

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

EVANDRA LUCIA DA CRUZ SOUZA

**Caracterização de anticorpos anti-idiotípicos e anti-anti-idiotípicos de
BEVACIZUMAB**

Botucatu – SP

2011

EVANDRA LUCIA DA CRUZ SOUZA

**Caracterização de anticorpos anti-idiotípicos e anti-anti-idiotípicos de
BEVACIZUMAB**

Monografia apresentada junto ao curso de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu, como requisito para obtenção de título de Bacharel.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Zveiter de Moraes

Botucatu – SP

2011

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS.....	5
1. RESUMO	6
2. INTRODUÇÃO	8
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Animais	23
4.2. Preparo de soluções e tampões.....	23
4.3. Cultura celular	26
4.4. <i>Feeder Layer</i> de macrófagos.....	27
4.5. Congelamento e descongelamento celular.....	27
4.6. Purificação de anticorpos.....	28
4.7. Imunização de animais.....	28
4.8. Coleta de soro.....	29
4.9. Sacrifício dos animais.....	29
4.10. Fusão celular.....	29
4.11. Preparo dos animais para ascite.....	30
4.12. Biotinilação dos anticorpos.....	31
4.13. Ensaio de ligação dos MAbs AB2, 3.E3 e 10.D7 a células endoteliais.....	31
4.14. Ensaio de proliferação de células endoteliais.....	32
4.15. Análise por ELISA.....	32
4.16. Isotipagem dos anticorpos obtidos.....	33
4.17. SDS-PAGE.....	33
4.18. <i>Immunoblotting</i>	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1. Purificação dos anticorpos	35

5.2. Controle de purificação de MAbs 3.E3 e 10.D7.....	35
5.3. Biotinilação de anticorpos.....	32
5.4. <i>Immunoblotting</i>	37
5.5. Ensaio de ligação de MAbs AB2 a células endoteliais.....	38
5.6. Ensaio de proliferação de células endoteliais.....	39
5.7. Titulação dos soros dos animais imunizados com MAbs AB2.....	40
5.8. Ensaio de ligação de anticorpos purificados de animais imunizados com MAbs 10.D7 e 3.E3.....	41
5.9. Fusões realizadas.....	41
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO.....	47
8. REFERÊNCIAS.....	48

ÍNDICE DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS

Tabela 1.....	42
Figura 1.....	8
Figura 2.....	9
Figura 3.....	16
Figura 4.....	35
Figura 5.....	36
Figura 6.....	36
Figura 7.....	37
Figura 8a.....	37
Figura 8b.....	38
Figura 9.....	39
Figura 10.....	39
Figura 11.....	40
Figura 12.....	40
Figura 13.....	41

1. RESUMO

Propomos avaliar o potencial de uma abordagem imunoterápica que tem o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) como alvo. A angiogênese é necessária para nutrir o tumor e propicia sua metastatização. Sabe-se que VEGF é produzido pela maioria dos tumores sólidos metastatizantes. A eficiência do anticorpo anti-VEGF, BEVACIZUMAB, já foi demonstrada. Entretanto, efeitos adversos limitam sua utilização em alguns casos e, com base na teoria da rede idiotípica e na experiência do grupo com anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id ou AB2), anticorpos AB2 capazes de mimetizar VEGF foram obtidos. Assim, com o objetivo de explorar o *rationale*, dois anticorpos monoclonais (MAb) anti-Id de Bevacizumab, 10.D7 e 3.E3, foram produzidos em nosso laboratório. O controle da purificação de anticorpos foi feito através da avaliação do material purificado em géis de poliacrilamida. Immunoblots comprovaram a especificidade do reconhecimento do idiotipo de Bevacizumab pelos MAbs anti-Id. Foi mostrado que os AB2 obtidos se ligam a moléculas da superfície de células endoteliais, que expressam receptores de VEGF, sugerindo que esses anticorpos mimetizam VEGF. Entretanto, não foi possível verificar inibição do crescimento dessas células quando cultivadas em presença desses MAbs. Será necessária a otimização dos protocolos utilizados para uma avaliação mais definitiva.

Uma vez demonstrada a atividade anti-idiotípica dos AB2 *in vitro*, 10.D7 e 3.E3 foram utilizados como imunógenos em camundongos Balb/c, com o objetivo de avaliar a resposta AB3 ou anti-anti-Id. Por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto foi verificada a presença de anticorpos anti-anti-Id ligantes de VEGF nos soros dos camundongos imunizados. Os animais imunizados com o MAb 10.D7 responderam

melhor do que os imunizados com 3.E3. Anticorpos IgG purificados dos soros desses animais reconheceram VEGF em ensaios imunoenzimáticos.

Foram então selecionados os animais que melhor responderam para realização de experimentos de fusão celular e obtenção de MAbs anti-anti-Id ligantes de VEGF. Cinco experimentos de fusão celular foram realizados. Dois híbridos secretores de anticorpo monoclonal mantiveram-se estáveis em cultura, porém após três meses de cultivo perderam especificidade para o antígeno original.

2. INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico utilizado para representar um conjunto de mais de 100 doenças⁹ e configura-se como um grande problema de saúde pública. É uma doença genética⁶ resultante de um acúmulo de mutações no genoma das células, que podem chegar até 11 mil alterações⁶. É chamado também de neoplasia³⁹ (do grego *neo*: novo; *plase*: formação) maligna, originária do crescimento celular desordenado e independente de fatores de crescimento, com características infiltrantes, atingindo vasos sanguíneos e podendo instalar-se em tecidos diferentes daquele em que teve início a patologia, originando metástases.

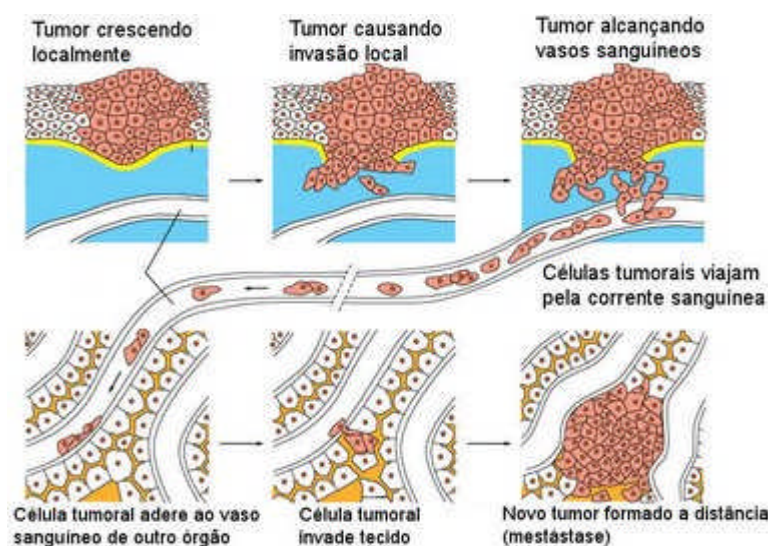


Figura 1: Desenho do processo de proliferação celular e metástase. Fonte: <http://www.mdsaude.com/2009/02/cancer-cancro-sintomas.html>

As células normais estão sob influência de programação herdável através do genoma (DNA, *deoxyribonucleic acid*) e do seu grau de diferenciação e especialização. A Homeostasia Celular é a capacidade de manutenção do microambiente celular interno constante e independente das alterações do microambiente externo. É mantida através da membrana celular (barreira física) ou de componentes intracelulares que, ao menor

sinal de perturbação, permitem a restauração do equilíbrio original¹⁰. Diante de um desbalanço celular, como lesão no código genético (DNA), mecanismos de auto-destruição celular são ativados e a célula defeituosa é eliminada e, muitas vezes, substituída. A indução de apoptose, por exemplo, evita que células com defeitos no DNA possam se replicar de maneira errônea.

As células estão constantemente expostas a perturbações e, quando há evasão dos sistemas de controle apoptótico, células anômalas (vide figura 2) podem proliferar-se indefinidamente, sintetizando proteínas com perda ou ganho funcional. A carcinogênese, portanto, tem três fases⁶:

- Iniciação;
- Promoção;
- Progressão.

