.** 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 1991. p.395-432.
46. DILLMAN, R.O. The human antimouse response. **Antibody Immunocom. Radiopharm.**, v.3, p.1-15, 1990.
47. DILLMAN, R.O.; BEAUREGARD, J.; JAMIESON, M. et al. Toxicities associated with monoclonal antibody infusions in cancer patients. **Mol. Biother.**, v.1, p.81-85, 1988.
48. DILLMAN, R. O.; BEAUREGARD, J.; RYAN, K. P. et al. Radioimmunodetection of cancer using indium-labeled monoclonal antibodies. **NCI Monograf.**, v.3, p.33-36, 1987.

49. DILLMAN, R.O.; BEAUREGARD, J.; SHAWLER, D. L. et al. Continuous infusion of T101 monoclonal antibody in chronic lymphocytic leukemia and cutaneous T-cell lymphoma. **J. Biol. Response Modif.**, p.394-410, 1986.
50. DILLMAN, R.O.; DILLMAN, J. B.; HALPERN, S. E. et al. Toxicities and side effects associated with intravenous infusions of monoclonal antibodies. **J. Biol. Response Modif.**, v.5, p.73-84, 1986.
51. DILLMAN, R. O.; JOHNSON, D. E.; SHAWLER, D. L. Immune interferon modulation of in vitro murine antihuman T-cell monoclonal antibody mediated cytotoxicity. **J. Immunol.**, v.136, p.728-731, 1986.
52. DIVGI, C. R.; LARSON, S. M. Radiolabeled monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of malignant melanoma. **Sem. Nucl. Med.**, v.19, n.4, p.252-261, Oct. 1989.
53. DIXON, F. J.; TALMAGE, D. W.; MAURER, P. H. et al. The half-life of homologous gamma globulin (antibody) in several species. **J. Exp. Oncol.**, v. 96, p. 313-318, 1952.
54. DYER, M. J. S.; HALE, G.; HAYHOE, F. G. J. et al. Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. **Blood**, v.73, p.1431-1439, 1989.
55. DOUBLE, J. A.; BIBBY, M. C. Therapeutic index: a vital component in the selection of anticancer agents for clinical trial. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 13, p. 988-991, 1989.
56. EARY, J. F.; SCHROFF, R. W.; ABRAMS, P. G. et al. Successful imaging of malignant melanoma with technetium-99m-labeled monoclonal antibodies. **J. Nucl. Med.**, v.30, n.1, p.25-32, Jan. 1989.
57. ELIAS, D. J.; HIRSCHOWITZ, L.; KLINE, L. E. et al. Phase I clinical comparative study of monoclonal antibody KS1/4 and KS1/4-methotrexate immunoconjugate in patients with non-small cell lung carcinoma. **Cancer Res.**, v.50, p.4154-4159, 1990.

58. EPENETOS, A. A.; SNOOK, D.; DURBIN, H. et al. Limitations of radiolabeled monoclonal antibodies for localization of human neoplasms. **Cancer Res.**, v.46, p.3183-3191, June 1986.
59. FAIRWEATHER, D. S.; BRADWELL, A. R.; DYKES, P. W. et al. Improved tumor localization using indium-111 labeled antibodies. **Br. J. Med.**, v. 287, p. 167-170, 1983.
60. FERRONE, S. et al. In: ROTH, J. A. (ed.). **Monoclonal Antibodies in Cancer: advances in diagnosis and treatment.** New York: Futura Publishing, 1986. p.111-139.
61. FERRONE, S. et al. In: SRIVASTAVA, S. C. (ed.). **Radiolabeled Monoclonal Antibodies for Imaging and Therapy.** New York: Plenum Press, 1988. v.152, p.55-74.
62. FIDLER, I. J.; HART, I. R. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. **Science**, v.217, p.998-1003, 1982.
63. FITZPATRICK, T. B.; MILTON, G. W.;BALCH, C. M. et al. Clinical characteristics. In: BALCH, C. M.; HOUGHTON, A. N.; MILTON, G. W. et al. (eds.). **Cutaneous Melanoma.** 2nd. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. p.223-233.
64. FOON, K. A.; SCHROFF, R. W.; BUNN, P. A. et al. Effects of monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.64, p.1085-1093, 1984.
65. FRAKER, P. J.; SPEAK, J. C. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3-alfa-diphenylglycouril. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 80, p. 849-857, 1978.
66. FRODIN, J. E.; HARMENBERG, U.; BIBERFELD, P. et al. Clinical effects of monoclonal antibodies [MAb 17-1A] in patients with metastatic colorectal carcinomas. **Hybridoma**, v.7, p.309-321, 1988.
67. FUJIMORI, K.; COVELL, D. G.; FLETCHER, J. E. et al. A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier. **J. Nucl. Med.**, v.31, p.1191-1198, 1990.