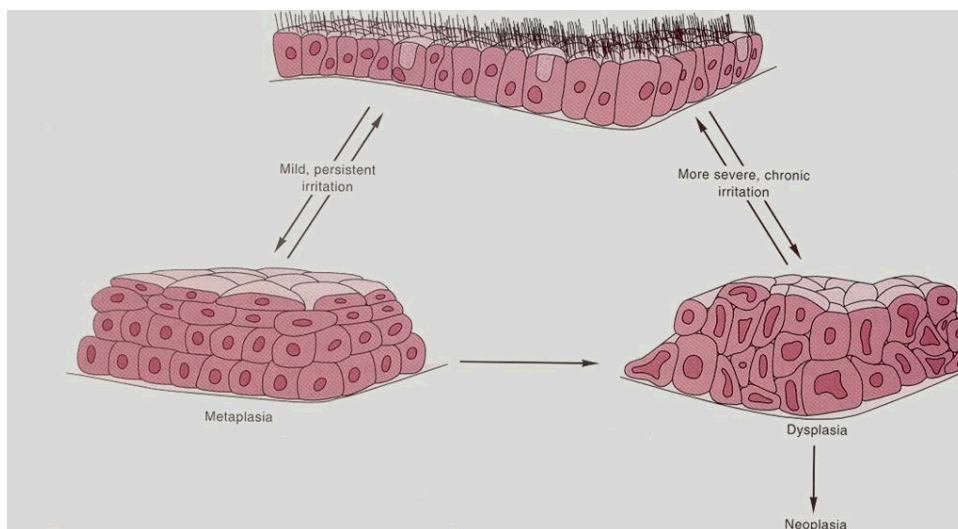


Figura 2: Desenho esquemático de diferenciação celular anormal. As células neoplásicas passam por traumas que podem ser (e são, na sua maioria) irreversíveis. A sequência de eventos celulares passa pela célula normal, metaplasia, displasia e neoplasia (Fonte: Blog de informações médicas: saúde on. <http://saude-on.blogspot.com/2011/08/neoplasias-e-o-cancro-cancer-parte-1.html>).

Uma célula é chamada neoplásica quando adquire:

1. perda do controle da proliferação e divisão celular, multiplicando-se de maneira desordenada;

2. imortalização celular, através da ativação da enzima telomerase que, em condições normais, está ativa somente nos gametas e em células do embrião;
3. alterações cromossômicas, o que pode envolver modificação na conformação dos cromossomos e do seu número nas células;
4. perda das propriedades adesivas da membrana plasmática que, enquanto funcionantes, permitem o reconhecimento entre células e participam do controle proliferativo;
5. perda da função e da capacidade celular em se especializar e se diferenciar.
6. capacidade de romper matrizes de diversos tecidos e realizar metástases.
7. capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, processo chamado de angiogênese⁶.

Estatísticas

Há 16 anos o Instituto Nacional do Câncer (INCA) realiza estimativas de novos casos de câncer no Brasil. O perfil epidemiológico da doença requer análise e dados detalhados, tais como, sua incidência, tipos mais comuns em determinada população, entre outros, que possam estabelecer direcionamento de políticas públicas governamentais adequadas¹⁰.

O INCA afirma que, no Brasil, mais de 500 mil novos casos da doença surgirão no ano de 2012. Esses números divulgados para marcar o Dia Nacional do Combate ao Câncer, dia 27 de novembro, têm como objetivo contribuir para a elaboração de políticas públicas na área, voltadas para a população¹¹. Dados da *American Society of Cancer* relatam que metade da população masculina e um terço da feminina dos Estados Unidos desenvolverão este tipo de patologia durante a vida²⁰.

Doenças crônico-degenerativas, como é o caso do câncer, têm aumentado sua incidência devido ao envelhecimento populacional. Melhores condições básicas de

saúde e educação, envolvendo esclarecimento sobre a doença, têm contribuído para aumentar a expectativa de vida da população¹⁰, pois tem sido maior a aderência às ações preventivas, como prática de exercícios, diminuição do consumo de álcool e tabaco, entre outros.

Imunologia tumoral

O sistema imunológico, através de mecanismos diversos, tem a função de distinguir moléculas próprias daquelas estranhas ao organismo²⁹, ajudando no combate a infecções por patógenos e combate às células tumorais. Evidências demonstram que indivíduos imunodeficientes têm maior suscetibilidade a tumores⁴⁸.

Assim, tumores expressam moléculas que podem ser reconhecidas pelo sistema imune. Essas moléculas, com frequência, são produzidas na gênese tumoral. Muitos antígenos tumorais são produtos de oncogenes que sofreram mutações ou transformações. A destruição de células pelo sistema imune antes delas se transformarem em células tumorais é chamada de Vigilância Imunológica^{1,48}. O estudo desse e de outros mecanismos, bem como a procura de antígenos tumorais ou associados a tumor, são exemplos de algumas linhas de pesquisas para combate e controle de tumores.

Mecanismos de rejeição tumoral podem ser mediados por linfócitos T citotóxicos (CTLs) que reconhecem epítomos tumorais associados ao MHC (*major histocompatibility complex*) de classe I, que estão presentes em todas as células nucleadas (passíveis de se transformarem em cancerígenas). Porém, as células tumorais diminuem ou deixam de expressar moléculas de MHC. Células T CD8 ativadas também necessitam de um segundo sinal, ligação a moléculas co-estimulatórias, para que sua resposta seja eficiente e essas moléculas também têm sua expressão alterada em células tumorais¹.

Um dos problemas que compromete a resposta imune contra tumores é o fato de alguns antígenos tumorais terem sido expressos durante a vida embrionária ou serem derivados de pequenas modificações de antígenos próprios, o que os torna moléculas pouco imunogênicas. Na verdade, existem muitos trabalhos descritos que mostram as inúmeras possibilidades e mecanismos utilizados pelos tumores para evadir da resposta imune²⁹.

Pensando na fisiologia do sistema imune, abordagens imunológicas vêm sendo estudadas, as chamadas imunoterapias. O objetivo é utilizar os conceitos imunológicos para estimular a resposta do próprio hospedeiro contra tumores, seja através de vacinação ou de moléculas de anticorpo que possam direcionar o tratamento para células cancerígenas, aumentando o efeito de outros tratamentos antineoplásicos .

Tratamento

O tratamento do câncer se dá por uma ou várias abordagens combinadas. O melhor tratamento é definido de acordo com o tipo, estágio, órgão acometido e condições do paciente⁴⁷. O tratamento eficaz do câncer deve visar não somente o tumor primário, mas também os tumores que podem ter se disseminado para outras partes do corpo, as chamadas metástases³⁴.

Alguns termos são utilizados por pesquisadores para classificar a resposta de um indivíduo a determinado tratamento³⁴:

1. Resposta completa: remissão completa do câncer, desaparecendo todas as evidências da doença;
2. Resposta parcial: redução de um ou mais tumores em mais de 50%;
3. Tempo de sobrevida livre da doença: intervalo entre o desaparecimento completo e a reincidência do câncer;
4. Tempo total de sobrevida: intervalo entre a resposta completa até a morte.

As respostas a um determinado tratamento variam. Dependem do tipo de tumor, do estágio da doença, entre outros fatores. Os medicamentos também podem selecionar células resistentes, fazendo com que a terapia seja ineficaz. Como a célula cancerígena agrega inúmeras mutações genéticas, uma ou algumas delas podem conferir resistência ao tratamento.

As terapias convencionais são:

- Cirurgia

Este método era o único método utilizado até o surgimento da quimioterapia e radioterapia. Na cirurgia há a retirada do tumor por ressecção. A primeira alusão à cirurgia para o tratamento do câncer data de 1600 a. C³⁴.

Dependendo do tamanho e do tipo do tumor, a cirurgia ainda é muito indicada e muito eficaz, apesar de ser um procedimento com riscos cirúrgicos.

- Radioterapia

A radioterapia atinge células que proliferam rapidamente e células cancerosas têm essa característica. O direcionamento e a definição do campo a ser irradiado ajudam a diminuir o dano a células normais e células altamente oxigenadas são alvos mais susceptíveis.

- Quimioterapia

Utiliza medicamentos que têm como alvo moléculas necessárias aos processos biológicos celulares, portanto, em princípio, também atingem as células com alta taxa de proliferação. Os medicamentos antineoplásicos, ou quimioterápicos, são agrupados em categorias: agentes alquilantes, antimetabólitos, alcalóides vegetais, antibióticos antitumorais, enzimas, hormônios e modificadores da resposta biológica³⁴. Frequentemente, dois ou mais medicamentos são usados em combinação. A base racional da quimioterapia combinada é utilizar medicamentos que atuam em diferentes

fases dos processos metabólicos da célula, aumentando dessa forma a probabilidade de destruição de uma maior quantidade de células cancerosas. Pode haver tratamento onde o químico atue no DNA e outro, no RNA, por exemplo. Essa associação de medicamentos visa diminuir a proliferação celular.

- **Imunoterapias**

A grande maioria das terapias imunológicas visa destruir a célula tumoral a partir do reconhecimento de marcadores tumorais presentes na superfície da célula tumoral. Apesar da identificação de antígenos associados a tumor e da demonstração de eficiência de algumas dessas abordagens em modelos animais, elas ainda são de utilidade clínica restrita. Isto, em parte, porque as células tumorais desenvolvem mecanismos de escape do sistema imune, como, por exemplo, a produção de substâncias imunossupressoras, diminuição da expressão de moléculas de MHC e co-estimulatórias³⁵. Contudo, a imunoterapia pode ser direcionada e usada concomitantemente com outros tipos de tratamento.

Angiogênese

A angiogênese é o brotamento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existent¹⁶. É um processo biológico fundamental para reprodução, desenvolvimento e reparo tecidual¹⁷.

São três os passos principais para a promoção da angiogênese²:

1. degradação da membrana basal com formação de um botão vascular;
2. migração de células endoteliais;
3. formação e maturação de vasos.

A mudança do fenótipo angiogênico envolve uma mudança no equilíbrio local entre fatores indutores e não-indutores do crescimento dos microvasos¹⁷.

Além de promover a nutrição, a angiogênese é uma via importante para a disseminação e metastatização dos tumores. Uma abordagem alternativa para impedir o crescimento de tumor baseia-se no bloqueio da formação de vasos sanguíneos, preciosos para o crescimento tumoral.

Por meses ou anos um tumor pode se manter *in situ* sem a necessidade de novos vasos para se nutrir, realizando seus processos metabólicos através de difusão. Nessa fase pré-vascular um tumor não passa de 2-3 mm³. Para um volume maior de células a nutrição por difusão torna-se insuficiente e, para manutenção do crescimento tumoral, essas células adquirem o fenótipo angiogênico, favorecendo a nutrição, a proliferação celular e o aumento do volume tumoral²³. Portanto, a neovascularização é necessária para a progressão tumoral e sua metastatização. Esse estudo e o estudo de fatores químicos necessários para a ocorrência de angiogênese têm ampliado o entendimento dos processos patológicos, abrindo novos caminhos para o tratamento de tumores²³.

A relação entre angiogênese e crescimento tumoral é complexa. Sabe-se que a hipóxia tumoral está associada à metástase²⁴, angiogênese²³ e resistência de tumores tanto à radiação como a alguns agentes quimioterápicos⁵⁶.

A figura 3, extraída de revisão recente feita por Ria e colaboradores, ilustra a importância da angiogênese no crescimento e progressão tumoral⁴⁴. Dentre os vários fatores descritos, destaca-se a família do fator de crescimento de endotélio VEGF⁴¹ (*vascular endothelial growth factor*).

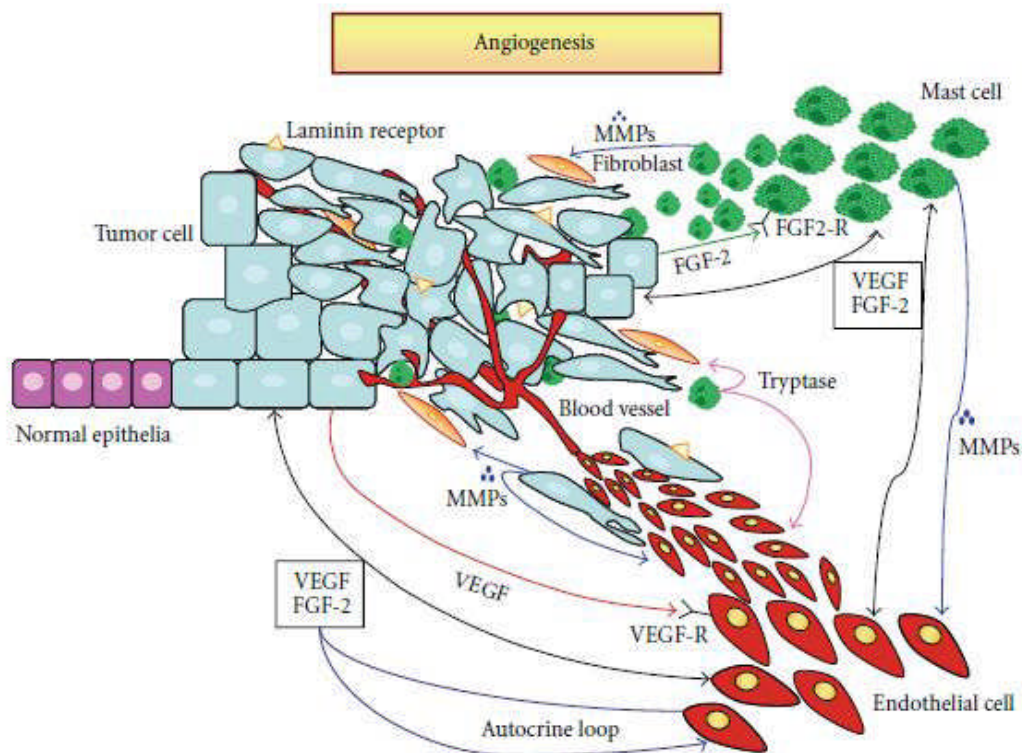


FIGURE 1

Figura 3: Influência de diversas moléculas na angiogênese tumoral e metástases. Resumidamente, o fator de crescimento endotelial (VEGF) produzido pelas células de tumores sólidos estimula as células endoteliais a produzirem novos vasos; o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) é liberado e ativado quando as metaloproteinases (MMPs) degradam a matriz extracelular; MMPs induzem também o aumento da densidade microvascular e a desdiferenciação e atipia celulares; expressão de receptores de laminina favorece a invasão de vasos e a metastatização tumoral; a inflamação local é fator importante para aumentar o potencial angiogênico e metastático através da produção de MMPs pelos mastócitos, que também são alvos da ação de FGF-2 e VEGF⁴⁴.

VEGF

Um dos fatores reguladores do surgimento de novos vasos é o VEGF produzido na embriogênese¹² e em grande quantidade pelos tumores sólidos^{8,24}.

Quando J. Folkman e colaboradores¹⁶, em 1971, propuseram que a inibição da angiogênese poderia ser uma estratégia efetiva para o tratamento do câncer, iniciaram-se as buscas por indutores ou inibidores de neovascularização.

O VEGF-A, também referido apenas como VEGF, é o principal fator na angiogênese e o membro da família de fatores de crescimento do endotélio vascular mais bem estudado. É uma glicoproteína de 42-46 kD, homodimérica e ligante de

heparina⁵¹. A proteína de 165 aminoácidos é a isoforma predominante e expressa em grande quantidade em tumores sólidos²⁴.

Tumores que crescem rapidamente geram um microambiente de hipóxia, o que estimula a produção de VEGF. O VEGF derivado das células cancerosas, por sua vez, estimula a expressão dos receptores VEGFR1²² e VEGFR2⁴⁹. VEGFR2 é um receptor que medeia a mitogênese de célula endotelial, aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos circunvizinhos ao tumor e funciona como fator anti-apoptótico para vasos sanguíneos recém formados⁴⁹. Sabe-se que o VEGF é expresso e secretado em grande quantidade por células de quase todos os tumores sólidos metastatizantes²³. Portanto, dentre as propostas anti-angiogênicas mais exploradas, destacam-se aquelas que utilizam anticorpos anti-VEGF-A.

Rede idiotípica

De acordo com a teoria da rede idiotípica²⁸, a imunização com um dado antígeno induz a produção de anticorpos, que podem ser chamados de AB1, contra esse antígeno. Esses anticorpos possuem propriedades moleculares próprias que são reconhecidas como estranhas pelo próprio sistema imune de quem o produz. Essas características compõem o idiotipo (Id), que contém o sítio de ligação ao antígeno e é o marcador da molécula do anticorpo dentro do repertório de anticorpos de um indivíduo. Assim podem ser gerados anticorpos contra AB1 denominados anticorpos AB2 ou anti-Id.

Algumas das moléculas AB2 mimetizam efetivamente a estrutura tridimensional do antígeno original porque contêm a imagem interna de um epítipo do antígeno reconhecido por AB1. Dessa forma, os anticorpos AB2 induzem respostas imunes anti-anti-Id (AB3), que podem apresentar especificidade similar àquela induzida pelo antígeno nominal.

Didaticamente, o sistema imune responde à presença de moléculas que não são próprias e a resposta a um antígeno resulta no aumento de um determinado anticorpo da rede (anticorpos esses com características químicas específicas, como foi dito acima), causando uma perturbação na homeostase do sistema. O aumento do primeiro anticorpo, AB1, leva a um aumento de AB2, na tentativa de restaurar o equilíbrio do sistema. A partir da compreensão de que o sistema pode ser mantido por meio de interações idiotipo-anti-idiotipo, percebe-se que um anti-idiotipo contém a imagem interna do antígeno reconhecido pelo AB1. Se o antígeno é reconhecido por AB1 e este por AB2, AB2 pode apresentar uma estrutura espacial similar a do Ag e é conseqüentemente uma imagem interna de um epítipo do antígeno em questão¹⁵.