68. FUJITA, M.; KIMURA, K. **Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**. Tokyo : Tokyo Press, 1970. v.2, p. 300.
69. GARRIGUES, H. J.; LARK, M. W.; LARA, S. et al. The melanoma proteoglycan: restricted expression on microspikas, a specific domain of the cell surface. **J. Cell. Biol.**, v. 103, p. 1699-1710, 1986.
70. GARRINES, H. J.; TILGEN, W.; HELLSTRON, I. et al. Detection of human melanoma associated antigen p97, in histological sections of primary human melanomas. **Int. J. Cancer**, v. 29, p. 511-515, 1982.
71. GHOSH, A. K.; CERNY, T.; WAGSTAFF, J. et al. Effect in vivo administration of interferon gamma on expression of MHC products and tumor associated antigens in patients with metastatic melanoma. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 25, p. 1637-1643, 1989.
72. GIACOMINI, P.; VEGLIA, F.; CONDIALI, F. P. et al. Level of a membrane-bound high molecular weight melanoma associated antigen and a cytoplasmic melanoma associated-antigen in cancer. **Res.**, v. 44, p. 1281-1287, 1984.
73. GOLD, P.; FREEDMAN, S. O. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by imunologic tolerance and absortion techniques. **J. Exp. Med.**, v. 121, p. 439-462, 1965.
74. GOLDENBERG, D. M. Future role of radiolabeled monoclonal antibodies in oncological diagnosis and therapy. **Sem. Nucl. Med.**, v.19, n.4, p.332-339, Oct. 1989.
75. GOLDENBERG, D.M. Introduction to the Second Conference on Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy of Cancer. **Cancer Res.**, v.50, n.3, p.778s-779s, Feb. 1990.
76. GOLDENBERG, D. M. Oncofetal and other tumor-associated antigens of the human digestive system. **Curr. Top. Pathol.**, v. 63, p. 289-342, 1976.
77. GOLDENBERG, D. M.; DELAND, F. H.; KIM, E. et al. Use of radolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. **N. Engl. J. Med.**, v. 298, p. 1384-1386, 1978.

78. GOLDENBERG, D. M.; GOLDENBERG, H.; SHARKEY, R. M. et al. Clinical studies of cancer radioimmunodetection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with  $^{123}\text{I}$  or  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . **Cancer Res.**, v.50, n.3, p.909s-921s, Feb. 1990.
79. GOLDENBERG, D. M.; HANSEN, H. J. Carcinoembryonic antigen present in human colonic neoplasm serially propagated in hamsters. **Science**, v. 175, p. 1117-1118, 1972.
80. GOODMAN, G. E.; HELLSTROM, I.; BRODZINSKY, L. et al. Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in breast, colon, ovarian, and lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, v.8, p.1083-1092, 1990.
81. GOODMAN, G. L.; BEAUMIER, P.; HELLSTROM, I. et al. Pilot trial of murine monoclonal antibodies in patients with advanced melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.3, p.340-352, 1985.
82. GOODWIN, D. A.; GOODE, R.; BROWN, L. et al.  $^{111}\text{In}$  labelled transferrin for the detection of tumors. **Radiology**, v. 100, p. 175-179, 1971.
83. GREENE, W. C.; LEONARD, W. J.; DEPPER, J. M. et al. The human interleukin-2 receptor: normal and abnormal expression in T cells and in leukemias induced by the human T lymphotropic retroviruses. **Ann. Intern. Med.**, v.105, p.560-572, 1986.
84. GREINER, J. W.; HAND, P. H.; NOGUCHI, P. et al. Enhanced expression of surface tumor-associated antigens on human breast and colon tumor cells after recombinant human leukocyte alpha-interferon treatment. **Cancer Res.**, v.44, p.3208-3214, 1984.
85. GREINER, J.W.; SCHLOM, J.; PESTKA, S. et al. Modulation of tumor associated antigen expression and shedding by recombinant human leukocyte and fibroblast interferon. **Pharmacol. Ther.**, v. 31, p. 209-236, 1985.
86. GRINDEY, G. B. Current status of drug development: failure or limited success? **Cancer Cells**, v. 2, p. 163-171, 1990.
87. HAINFELD, J. F.; FOLEY, C. J.; SRIVASTAVA, S. C. et al. Radioactive gold cluster immunoconjugates: potential agents for cancer therapy. **Nucl. Med. Biol.**, v.17, n.3, p.287-294, 1990.

88. HAISMA, H. J.; PINEDO, H. M.; KESSEL, M. A. P. et al. Human IgM monoclonal antibody 16.88: pharmacokinetics and immunogenicity in colorectal cancer patients. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.83, p.1813-1819, 1991.
89. HALE, G.; DYER, M.; CLARK, M. R. et al. Remission induction in non-Hodgkins lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. **Lancet**, v.2, p.1394-1399, 1988.
90. HALPERN, S. E.; HAINDL, W.; BEAUREGARD, J. et al. Scintigraphy with In-111-labeled monoclonal antitumor antibodies: kinetics, biodistribution, and tumor detection. **Radiology**, v.168, p.529-536, 1988.
91. HAMBLIN, T. J.; CATTAN, A. R.; GLENNIE, M. J. et al. Initial experience in treating human lymphoma with a chimeric univalent derivative of monoclonal anti-idiotypic antibody. **Blood**, v.69, p.797-797, 1987.
92. HANK, J. A.; ROBINSON, R. R.; SURFUS, J. et al. Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. **Cancer Res.**, v.50, p.5234-5239, 1990.
93. HEBERMAN, R. B.; MORGAN, A. C.; REISFELD, R. et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against human melanoma by human effector cells in cooperation with mouse monoclonal antibodies. In: REISFELD, R. A.; SELL, S. (eds.). **Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy**. New York: Liss, 1985. v.27, p.193-203.
94. HEKMAN, A.; HONSELAAR, A.; VUIST, W. M. et al. Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.32, p.364-372, 1991.
95. HELLSTRÖM, I. et al. Tumor antigens as targets for active and passive IMM therapy. **Proc. Am. Ass. Cancer Res.**, v.31, p.470-472, Mar. 1990.
96. HELLSTRÖM, I.; BROWN, J. P.; HELLSTROM, K. E. Workshop on monoclonal antibodies to human melanoma: associated antigens findings of the Seattle group. **Hybridoma**, v. 1, n. 4, 1982.