De fato, imunização com AB2 pôde induzir resposta imune específica para o antígeno original em diferentes modelos como, por exemplo, gp120 do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida⁵², antígeno HBsAg do vírus da hepatite B⁵⁵, antígeno de alto peso molecular associado ao melanoma humano¹⁴, entre outros. Em câncer, destacam-se os resultados clínicos obtidos em câncer de pulmão de célula pequena³⁸, adenocarcinoma de cólon⁵⁵ e de ovário⁴³. Foon e colaboradores¹⁹ mostraram que a vacinação com AB2, após ressecção do tumor, além de não causar qualquer efeito adverso importante, estimulou respostas humoral e celular contra o antígeno nominal em 32 pacientes estudados. A avaliação da eficiência de um anticorpo anti-Id, capaz de mimetizar antígeno de carcinoma ovariano, mostrou aumento significativo na sobrevivência dos pacientes que responderam à imunização com AB2. A sobrevivência média de 4,9 meses nos pacientes não-respondedores passou a ser de 23,4 meses entre os pacientes capazes de produzir AB3⁴³.

Em nosso meio, tal estratégia mostrou-se eficiente no modelo do antígeno carcinoembrionário (CEA), onde foi observado produção de anticorpos AB3 em

camundongos imunizados com anticorpos AB2³⁶. Os anticorpos AB3 foram capazes de reconhecer CEA *in vitro* e *in vivo* e com afinidade comparável a de AB1³⁷. Posteriormente, construiu-se o fragmento variável de cadeia única (scFv, do inglês *single chain fragment variable*) de AB2, que manteve suas características. E a imunização genética com essa nova forma do anticorpo AB2 permitiu a obtenção de resposta AB3, que reconheceu cortes histológicos de diferentes tipos de tumores que expressavam CEA⁴⁰. Utilizando essa mesma estratégia, foram obtidos resultados interessantes no modelo do antígeno GD3 de melanoma humano⁴². Nesse estudo, onde o antígeno é fracamente imunogênico e estimula uma resposta imune independente de célula T, a imunização com AB1 levou à produção de AB2 e AB3, muitos deles de isotipo IgG, e o estudo de um dos AB3 obtidos mostrou que o anticorpo AB3 é capaz de retardar crescimento de tumor *in vivo*.

Rede idiotípica e anticorpo monoclonal anti-hVEGF

Em 1993, Kim e colaboradores³⁰ mostraram, pela primeira vez, que a administração sistêmica de anticorpo monoclonal anti-hVEGF (anti-VEGF humano) inibiu metástase e crescimento de tumor humano transplantado em camundongos *nude*. Posteriormente, em estudo mais amplo, Asano e col.⁴ observaram que injeções intravenosas repetidas de anticorpo anti-VEGF inibem crescimento de uma variedade de linhagens de células derivadas de tumores humanos. O VEGF participa da angiogênese em tumores de cólon, pulmão, mama, próstata, pâncreas, carcinomas ovarianos e melanomas⁴ e, também, em neoplasias hematológicas²¹. Isso significa que um mesmo medicamento anti-angiogênico pode ser útil no tratamento de diferentes tipos de câncer.

Os resultados obtidos a partir de abordagens anti-angiogênicas são encorajadores em vários modelos tumorais^{7,8,45,50}. O bloqueio da atividade de VEGF, através do uso de anticorpos, interfere na biologia e sobrevivência da célula tumoral. Os estudos nessa

direção permitiram a elaboração de estratégias que hoje estão incluídas em protocolos de tratamento de alguns cânceres⁵⁶ e, por isso, têm merecido investimentos consideráveis. A novidade trazida por esse tipo de abordagem é a possibilidade de interferência na biologia da célula tumoral, de forma indireta e independente dos mecanismos de escape responsáveis pela sobrevivência e expansão do tumor.

Trabalhos mais recentes têm mostrado a utilização do anticorpo anti-VEGF também em terapias de manutenção conhecidas como tratamentos metronômicos. Esses protocolos utilizam administrações frequentes e contínuas de quimioterápicos em doses baixas combinadas com anticorpos inibidores de angiogênese²³.

Alguns anticorpos anti-VEGF já provaram ser eficientes em protocolos clínicos e encontram-se disponíveis comercialmente^{16,41,8,25,33}. O anticorpo BEVACIZUMAB (rhuMAb-VEGF, Avastin[®], Genentech/Roche) é o exemplo mais bem sucedido disponível atualmente^{8,25,27}. Esse anticorpo foi produzido em camundongo e depois humanizado para ser utilizado em humanos.

Sabe-se hoje que o BEVACIZUMAB apresenta uma atividade antitumoral sinérgica com quimioterápicos citotóxicos tanto em modelo animal como em ensaios clínicos, tendo sido aprovado em 2004 pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) como tratamento de primeira linha, em combinação com 5-fluorouracil, para pacientes com câncer de cólon metastático^{22,26}.

Estudos clínicos em fase III mostraram depois que a associação de BEVACIZUMAB com quimioterapia produz efeitos notáveis de aumento da sobrevida de pacientes portadores de tumores de cólon²⁶. Protocolos clínicos de associação de BEVACIZUMAB com outras drogas têm sido testados desde então. Como exemplo, tem-se: associação com Interferon- α para tratamento de carcinoma de células renais

metastáticas⁴⁶, com 5-fluoracil, irinotecan e leucovorin para câncer de coloretal metastático, com gemcitabina e cisplatina para câncer de pulmão³⁸.

O acompanhamento desses estudos mostrou depois que o uso do BEVACIZUMAB pode trazer alguns efeitos colaterais como, por exemplo, episódios hipertensivos⁵⁵ e hemorrágicos²¹, que limitam sua utilização. Em julho de 2010 o FDA anunciou que o BEVACIZUMAB apresentou baixos benefícios clínicos para o tratamento de câncer de mama. O tratamento com BEVACIZUMAB associado à terapia quimioterápica convencional foi considerado desfavorável, nesses casos. Embora tenha sido demonstrado um pequeno aumento na expectativa de vida dos pacientes submetidos ao tratamento, as taxas de efeitos adversos foram consideradas altas pelo estudo¹⁸. Isto aponta cada vez mais para a necessidade de pesquisas e buscas por novos reagentes que possam exercer atividade anti-angiogênica com menos efeitos colaterais.

Assim, propusemos a imunização com anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id ou AB2) que mimetizem o fator angiogênico VEGF. Embora o fator angiogênico seja uma molécula própria e, portanto, não reconhecida como estranha pelo sistema imune, um anticorpo anti-Id pode mimetizar um epitopo do fator, apresentando-o ao sistema imune num contexto diferente e capaz de induzir uma resposta imune anti-anti-idiotípica (AB3) que poderá inibir a angiogênese e, conseqüentemente, o crescimento tumoral.

O presente trabalho é parte de um estudo maior, onde se pretende avaliar a utilidade da imunização com anticorpos AB2, que mimetizam VEGF, com a finalidade de prevenir metástases. Assim, para começar, animais foram imunizados com AB2. Os que produziram uma resposta humoral capaz de reconhecer VEGF são objetos de interesse para avaliação da estratégia. Nessa monografia, buscamos caracterizar os anticorpos AB2 e a resposta AB3.

3. OBJETIVO

- Avaliação da atividade anti-idiotípica dos anticorpos AB2 de BEVACIZUMAB obtidos.
- Avaliação da resposta anti-anti-idiotípica produzida pós-imunização com AB2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos Balb/c fêmeos foram utilizados nas imunizações, na produção de ascite e no preparo de *Feeder Layer* de macrófagos. Os animais foram obtidos do Instituto Nacional de Farmacologia (Infar) e do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME), ambos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Todos os experimentos foram executados de acordo com as normas do *NIH-Guidelines* para o cuidado e manuseio de animais de laboratório, e aprovados pelo Comitê de Ética da UNIFESP (CEP 2076/09).

4.2 Preparo de soluções e tampões

4.2.1 Solução para congelamento das células

Meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, *St. Louis, MO, USA*) (células de mieloma murino e dos hibridomas estabelecidos) ou meio F12 (Sigma-Aldrich) (células endoteliais) com 10% DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich) e 50% SFB (soro fetal bovino) (Gibco BRL, *Grand Island, NY, USA*).

4.2.2 Solução para congelamento de hibridomas obtidos

Meio HAT (Sigma-Aldrich) (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) ou meio HT (Hipoxantina e Timidina) com 10% DMSO (Sigma-Aldrich) e 50% SFB.

4.2.3 Meio que seleciona células de mieloma sensíveis ao meio HAT e HT

8 – Azaguanina (2-Amino-6hydroxy-8-azapurine) (Sigma-Aldrich): 132 μ M em RPMI.

4.2.4 Tampão fosfato salina (PBS)

Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ a 10 mM, NaCl e KCl a 150 mM pH 7,4 .