97. HELLSTRÖM, I.; GARRIGUES, U.; LAVIE, E. et al. Antibody-mediated killing of human tumor cells by attached effector cells. **Cancer Res.**, v.48, p.624-627, 1988.
98. HEPPNER, G. H. Tumor heterogeneity. **Cancer Res.**, v.44, p.2259-2265, 1984.
99. HERLYN, M.; HOUGHTON, A. N. Biology of melanocytes and melanoma: In: BALCH, C. M.; HOUGHTON, A. N.; MILTON, G. W. et al. (eds.). **Cutaneous Melanoma**. 2nd. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. p.234.
100. HERLYN, M.; STEPLEWSKI, Z.; ATKINSON, B. F. et al. Comparative study of the binding characteristics of monoclonal antimelanoma antibodies. **Hybridoma**, v.1, n.4, p.403-411, 1982.
101. HNATOWICH, D. J. Recent developments in the radiolabeling of antibodies with Iodine, Indium and Technetium. **Sem. Nucl. Med.**, v.20, n.1, p.80-91, 1990.
102. HOFFER, P. B. Status of Gallium-67 in tumor detection. **J. Nucl. Med.**, v. 21, p. 394-398, 1980.
103. HORNING, S. J.; ROSENBERG, S. A. The natural history of initially untreated low grade non-Hodgkin's lymphoma. **N. Engl. J. Med.**, v.311, p.1471-1475, 1984.
104. HOUGHTON, A. N.; MINTZER, D.; CORDON-CARDO, C. et al. Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.1242-1246, 1985.
105. HOUGHTON, A. N.; REAL, F.; DAVIS, L.J. et al. Phenotypic heterogeneity of melanoma: relation to the differentiation program of melanoma cells. **J. Exp. Med.**, v. 165, p. 812-829, 1987.
106. HU, F.; EPSTEIN, A. L.; NAEVE, G. S. et al. A phase Ia clinical trial of LYM-1 monoclonal antibody serotherapy in patients with refractory B cell malignancies. **Hematol. Oncol.**, v.7, p.155-166, 1989.
107. ILIOPOULOS, D.; ERNST, C.; STEPLEWSKI, Z. et al. Inhibition of metastases of a human melanoma xenograft by monoclonal antibody to the GD2/GD3 gangliosides. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.81, p.440-444, 1989.

108. IMAI, K.; AH-KAV, N. G.; FERRONE, S. Characterization of monoclonal antibodies to human melanoma - associated antigens. **INCI**, v.66, n.3, p.489-496, 1981.
109. IMAI, K.; YACHI, A.; FERRONE, S. Tumour imaging. In: BURCHIEL, S. W.; RHODES, B. A. (eds.) **The Radiochemical Detection of Cancer**. Masson, 1982. p. 141
110. ISSACS, A.; LINDEMANN, J. Virus interference. **Proc. R. Soc. (biol)**, v. 147, p. 258-267, 1957.
111. JOHNSON, J. P.; RIETHMULLER, G. Monoclonal antibodies and melanomas. In: FERONNE, S.; DIERICH, M. P. (eds.). **Handbook of Monoclonal Antibodies: applications in Biology and Medicine**. Parkridge (NJ): Noyes, 1985. p.347-359.
112. JOSHI, A. R.; SARKAR, F. H.; GUPTA, S. L. Interferon receptors: cross-linking of human leukocyte interferon alpha-2 to its receptor on human cells. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 13774-13887, 1982.
113. JUNGHANS, R. P.; WALDMANN, T. A.; LANDOLFI, N. F. et al. Anti-tac-H: a humanized antibody to the interleukin 2 receptor with new features for immunotherapy in malignant and immune disorders. **Cancer Res.**, v:50, p.1495-1502, 1990.
114. KANTOR, Raphe R. S. et al. Analysis of the NIH workshop monoclonal antibodies to human melanoma antigens. **Hybridoma**, v.1, n.4, p.473-482, , 1982.
115. KAPLAN, W. D.; TAKVORIAN, T.; MORRIS, J. H. et al. Thallium-201 brain tumor imaging a comparative study with pathological correlation. **J. Nucl. Med.**, v. 28, p. 47-52, 1987.
116. KAWASE, I.; KOMUTA, K.; HARA, H. et al. Combined therapy of mice bearing a lymphokine-activated killer-resistant tumor with recombinant interleukin-2 and an antitumor monoclonal antibody capable of inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Cancer Res.**, v.48, p.1173-1179, 1988.
117. KEENAN, A. M.; HARBERT, J. C.; LARSON, S. M. Monoclonal antibodies in Nuclear Medicine. **J. Nucl. Med.**, v.26, p.531-537, 1985.