4.2.5 Soluções e tampões para purificação de anticorpos

Tampão de ligação - tampão fosfato: fosfato de sódio monobásico e bibásico 20 mM, pH 7,0.

Tampão de eluição: Glicina-HCl 0,1 M pH 2,6.

Tampão de neutralização: Tris-HCl 1 M pH 9,0.

Solução de Bradford: 1 parte de reagente Bradford (Sigma-Aldrich) para 4 partes de H₂O MilliQ[®].

4.2.6 Reagentes e tampões para preparação do imunógeno (Anticorpo conjugado a KLH)

Tampão fosfato 0,1 M pH 7,5.

KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) (Sigma-Aldrich): 5mg de KLH em 1 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,5.

Glutaraldeído: 0,02% (v/v).

4.2.7 Reagentes e tampões para ensaio imunoenzimático (ELISA)

Tampão de bloqueio: PBS contendo 1 % (p/v) de BSA.

Tampão de lavagem: PBS contendo 0,01% (v/v) de Tween (Sigma-Aldrich).

Tampão de diluição para anticorpos: PBS contendo 0,1% (p/v) de BSA.

Solução de parada: H₂SO₄ 4N.

Tampão para OPD (*o-phelyldiamine*) (Sigma-Aldrich): ácido cítrico 0,1 M e fosfato bibásico 0,1 M pH 5,0.

4.2.8 Reagente para fusão celular

PEG⁵³ (polietilenoglicol; PM 3000-3700) (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, USA ou Sigma-Aldrich): na concentração 45,5% (v/v) contendo 5% (v/v) de DMSO.

4.2.9 Anestésico para animais

Cloridrato de ketamina: 32,8 mg/kg.

Cloridrato de xilazina: 63,3 mg/kg.

4.2.10 Reagente para preparo da cavidade abdominal na obtenção de ascite

Pristane (2,6,10,14 – tetrametilpentadecane).

4.2.11 Reagentes para o ensaio de ligação de MAbs AB2 a células endoteliais

Tampão de bloqueio: PBS contendo 3 % (p/v) de BSA.

Tampão de diluição para anticorpos: PBS contendo 0,1% (p/v) de BSA.

Glicina: glicina-PBS 0,1M.

Streptavidina-FITC (Sigma-Aldrich).

4.2.12 SDS-PAGE

Tampão de corrida (concentrado 5X): tris a 0,123 M; glicina a 0,96 M; SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,5% completar com H₂O MilliQ para 1 L.

Tampão de amostra redutor (concentrado 5X): 5 ml de glicerol; 1g de SDS; β -mercaptoethanol 2,56 ml; 2,13 ml de solução 0,5 M Tris-HCl com SDS a 0,4% (pH 6,8); traços de Azul de bromo fenol.

Tampão de amostra não redutor (concentrado 5X): 5 ml de glicerol 1g de SDS; 2,13 ml de solução 0,5 M Tris-HCl com SDS a 0,4%(pH 6,8); traços de Azul de bromo fenol.

Gel de separação: 3,5 ml de solução 1,5 M Tris-HCl com SDS a 0,4% (pH 8,3); 4,65 ml de solução de acrilamida a 30% e bisacrilamida a 0,8%; 50 µl de solução APS (persulfato de amônio) 10%; 11,5 µl de TEMED; 6,15 ml de H₂O MilliQ.

Gel de empilhamento: 2,5 ml de solução 0,5 M Tris-HCl com SDS a 0,4% (pH 6,8); 1,0 ml de solução de acrilamida a 30% e bisacrilamida a 0,8%; 100 µl de solução APS (persulfato de amônio) 10%; 10 µl de TEMED; 6,4 ml de H₂O MilliQ.

Solução corante: metanol 50%; ácido acético glacial 10% Coomassie blue brilhante 0,25%.

Solução descorante: metanol 15%; ácido acético glacial 10%.

4.2.13 Immunoblotting

Solução de transferência: 3,03g de Tris; 14,4 g de glicina; 100 ml de metanol; H₂O MilliQ q.s.p. 1L, pH 9,0.

Solução corante de *Ponceau* (Sigma-Aldrich): 0,5g de *Ponceau*; 5% de ácido tricloroacético.

4.3 Cultura celular

Preparo de meio de cultura R10 utilizado para a linhagem celular de mieloma, sp2/0.Ag14(sp2)²² (ATCC): RPMI 1640, suplementado com 10% SFB, 2mM L-Glutamina e 10mM HEPES, bicarbonato de sódio 24 mM, 40µg/ml de sulfato de gentamicina, 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol.

Preparo do meio de cultura HAT e HT utilizado para seleção e clonagem de híbridos: HAT, concentração final de 100 µM de Hipoxantina, 16

μM de Timidina e $0,4 \mu\text{M}$ de Aminopterina e HT, $100 \mu\text{M}$ de Hipoxantina e $16 \mu\text{M}$ de Timidina. Aos meios HAT e HT foram acrescentados 20% e 10% de SFB, respectivamente.

Preparo do meio de cultura para as linhagens de células endoteliais ECV⁵⁴ e CIPs¹³ (ambas gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Helena B. Nader do Departamento de Bioquímica da UNIFESP): meio F12, suplementado com 10% SFB, 2mM L-Glutamina e 10mM HEPES, 1,176g de bicarbonato de sódio e $40\mu\text{g/ml}$ de sulfato de gentamicina.

4.4 Feeder Layer de macrófagos

A *feeder-layer*, ou camada de sustentação, constituída predominantemente de células mononucleares, foi obtida assepticamente através de lavado peritoneal de camundongos BALB/c com meio RPMI gelado. As células obtidas foram diluídas ($2,4 \times 10^4$ células/ml) em meio completo e distribuídas em placas de 96 ou 24 poços (Sigma-Aldrich) e em garrafas de cultura de 25 cm^2 (Sigma-Aldrich). As placas de 96 poços com *feeder layer* foram empregadas durante a clonagem e as demais placas e garrafas na expansão de híbridos.

4.5 Congelamento e descongelamento celular

O congelamento foi realizado removendo-se as células dos frascos de cultura e ressuspensando 1 a 2×10^6 células em 1 ml do meio de congelamento. Em tubos apropriados, as células são armazenadas a -70°C por ao menos 24 horas e, posteriormente, transferidas para botijões contendo nitrogênio líquido.

O descongelamento foi feito rapidamente em banho-maria. Imediatamente depois, as células foram transferidas para o tubo ao qual foram adicionados lentamente 9 ml de meio de cultura. Após a centrifugação a $200 \times g$ por 5 minutos, as células foram ressuspensas no meio de cultura apropriado e cultivadas em garrafas de 25 cm^2 .

4.6 Purificação dos anticorpos

Os anticorpos utilizados, AB2 (10D7 e 3E3) e anti-anti-idiotípicos policlonal, foram purificados por meio de cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-Proteína G 4 Fast /flow (GE Healthcare Bio-Science, Upsalla, Sweden), a partir de líquido ascítico ou de soro de animais imunizados, respectivamente. Dois mililitros de líquido ascítico ou soro foram diluídos em 15 ml de tampão de ligação. Após centrifugação por 10 minutos a 200 x g, o sobrenadante foi passado em microfiltros descartáveis com membrana de poro de 45 µm (*Millipore Corporation, Billerica, MA, USA*). O material então foi aplicado à coluna, previamente equilibrada com tampão de ligação. A seguir, a coluna foi lavada e o anticorpo foi eluído da coluna com o tampão de eluição. Frações de 1 ml foram coletadas em tubos contendo 45µl de tampão de neutralização. Solução de Bradford foi utilizada para identificação dos picos de eluição. A concentração proteica foi determinada através da leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 280nm por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). O cálculo da concentração proteica foi feito dividindo-se o valor obtido na leitura espectrofotométrica pelo coeficiente de extinção molar da imunoglobulina de camundongo que é igual a 1,4. Os anticorpos purificados foram a seguir dialisados contra PBS (duas trocas) a frio³², aliquotados e estocados a -20°C.

4.7 Imunização dos animais

Grupos de cinco ou dez camundongos BALB/c fêmeas, com dois meses de idade, foram imunizados com AB2 (10D7 e 3E3) conjugado ao KLH. A conjugação foi realizada após a purificação do AB2. Brevemente, 4,8mg de 10.D7 ou 3.E3 purificados foram dissolvidos em 4,8ml de tampão fosfato pH 7,5, o mesmo utilizado para diluição de KLH. Em seguida, lentamente e sob agitação, adicionaram-se 4,0 ml de solução de

glutaraldeído. Após a incubação de 1 hora à temperatura ambiente (T. A.), o material conjugado foi dialisado contra PBS a 4°C. Os camundongos foram então imunizados. Na primeira imunização foram injetados 100µg do AB2-KLH, incorporado ao adjuvante completo de Freund, via subcutânea em quatro sítios (inguinais e axilares). Após 21 dias novas imunizações foram feitas em intervalos de aproximadamente 15 dias, sendo que, a partir da segunda imunização, AB2-KLH foi incorporado ao adjuvante incompleto de Freund.