118. KHAZAELI, M. B.; SALEH, M. N.; LIU, T. P. et al. Pharmacokinetics and immune response of  $^{131}\text{I}$ -chimeric mouse/human B72.3 (human  $\gamma$ ) monoclonal antibody in humans. **Cancer Res.**, v.51, p.5461-5466, 1991.
119. KIRKWOOD, J. M.; NEUMANN, R. D.; ZOGHBI, S. S. et al. Scintigraphic detection of metastatic melanoma using indium-111/DTPA conjugated anti-gp240 antibody [ZME018]. **J. Clin. Oncol.**, v.5, p.1247-1255, 1987.
120. KLEIN, B.; WIJDENES, J.; ZHANG, X. G. et al. Murine anti-interleukin 6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. **Blood**, v.78, p.1198-1204, 1991.
121. KNOX, S. J.; LEVY, R.; HODGKINSON, S. et al. Observations on the effect of chimeric anti-CD4 monoclonal antibody in patients with mycosis fungoides. **Blood**, v.77, p.20-30, 1991.
122. KOH, H. K. Cutaneous melanoma. **New Engl. J. Med.**, v.325, p.171, 1991.
123. KOLHER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.
124. KULDEEP, K. B.; SEETHARAMA, A. A. Labeling of monoclonal antibodies with radionuclides. **Sem. Nucl. Med.**, v.19, n. 3, p 187-201, jul. 1989.
125. KUSHNER, B. H.; CHEUNG, N. K. GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. **Blood**, v.73, p.1936-1941, 1989.
126. LAMKI, L. M.; ZUKIWSKI, A. A.; SHANKEN, L. J. et al. Radioimaging of melanoma using  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled fab fragment reactive with a high molecular weight melanoma antigen. **Cancer Res.**, v.50, n.3, p.904s-908s, Feb. 1990.
127. LARSON, S. M. Clinical radioimmunodetection, 1978-1988: overview and suggestions for standardization of clinical trials. **Cancer Res.**, v.50, n.3, p.892s-898s, Feb. 1990.
128. LARSON, S. M. Radiolabeled monoclonal anti-tumor: antibodies in diagnosis and therapy. **J. Nucl. Med.**, v.26, p.538-545, 1985.

129. LEBERTHON, B.; KHAWLI, L. A.; ALAUDDIN, M. et al. Enhanced tumor uptake of macromolecules induced by a novel vasoactive interleukin 2 immunoconjugate. **Cancer Res.**, v.51, p.2694-2698, 1991.
130. LEVY, R. Will monoclonal antibodies find a place in our therapeutic armamentarium? **J. Clin. Oncol.**, v.5, p.527-579, 1987.
131. LEVY, R.; MILLER, R. A. Biological and clinical indications of lymphocyte hybridomas: tumor therapy with monoclonal antibodies. **Ann. Rev. Med.**, v.34, p.107-116, 1983.
132. LIAO, S.; KWONG, P. C.; KHOSRAVI, M. et al. Enhanced expression of melanoma-associated antigens and B2-microglobulin on cultured human melanoma cells by interferon. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 68, p.19-25, 1982.
133. LIAO, S.; MERANDA, C.; AVNER, B. P. et al. Immunohistochemical phenotyping of human solid tumors with monoclonal antibodies in devising biotherapeutic strategies. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.28, p.77-86, 1989.
134. LOBUGLIO, A. F.; SALEH, M. N.; LEE, J. et al. Phase I trial of multiple large doses of murine monoclonal antibody CO17-1A: clinical aspects. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.17, p.932-936, 1988.
135. LOBUGLIO, A. F.; WHEELER, R. H.; TRANG, J. et al. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.4220-4224, 1989.
136. LOTZE, M. T.; PERENTESIS, P.; KEENAN, A. M. et al. Monoclonal antibody imaging of human melanoma: radioimmunodetection by subcutaneous or systemic injection. **Ann. Surg.**, v.204, n.3, p.223-235, Sept. 1986.
137. LUBECK, M. D.; STEPLEWSKI, Z.; BAGLIA, F. et al. The interaction of murine IgG subclass proteins with human monocyte Fc receptors. **J. Immunol.**, v.135, p.1299-1304, 1985.
138. LUNDBLAD, L. R.; NOYES, M. C. **Chemical Reagents for Protein Modification**. Boca Raton, 1984. p 12-17.

139. MACH, J. P.; CHATAL, J. F.; LUMBROSO, J. D. et al. Tumor localization in patients by radiolabeled monoclonal antibodies against colon carcinoma. **Cancer Res.**, v.43, p.5593-5600, 1983.
140. MALONEY, D.G.; LEVY, R.; MILLER, R. A. Monoclonal antiidiotype therapy of Ball lymphoma. **Biol. Ther. Cancer Update**, v.2, p.1-10, 1992.
141. MARKWELL, A. A. K. A new solid-state reagent to iodinate proteins. **Ann. Biochem.**, v. 125, p. 427-432, 1982.
142. MELLSTEDT, H.; FRODIN, J. E.; MANUCCI, G. et al. The therapeutic use of monoclonal antibodies in colorectal carcinoma. **Sem. Oncol.**, v.18, p.462-477, 1991.
143. MERIGAN JR., T. C. Interferon and interferon inducers: the clinical outlook. In: **IMMUNOBIOLOGY**. Sinaver Associates, 1973. Cap.26, p.258-265.
144. METZGER, H.; KINNET, J. P. How antibodies work: focus on Fc receptors. **FASEB J.**, v.2, p.3-11, 1988.
145. MILLER, R.A.; LEVY, R. Response of cutaneous T cell lymphoma to therapy with hybridoma monoclonal antibody. **Lancet**, v.2, p.226-230, 1981.
146. MILLER, R. A.; MALONEY, D. G.; WARNKE, R. et al. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. **N. Engl. J. Med.**, v.306, p.517-522, 1981.
147. MILLER, R. A.; OSEROFF, A. R.; STRATTE, P. T. et al. Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma. **Blood**, v.62, p.988-995, 1983.
148. MITTELMAN, A.; CHEN, Z. J.; KAGESHITA, T. et al. Active specific immunotherapy in patients with melanoma: a clinical trial with mouse antiidiotypic monoclonal antibodies elicited with synergeneic anti-high-molecular-weight melanoma-associated antigen monoclonal antibodies. **J. Clin. Invest.**, v.86, p.2136-2144, 1990.



149. MITTELMAN, A.; CHEN, Z. J.; YANG, H. et al. Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23: induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with stage IV melanoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.466-470, 1992.
150. MOORE, G. E. Use of radioactive di-iodofluorescein in the diagnosis and localization of brain tumors. **Science**, v. 107, p. 569, 1948.
151. MOORE, G. E. **Diagnosis and Localization of Brain Tumors: A Clinical and Experimental Study Employing Fluorescent and Radioactive Tracer Methods.** Charles C, Thomas, Springfield, Ill., 1953.
152. MORGAN JR., A. C.; GALLOWAY, D. R.; REISFELD, R. A. Production and characterization of monoclonal antibody to a melanoma specific glycoprotein. **Hybridoma**, v. 1, p. 27-36, 1981.
153. MORGAN, A. C.; SULLIVAN, W.; GRAVES, S. et al. Murine monoclonal IgG3 to human colorectal tumor-associated antigens: enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by interleukin-2. **Cancer Res.**, v.49, p.2773-2776, 1989.
154. MORRISON, R. T.; LYSTER, D. M.; ALCORN, L. et al. Radioimmunoimaging with <sup>99m</sup>Tc monoclonal antibodies studies. **Int. J. Nucl. Med. Biol.**, v. 11, p. 184-188, 1984.
155. MUJOO, K.; KIPPS, T. J.; YANG, H. M. et al. Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. **Cancer Res.**, v.49, p.2857-2861, 1989.
156. MULSHINE, J. L.; AVIS, I.; TRESTON, A. M. et al. Clinical use of a monoclonal antibody to bombesin-like peptide in patients with lung cancer. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.547, p.360-372, 1988.
157. MUNN, D. H.; CHEUNG, N. K. Interleukin-2 enhancement of monoclonal antibody-mediated cellular cytotoxicity against human melanoma. **Cancer Res.**, v.47, p.6600-6605, 1987.

158. MURRAY, J. L.; ROSENBLUM, M. G.; LAMKI, K. et al. Clinical parameters related to optimal tumor localization of indium-111-labeled mouse antimelanoma monoclonal antibody ZME018. **J. Nucl. Med.**, v.28, p.25-33, 1987.
159. MURRAY, J. L.; ROSENBLUM, M. G.; SOBOL, R. E. et al. Radioimmunoimaging in malignant melanoma with 111-In-labeled monoclonal antibody 96.5. **Cancer Res.**, v.45, p.2376-2381, 1985.
160. NATALI, P. G.; GIRALDO, G.; BETIT, E. et al. **From Oncogenes to Tumor Antigens.** Elsevier Science Publishers, 1984. p.127
161. NELP, W. B.; EARY, J. F.; JONES, R. F. et al. Preliminary studies of monoclonal antibody lymphoscintigraphy in malignant melanoma. **J. Nucl. Med.**, v.28, n.1, p.34-41, Jan. 1987.
162. NICHOLSON, G. L. Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. **Cancer Res.**, v. 47, p.1473-1487, 1987.
163. NISONOFF, A. Idiotypes: concepts and applications. **J. Immunol.**, v.147, p.2429-2438, 1991.
164. OLDHAM, R. K. Monoclonal antibodies: does sufficient selectivity to cancer cells exist for therapeutic application? **J. Biol. Response Modif.**, v.6, p.227-234, 1987.
165. OLDHAM, R. K.; FOON, K. A.; MORGAN, A. C. et al. Monoclonal antibody therapy of malignant melanoma: in vivo localization in cutaneous metastasis after intravenous administration. **J. Clin. Oncol.**, v. 2, p. 1235-1244, 1984.
166. PERKINS, A. C.; PIMM, M. V. Immunological responses to monoclonal antibodies. In: **IMMUNOSCINTIGRAPHY: practical aspects and clinical application.** Wiley-Liss, 1991. p.111-127.
167. PORTOKAUTILIAN, J.; ZWINGELSTEIN, G.; DORE, J. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. **Eur. J. Biochem.**, v. 94, p. 19-23, 1979.

168. PRESSMAN, D; KEIGHLEY, G. The zone of activity of antibodies as determined by the use of radioactive tracers: the zone of activity of nephrotoxic anti-kidney serum. **J. Immunol.**, v. 59, p. 141-146, 1948.
169. PUKEL, C. S.; LLOYD, K. O.; TRAVASSOS, I. R. et al. GD3: a prominent ganglioside of human melanoma: detection and characterization by mouse monoclonal antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 155, p. 1133-1147, 1982.
170. RADIOLABELED monoclonal antibodies: radiochemical pharmacokinetic and clinical challenges. **J. Nucl. Med.**, v.26, n.5, p.546-547, May 1985. (Editorial)
171. RAPHE, R. S.; KANTOR, A. H.; KAU, N. G. et al. Analysis of NIH workshop monoclonal antibodies to human melanoma antigens. **Hybridoma**, v. 1, n. 4, p. 473-482, 1982.
172. RAZELLE, K.; MOSCHE T.; JORDAN, G. Interferons alfa, beta e gama: basic principles and preclinical studies. In: DEVITA JR., V. T.; HELLMANN, S.; ROSENBERG, S. A. **Biologic Therapy of Cancer**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1991. Cap. 14, p.247-274.
173. REAL, F. X.; HOUGHTON, A. N.; ALBINO, A. P. et al. Surface antigens of melanoma and melanocytes defined by mouse monoclonal antibodies: specificity analysis and comparison of antigenic expression in cultures cells and tissues. **Cancer Res.**, v. 45, p. 4401-4411, 1985.
174. RESTTIG, W. J.; REAL, F. X.; SPENGLER, B. A. et al. Human melanoma proteoglycan: expression in hybrids controlled by intrinsic and extrinsic signals. **Science**, v. 231, p. 1281-1284, 1986.
175. REYNOLDS, J. C.; DEL VECHIO, S.; SAKA HARA, H. et al. Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: clinical findings and implications. **Nucl. Med. Biol.**, v.16, n.2, p.121-125, 1989.
176. RITZ, J.; PESANDO, J. M.; NOTIS-MCCONARTY, J. et al. Modulation of human acute lymphoblastic leukemia antigen induced by monoclonal antibody in vitro. **J. Immunol.**, v.125, p.1506-1514, 1980.