4.8 Coleta de soro

O sangue dos animais foi coletado, pós-anestesia, através de punção do plexo retro-orbital com auxílio de pipeta Pasteur de vidro. O soro foi obtido após permanência do material coletado a 4°C por 15 minutos e centrifugação a 200 x g, em centrífuga eppendorff (*Centrifuge 5424*, Eppendorf). Os soros foram então armazenados a -20°C até o momento da análise.

4.9 Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados por *overdose* de anestésico. Em média, 350µl de anestésico foram injetados via intramuscular (i.m.) nos flancos direito e esquerdo dos animais.

4.10 Fusão celular

O animal foi sacrificado de acordo com painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association*⁵. O baço do animal sacrificado foi retirado cuidadosamente em ambiente estéril para ser utilizado na fusão.

Células de mieloma murino (aproximadamente $3,5 \times 10^7$ células) foram previamente tratadas com solução 8-azaguanina (diluída em meio R10 para atingir a molaridade mencionada no item 5.2.3, por uma semana, para garantir a sensibilidade ao

HAT. Após esse procedimento as células de mieloma foram expandidas, contadas e utilizadas na fusão após a verificação da sua viabilidade.

Os esplenócitos foram liberados delicadamente do baço do animal sacrificado com auxílio de agulhas e pinças e colocados em contato com células de mieloma. A suspensão contendo os dois tipos celulares foi então centrifugada a 200 x g para a remoção do sobrenadante. Para a fusão celular, foi adicionado 1 ml da solução de PEG (PM 3000-3700)⁵³ cuidadosamente pipetado gota a gota por 1 minuto. A diluição do PEG adicionado às células em 20 ml de RPMI com gentamicina seguiu-se em intervalos preestabelecidos que duraram, no total, 2 minutos. Após esse período, foram adicionados mais 30 ml do mesmo RPMI e 5 minutos as células foram centrifugadas por 10 minutos a 200 x g. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* ressuspense em 100 ml de HAT. A suspensão foi distribuída em 10 placas de cultura de 96 poços contendo *feeder layer* de macrófagos, preparadas 48 horas antes do dia da fusão. Depois de 15 dias foi feita a varredura dos hibridomas. Os poços positivos para a presença de anticorpos ligantes de VEGF foram expandidos e clonados por diluição limitante. As placas de clonagens foram testadas aproximadamente 15 dias depois para a pesquisa dos poços contendo hibridoma monoclonal secretor de anticorpo ligante de VEGF. Dois hibridomas positivos de cada placa de clonagem foram expandidos, congelados e mantidos em botijões de nitrogênio líquido.

4.11 Preparação dos animais para ascite

Injeções intraperitoneais (i.p.) de 0,5ml de Pristane foram administradas em 10 camundongos Balb/c dois dias antes da inoculação das células dos hibridomas monoclonais (AB3). As células de hibridomas AB3 foram contadas e 2×10^6 células ressuspensas em PBS foram injetadas por animal.

4.12 Biotinilação dos anticorpos

De uma solução de Avastin[®] frio a 5mg/ml foram utilizados 200 µl, aos quais foram adicionados 800 µl de PBS para atingir uma solução com 1mg/ml de anticorpo para ser biotinilado. O Avastin[®] foi biotinilado utilizando sulfosuccinimidobiotina (*Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA*) solubilizada em água. A mistura foi mantida sob agitação, por 4 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, a mistura foi aplicada à coluna PD-10 (Sephadex G-25, GE), para separação do anticorpo ligado à biotina da biotina livre (cromatografia de filtração em gel). A eluição do anticorpo foi feita com PBS.

4.13 Ensaio de ligação dos MAbs AB2, 3.E3 e 10.D7, a células endoteliais

Foram plaqueadas 10^4 células ECV⁵⁴ e CIPs¹³ em poços de placas de 96 poços, contendo lamínulas e meio F12. As placas foram mantidas por 18 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após a verificação de aderência das células às lamínulas, aspirou-se o meio, as lamínulas foram lavadas com PBS e, em seguida, tratadas por 20 minutos a T.A. com paraformaldeído 4% para fixação das células. Depois, glicina 0,1M foi adicionada às lamínulas para o bloqueio dos grupos aldeídicos do paraformaldeído. Após 10 minutos, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS e incubadas com BSA 3% por uma hora à T.A. Os MAbs 3.E3 e 10.D7 foram adicionados em seguida (10µg/ml diluídos em BSA 0,1%) e incubados por 1h em estufa a 37°C. Novas lavagens com PBS se seguiram antes da incubação por 40 minutos a 37°C com anticorpo anti-IgG de camundongo biotinilado (1:1000 em BSA 0,1%). Seguiram-se novas lavagens com PBS, como já descrito e incubação por 20 minutos com o reagente streptavidina-FITC diluído 1:500 em BSA 0,1%. Novas lavagens com PBS foram feitas antes da aplicação de 4µl de glicerol para montagem das lâminas. As lâminas foram então analisadas por microscopia confocal (Zeiss[®], ZEEN LSM 780).

4.14 Ensaio de proliferação de células endoteliais

Foram plaqueadas 2×10^3 células, ECV ou CIPs, por poço em 2 placas de cultura contendo 96 poços (uma placa para cada tipo celular). Anticorpos foram adicionados às culturas. Foram feitas quadruplicatas de diferentes concentrações dos anticorpos a serem testados (50 μ g/ml; 25 μ g/ml e 12,5 μ g/ml). Incubamos os MAbs anti-Ids, VEGF (controle positivo), dois MAbs irrelevantes (controles negativos) nas mesmas concentrações dos anti-Ids e sobrenadante de cultura do clone anti-anti-Id 2.H10, obtido na terceira fusão e cultivado na ausência de SFB. Poços contendo células aos quais foram adicionados SDS 100mM serviram como controle de viabilidade mínima do ensaio e poços contendo células com meio F12 sem SFB, como controle de viabilidade máxima. Os anticorpos a serem testados foram diluídos em 100 μ l de meio F12 sem SFB. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa com 5%CO₂. Após esse período, 20 μ l de MTT (Sigma-Aldrich) (marcador de atividade mitocondrial) por poço foram adicionados. As placas foram incubadas por mais 4 horas na mesma estufa. Os sobrenadantes das culturas foram então removidos e 100 microlitros de DMSO foram adicionados em cada poço. Após 15 minutos de agitação em agitador de placas (*multishaker* FMS2, Daigger), o ensaio foi analisado em espectrofotômetro, comprimento de onda 570 nm (EL808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, INC).

4.15 Análise por ELISA

Poços de placas de poliestireno foram sensibilizados com 50 μ l de hVEGF (50 ng/ml). Em seguida, foi feito o bloqueio dos sítios ativos remanescentes do plástico com tampão de bloqueio por uma hora à T.A.. Foram depois adicionadas as diluições dos soros dos animais imunizados com AB2 e a placa incubada a 37°C por 2 horas. Três lavagens foram feitas com tampão de lavagem. O anticorpo anti-IgG de camundongo

conjugado à biotina (EZ Link™ Sulfo-NHS-Biotin) foi adicionado aos poços na diluição 1:5000 e incubado a 37°C por 90 minutos. Mais lavagens se seguiram como as descritas antes da incubação com Streptavidina-Peroxidase (Sigma-Aldrich) por 30 minutos à T.A.. Após três lavagens, como já descrito, a revelação foi feita com OPD e a densidade óptica (D.O) da reação colorimétrica foi medida em comprimento de onda de 492 nm, em espectrofotômetro (EL808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, INC). Esse ensaio foi realizado para análise da presença de anticorpos ligantes de VEGF nos soros dos animais imunizados e na varredura dos hibridomas. Para o ELISA de inibição o procedimento foi, após bloqueio como já descrito, a incubação dos MAb AB2 (3.E3 e 10.D7) juntamente com o anticorpo BEVACIZUMAB biotilado por 4 horas a 4°C. Seguiram-se lavagens e incubação com estreptavidina-peroxidase, como já descrito.

4.16 Isotipagem dos anticorpos obtidos

A identificação da subclasse dos anticorpos obtidos em fusão celular, 2.B9 e 2.H10, foi realizada utilizando-se o *kit* de isotipagem da Pierce (*Pierce® Rapid isotyping kit with Kappa and Lambda – Mouse*), de acordo com instruções do fabricante.