177. RITZ, J.; PESANDO, J. M.; SALLAN, S. E. et al. Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody. **Blood**, v.58, p.141-152, 1981.
178. ROBERT, W. B.; VERA, S. B.; MALCOLM, V. P. Monoclonal antibodies and immunoconjugates for cancer treatment. In: **CANCER Chemotherapy and Biological Response Modifiers**. Elsevier Science Publishers, 1988. Cap.28, p.397-415.
179. RODECK, U.; MELBER, K.; KATH, R. et al. Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v.97, p.20, 1991.
180. ROITT, I. In: **ESSENTIAL Immunology**. Blackwell Scientific Publications. Cap.4.
181. ROITT, I. Molécules which recognize antigen. In: **ESSENTIAL Immunology**. Blackwell Scientific Publications. Cap.3, p. 31-32.
182. ROMAINE, E. S.; MANN, B. D.; MORTON, D. L. Monoclonal antibodies to 125Kd and 95 Kd proteins on human melanoma cells: comparison with other monoclonal-defined melanoma antigens. **Hybridoma**, v. 1, n. 4, p. 433-445, 1982.
183. ROSA, F.; HATAT, D.; ABADIE, A. et al. **Induction and Regulation of MHC Genes by Interferon**. Elsevier Science Publishers, 1986. 8 v.
184. ROSENBLUM, M. R.; LAMKI, L. M.; MURRAY, J. L. et al. Interferon-induced changes in pharmacokinetics and tumor uptake of <sup>111</sup>In labeled and antimelanoma antibody 96.5 in melanoma patients. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.80, p.160-165, 1988.
185. RYAN, K. P.; DILLMAN, R. O.; DENARDO, S. J. et al. Breast cancer imaging with In-111 human IgM monoclonal antibodies. **Radiology**, v.167, p.71-75, 1988.
186. SALEH, M. N.; KHAZAELI, M. B.; WHEELER, R. H. et al. Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD<sub>2</sub> antibody 14G2a in metastatic melanoma. **Cancer Res.**, v.52, p.4342-4347, 1992.
187. SALEH, M. N.; LOBUGLIO, A. F.; WHEELER, R. H. et al. A phase II trial murine monoclonal antibody 17-1A and interferon-gamma: clinical and immunological data. **Cancer Immunol.**, v.32, p.185-190, 1990.

188. SALK, D. Technetium-labelled monoclonal antibodies for imaging metastatic melanoma: results of a multicenter clinical study. **Semin. Oncol.**, v. 15, n. 6, p. 608-618, 1988.
189. SCHEINBERG, D. A.; LOVETT, D.; DIVGI, C. R. et al. A phase I trial of monoclonal antibody M195 in acute myelogenous leukemia: specific bone marrow targeting and internalization of radionuclide. **J. Clin. Oncol.**, v.9, p.478-490, 1991.
190. SCHLOM, J. New principles and novel recombinant constructs for use in the management of human carcinoma. **Proc. Am. Ass. Cancer Res.**, v.31, p.472-474, Mar. 1990.
191. SCHNIPPER, L. E. Clinical implications of tumor-cell heterogeneity. **N. Engl. J. Med.**, v.314, p.1423-1431, 1986.
192. SCHROFF, R. W.; FOON, K. A.; WILBURN, S. B. et al. Human antimurine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. **Cancer Res.**, v.45, p.879-885, 1985.
193. SCHWARTSMANN, G.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H. M. The main steps in the development of new anticancer agents. **Radiother. Oncol.**, v. 12, p. 301-313, 1988.
194. SCHWARTSMANN, G.; WORKMAN, P. Anticancer drug screening and discovery in the 1990's. **Eur. J. Cancer**, v. 29, p. 3-14, 1993.
195. SEARS, H. F.; HERLYN, D.; STEPLEWSKI, Z. et al. Phase II clinical trial of a murine monoclonal antibody cytotoxic for gastrointestinal adenocarcinoma. **Cancer Res.**, v.45, p.5910-5913, 1985.
196. SELVERSTONE, B.; SWEET, W. H; ROBINSON, C. F. Clinical use of radioactive phosphorus in the surgery of brain tumors. **Ann. Surg.**, v. 130, p. 643, 1949.
197. SERAFINI, A. N.; KOTLER, J.; FEUN, L. et al. Technetium-99m labeled monoclonal antibodies in the detection of metastatic melanoma. **Clin. Nucl. Med.**, v.14, p.580-587, Aug. 1989.

198. SESSLER, M. J.; GECK, P.; MAUL, F. D. et al. New aspects of cellular Tl-201 uptake: T+Na+2 Cl-Cotransport is the central mechanism of ion uptake. **J. Nucl. Med.**, v. 25, p. 24-27, 1986.
199. SHAKIB, F. (ed.). **Basic and Clinical Aspects of IgG Subclasses**. New York: Carger, 1986.
200. SHAWLER, D. L.; BARTHOLOMEW, R. M.; SMITH, L. M. et al. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. **J. Immunol.**, v.135, p.1530-1535, 1985.
201. SHAWLER, D. L.; MACCALLISTER, T. J.; SOBOL, R. E. et al. Serologic and cellular assays to monitor therapy with murine monoclonal antibodies. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.2, p.184-190, 1987.
202. SHAWLER, D. L.; MICELI, M. C.; WORMSLEY, S. B. et al. Induction of in vitro and in vivo antigenic modulation by the anti-human T cell monoclonal antibody T101. **Cancer Res.**, v.44, p.5921-5927, 1984.
203. SICCARDI, A. G. Tumor immunoscintigraphy by means of radiolabeled monoclonal antibodies: multicenter studies of the Italian National Research Council - Special Project "Biomedical Engineering". **Cancer Res.**, v.50, n.3, p.899s-903s, Feb. 1990.
204. SICCARDI, A. G.; BURAGGI, G. L.; CALLEGARO, L. et al. Multicenter study of immunoscintigraphy with radiolabeled monoclonal antibodies in patients with melanoma. **Cancer Research**, v. 46, p. 4817-4822, sep. 1986.
205. SIKIC, B. I. Anticancer drug discovery. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, p. 738-740, 1991.
206. SIKORSKA, H. M. Therapeutic applications of antiidiotypic antibodies. **J. Biol. Response Modif.**, v.7, p.327-358, 1988.
207. STEPLEWSKI, Z.; SUN, L. K.; SHEARMAN, C. W. et al. Biological activity of human-mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with antitumor specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.85, p.4852-4856, 1988.

208. STEVENSON, F. K.; BELL, A. J.; CUSACK, R. et al. Preliminary studies for an immunotherapeutic approach to the treatment of human myeloma using chimeric anti-CD38 antibody. **Blood**, v.77, p.1071-1079, 1991.
209. TALMADGE, J. E.; PHILLIPS, H.; SCHNEIDER, M. et al. Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor. **Cancer Res.**, v.48, p.544-550, 1988.
210. TAYLOR JR., A.; MILTON, W.; EYRE, H. et al. Radioimmunodetection of human melanoma with Indium-111-labeled monoclonal antibodies. **NCI Monogr.**, n.3, p.25-31, 1987.
211. TEMPERO, M. A.; SIVINSKI, C.; STEPLEWSKI, Z. et al. Phase II trial of interferon gamma and monoclonal antibody 17-1A in pancreatic cancer: biologic and clinical effects. **J. Clin. Oncol.**, v.8, p.2019-2026, 1990.
212. THOMPSON, C. H.; STACKER, S. A.; SALEHI, N. et al. Immunoscintigraphy for detection of lymph node metastases from breast cancer. **Lancet**, v.2, p.1245-1247, 1984.
213. THURIN, J. Binding sites of monoclonal anti-carbohydrate antibodies. **Curr. Top Microbiol. Immunol.**, v. 139, p. 59-79, 1988.
214. THURIN, J.; THURIN, M.; KIMOTO, Y. et al. Monoclonal antibody-defined correlations in melanoma between levels of GD2 and GD3 antigens and antibody-mediated cytotoxicity. **Cancer Res.**, v.47, p.1229-1233, 1987.
215. VADHAN-RAJ, S.; CORDON-CARDO, C.; CARSWELL, E. et al. Phase I trial of mouse monoclonal antibody against GD3 ganglioside in patients with melanoma: induction of inflammatory responses at tumor sites. **J. Clin. Oncol.**, v.6, p.1636-1648, 1988.
216. VILCEK, J.; GRESSER, J.; MERIGAN, T. C. Regulatory functions of interferons. **Ann. NY Sci.**, v. 350, p. 1-129, 1980.
217. VUIST, W. M.; BUITENEN, F. V.; HEKMAN, A. et al. Two distinct mechanisms of antitumor activity mediated by the combination of interleukin 2 and monoclonal antibodies. **Cancer Res.**, v.50, p.5767-5772, 1990.

218. WALDMANN, T. A.; GOLDMAN, C. K.; BONGIOVANNI, K. F. et al. Therapy of patients with human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia with anti-tac: a monoclonal antibody to the receptor for interleukin-2. **Blood**, v.72, p.1805-1816, 1988.
219. WALLACH, D.; FELLOUS, M.; REVEL, M. Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. **Nature**, v.299, p.833-835, 1982.
220. WAXMANN, A. D.; RAMANNA, L.; SAID, J. Thallium scintigraphy in lymphoma relationship to gallium-67. **J. Nucl. Med.**, v.30, p. 915, 1989.
221. WEBB, D. S.; GERRARD, T. L. IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  affect both monocytes and tumor cells to modulate monocyte mediated cytotoxicity. **J. Immunol.**, v.144, p.3643-3648, 1990.
222. WEINER, L. M.; STEPLEWSKI, Z.; KROPROWSKI, H. et al. Divergent dose-related effects of gamma-interferon therapy on in vitro antibody-dependent cellular and nonspecific cytotoxicity by human peripheral blood monocytes. **Cancer Res.**, v.48, p.1042-1046, 1988.
223. WELTE, K.; MILLER, G.; CHAPMAN, P. B. et al. Stimulation of T lymphocyte proliferation by monoclonal antibodies against G<sub>D3</sub> ganglioside. **J. Immunol.**, v.139, p.1763-1771, 1987.
224. WILKINSON, I.; JACKSON, C. C-J.; LAN, G. M. et al. Tolerance induction in mice by conjugates of monoclonal immunoglobulins and monomethoxypolyethylene glycol: transfer of tolerance by T cells and by T cell extracts. **J. Immunol.**, v.139, p.326-331, 1987.
225. WILSON, B. S.; IMAI, K.; NATALI, P. G. et al. Distribution and molecular characterization of a cell-surface and a cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies. **Int. J. Cancer**, v.28, p.293-300, 1981.
226. WOLF, R., FISCHER, J. Szintigraphische Untersuchungen mit <sup>197</sup>HgCl<sub>2</sub>, 45th Dtsch. Röntgenkongress, Wiesbaden 1964, G. Thieme, Stuttgart (1965) 57.