4.17 SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi utilizada para separação e análise de proteínas purificadas. O procedimento foi realizado seguindo o protocolo de Laemmli³¹ em um gel de 10% de acrilamida/bis-acrilamida e as concentrações dos anticorpos utilizadas foram: 5 µg/ml para os AB2, 10D7 ou 3E3, e para o Avastin.

4.18 Immunoblotting

Preparações proteicas separadas em géis de SDS-PAGE (Avastin) foram transferidas para membrana de transferência de PVDF (Thermo Scientific). A

transferência foi realizada com amperagem constante de 0,8 mA por 1 hora. Em seguida, a membrana foi corada com solução *Ponceau* para observação das bandas transferidas. O bloqueio foi realizado com solução de leite em pó desnatado a 5%, *overnight* à 4°C. A incubação com os MAbs a 2µg/ml (3E3, 10D7 e controle de isotipo) foi realizada por 2 horas à T.A. sob agitação constante. Foram realizadas lavagens (3 vezes) com PBS-Tween 0,1% antes e após a incubação. O anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo marcado com biotina, foi incubado na concentração de 1:10000 em BSA 0,1% e permaneceu sob agitação por 1 hora à T.A.. Lavagens foram feitas idem às anteriores e as membranas incubadas com streptavidina-peroxidase a 1:1000 por 30 minutos. Novas lavagens foram feitas e, em seguida, o ensaio foi revelado com DAB (diaminobenzidina) na proporção 5mg DAB: 50 ml PBS: 100 µl de H₂O₂.

5. RESULTADOS

5.1 Purificação dos anticorpos

Os MAb AB2 foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose proteína G, como já descrito em Materiais e Métodos. Na figura 4 é mostrado o perfil de eluição de um dos anticorpos, monitorado pela adição do reagente de Bradford a amostras dos tubos contendo o material eluído.

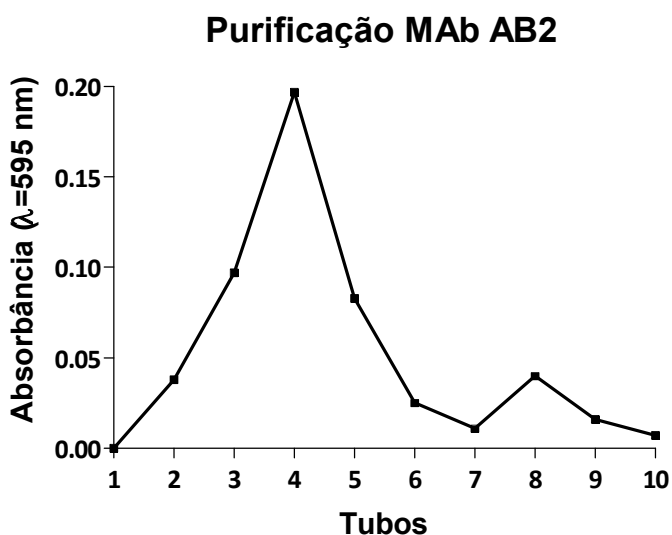


Figura 4: Purificação de anticorpo por cromatografia de afinidade: monitoramento da eluição de anticorpo monoclonal de coluna de sepharose-proteína G.

5.2 Controle de purificação de MAb 3.E3 e 10.D7

Géis de poliacrilamida 10% foram feitos para controle de purificação dos MAb AB2. Os MAb AB2, purificados a partir de líquido ascítico, foram tratados com tampão de amostra redutor (colunas 2 e 3, MAb 3.E3 e 4 e 5, MAb 10.D7 da figura 5) e com tampão de amostra não redutor (colunas 8 e 9 com MAb 3.E3 e 10.D7, respectivamente, figura 5). Quando na forma reduzida, podem-se ver duas bandas, correspondentes às cadeias pesadas e leves dos anticorpos e, na forma não reduzida, uma banda própria do anticorpo na forma nativa.

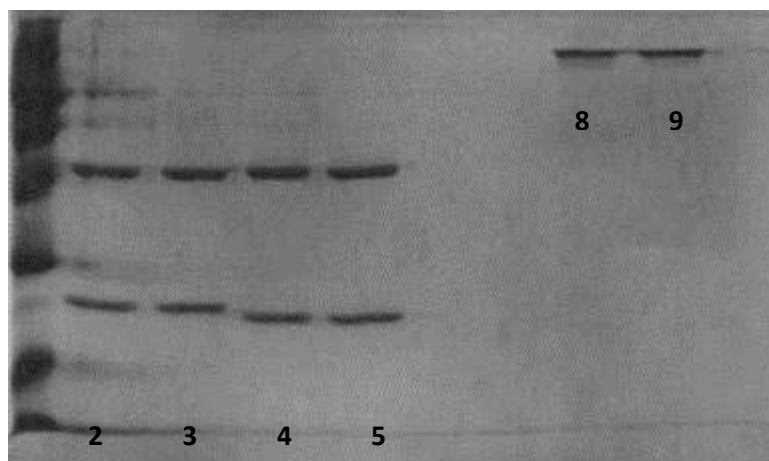


Figura 5: Verificam-se no gel as bandas das cadeias pesadas e leves com aproximadamente 50 kDa e 25 kDa, respectivamente, na preparação dos anticorpos com tampão de amostra redutor (colunas 2 e 3, MAb 3.E3 e colunas 4 e 5, MAb 10.D7). Nas preparações com tampão de amostra não redutor, colunas 8 e 9, verifica-se a presença de uma única banda, correspondente aos anticorpos 10.D7 e 3.E3 na forma nativa, com aproximadamente 150 kDa.

5.3 Biotinilação de anticorpos

A biotinilação dos anticorpos foi realizada como descrito em Material e Métodos. A leitura no espectrofotômetro ($\lambda=280$ nm) mostrou qual tubo continha o anticorpo biotilado, após cromatografia de gel filtração para separar o anticorpo marcado da biotina livre (figura 6). A titulação do anticorpo marcado permitiu definir a diluição de 1:1000, 1 μ g/ml, como sendo a ideal para utilização nos ensaios. Avastin foi utilizado em ELISA de inibição.

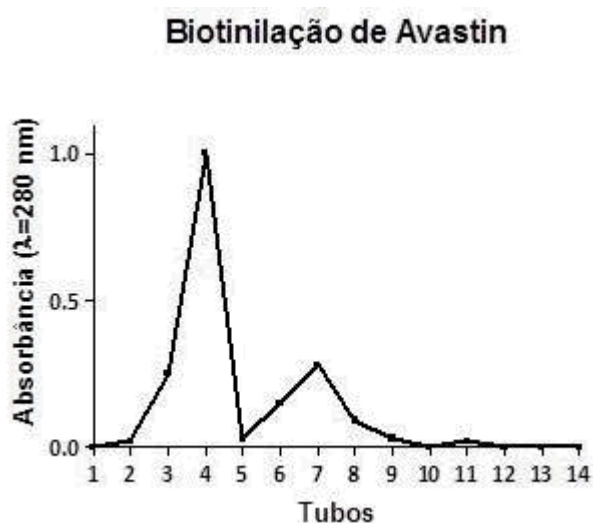


Figura 6: Cromatografia de gel filtração em coluna de sephadex G25M: o tubo número 4 é o que contém o anticorpo biotilado, enquanto o segundo pico corresponde à biotina livre.

A cada purificação foi verificada a capacidade dos anticorpos AB2 inibirem a ligação do Bevacizumab biotilado ao VEGF através do ELISA de inibição, como mostrado na figura 7.

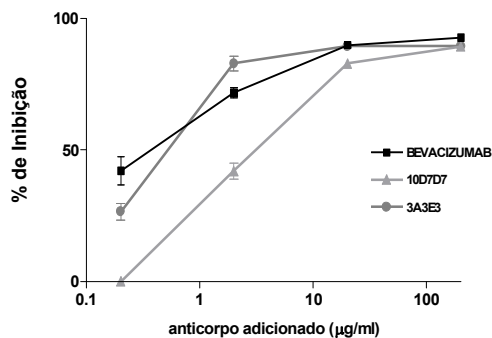


Figura 7: Curvas de inibição de ligação de Bevacizumab-biotina ao VEGF por diferentes concentrações dos anticorpos anti-idiotipo de Bevacizumab purificados. Inibição pelo Bevacizumab não marcado serviu como controle da reação.

5.4 Immunoblotting

Avastin, na forma reduzida e não reduzida, é mostrado no gel SDS-PAGE 10% (figura 8a). Avastin, em um gel como esse, foi transferido para membrana de PVDF para realização de *immunoblotting*.