227. WORKMAN, P.; D'INCALCI, M.; BERDEL, W. E. et al. New approaches in cancer pharmacology: drug design and development. **Eur. J. Cancer**, v. 28, p. 1190-1200, 1992.
228. ZIAI, M. R.; IMBERTI, L.; NICOTRA, M. R. et al. Analysis with monoclonal antibodies of the molecular and cellular heterogeneity of human high molecular weight melanoma-associated antigen. **Cancer Res.**, v. 47, p. 2474-2480, 1987.
229. ZUCKIER, L. S.; RODRIGUEZ, L. D.; SCHARFF, M. D. Immunologic and pharmacologic concepts of monoclonal antibodies. **Sem. Nucl. Med.**, v.19, n.3, p.166-186, July 1989.

---

---

ANEXOS

---

---

## ANEXO I

### REATIVIDADE DE UMA SÉRIE DE ANTICORPOS EM CULTURAS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS (ELISA)

ANTICORPO	MELANOMA	ADENOCARCINOMA	CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS (PULMONARES)	LINFOMAS	FIBROSARCOMA
69115Nu4B	3/6	0/2	0/2	0/4	0/1
9-19-C126	0/6	0/2	1/2	1/4	0/1
15.75	6/6	2/2	0/2	0/4	0/1
376.96S	6/6	2/2	2/2	4/4	1/1
345.134	6/6	2/2	2/2	4/4	1/1
<b>225.28S</b>	<b>6/6</b>	<b>0/2</b>	<b>0/2</b>	<b>0/4</b>	<b>1/1</b>
118.1	5/6	0/2	1/2	0/4	1/1
436.G10	4/6	0/2	1/2	0/4	0/1
Me4-F8	4/6	0/2	0/2	3/4	1/1

Fonte: Hybridoma (1982)

ANEXO 2

**CONSENTIMENTO PARA EXAMES ESPECIAIS INVASIVOS, PROCESSOS  
DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICO**

Paciente: \_\_\_\_\_

Número de Registro: \_\_\_\_\_

Autorizo o Dr. \_\_\_\_\_ ou assistentes por ele designados a realizarem os seguintes procedimentos \_\_\_\_\_.  
A natureza e o propósito do procedimento, os métodos alternativos de diagnóstico e tratamento, riscos e a possibilidade de complicações já me foram explicados pelo Dr. \_\_\_\_\_ e eu declaro que nenhuma garantia me foi assegurada sobre os resultados.

Dou consentimento para realização dos procedimentos acima descritos.

Certifico que li todos os campos e os entendi perfeitamente.

Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

Testemunha: \_\_\_\_\_

(se for menor de idade, declare grau de parentesco e assine abaixo).

\_\_\_\_\_

### ANEXO 3

#### Dose absorvida (AcMc 22528S)

Segundo esquema de cálculo para dose absorvida publicado no suplemento número um (MIRD), após a injeção endovenosa do AcMc-Tc, um paciente de 70 kg teria a exposição mostrada abaixo:

ÓRGÃO	DOSE DE IRRADIAÇÃO	
	CGy/MBq	rads/mCi
Medula óssea	$9,63 \times 10^{-5}$	$3,56 \times 10^{-3}$
Rins	$3,22 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-1}$
Baço	$1,10 \times 10^{-3}$	$4,07 \times 10^{-2}$
Fígado	$2,25 \times 10^{-4}$	$8,33 \times 10^{-3}$
Ovário	$9,63 \times 10^{-5}$	$3,56 \times 10^{-3}$
Testículos	$9,63 \times 10^{-5}$	$3,56 \times 10^{-3}$
Corpo Inteiro	$1,18 \times 10^{-4}$	$4,35 \times 10^{-3}$

ANEXO 4

PERFORMANCE STATUS SCALE

STATUS	SCALES	STATUS
KARNOFSKY		ZUBROD-ECOG-WHO
Normal, no complaints	100	0 Normal activity
Able to carry on normal activities	90	1 Symptoms, but nearly ambulatory
Minor signs of symptoms of disease		
Normal activity with effort	80	
Cares for self. Unable to carry on normal activity or to do active work	70	2 Some bed time, but needs to be in bed less than 50% of normal daytime
Requires occasional assistance, but able to care for most of his needs	60	
Requires considerable assistance and frequent medical care	50	3 Needs to be in bed more than 50% of normal daytime
Disabled. Requires special care and assistance	40	
Severely disabled. Hospitalization indicated though death not imminent	30	4 Unable to get out of bed
Very sick. Hospitalization necessary. Active supportive treatment necessary	20	
Moribund	10	
Dead	0	