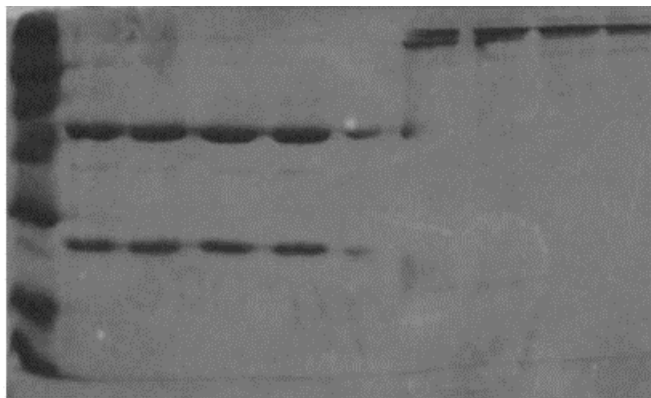


Figura 8a: Avastin em tampão de amostra redutor e não redutor em gel SDS-PAGE. Nas linhas de 2 a 5 cadeias pesadas e leves do Avastin e nas linhas 7 a 10 Avastin na forma nativa.

Após transferência para a membrana de PVDF, tiras foram cortadas. Tiras com o Avastin reduzido e não reduzido foram incubadas com 3.E3, 10.D7 e anticorpo irrelevante. Foram também usadas como controle tiras incubadas com o anticorpo anti-

IgG murina conjugado à biotina. Como mostrado na figura 5b os anticorpos AB2 reconheceram apenas o Avastin não reduzido.

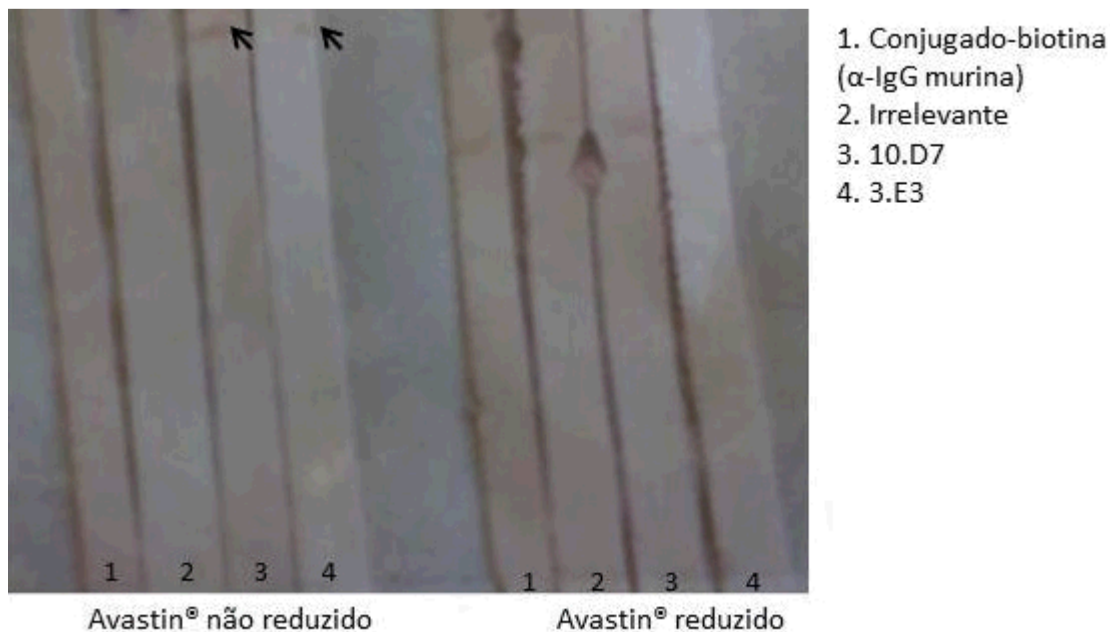


Figura 8b: Nas tiras 3 e 4 pode-se observar uma banda em torno de 150 kDa, correspondente ao anticorpo Avastin® na forma nativa, reconhecida pelos anticorpos 10.D7 e 3.E3. Essa banda não aparece nas tiras incubadas com conjugado biotilado e anticorpo irrelevante, 1 e 2 respectivamente. Da mesma forma nenhum reconhecimento específico pode ser observado nas tiras contendo o anticorpo Avastin® na forma reduzida.

5.5 Ensaio de ligação de MAbs AB2 a células endoteliais

Como descrito em Materiais e Métodos, foram plaqueadas 2×10^4 células, ECV ou CIPs, por lamínula, que depois foram incubadas com os anticorpos AB2, 10.D7 e 3.E3. Após lavagens, as lâminas foram tratadas com anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com FITC. A análise realizada demonstrou ligação dos anticorpos 3.E3 e 10.D7 a moléculas presentes na superfície das células endoteliais. Anticorpo irrelevante foi utilizado como controle negativo (figura 9).

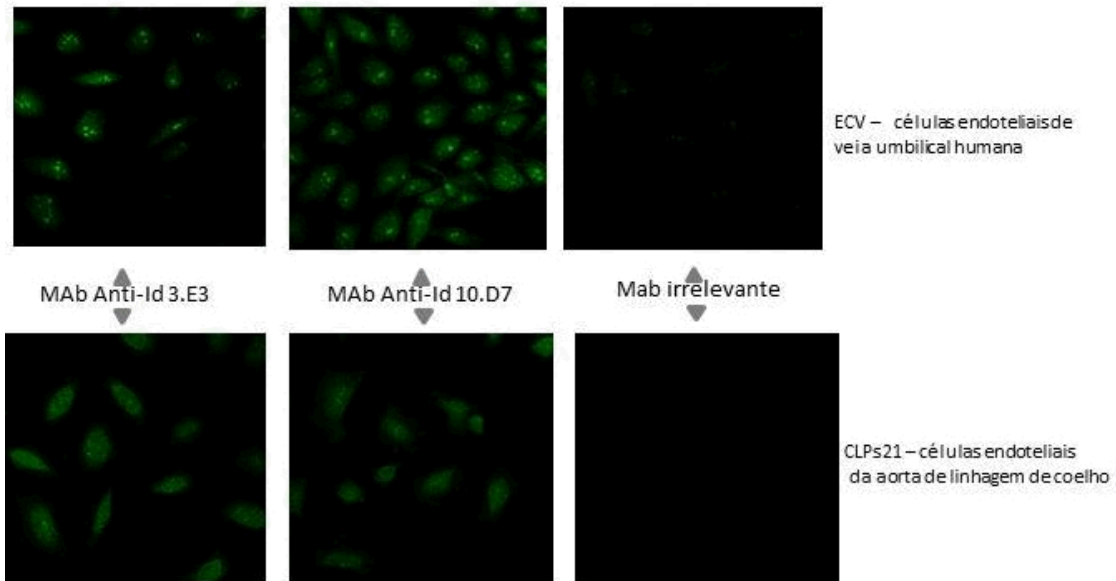


Figura 9: Ligação dos MAb anti-Id de BEVACIZUMAB a moléculas presentes superfície nas células endoteliais.

5.6 Ensaio de proliferação de células endoteliais

Células endoteliais CIPs¹³ e ECV⁵⁴ cultivadas em presença de anticorpos AB2 não apresentaram diferença na taxa de crescimento quando comparadas com células cultivadas em presença de anticorpo irrelevante (figura 10).

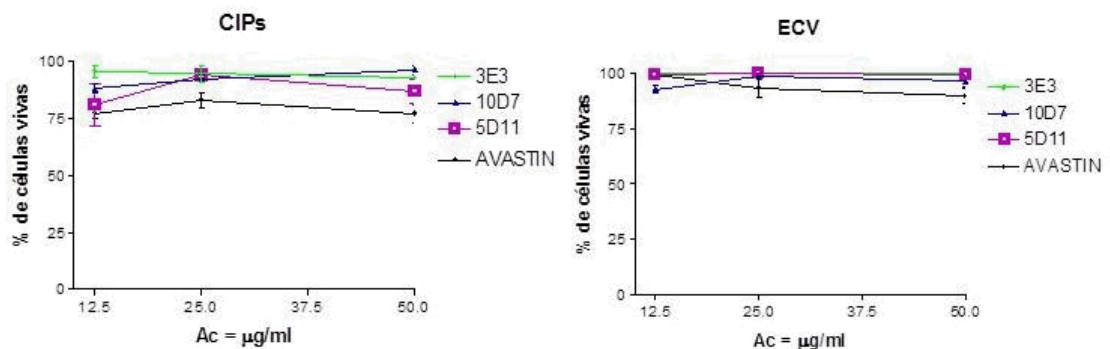


Figura 10: Os dados não demonstram diferença de crescimento quando as células são cultivadas em presença de anticorpos anti-Id.

5.7 Titulação dos soros dos animais imunizados com MABs AB2

Por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto foi verificada a presença de anticorpos anti-anti-Id ligantes de VEGF nos soros dos camundongos imunizados com 3.E3 e 10.D7, individualmente (figura 11).

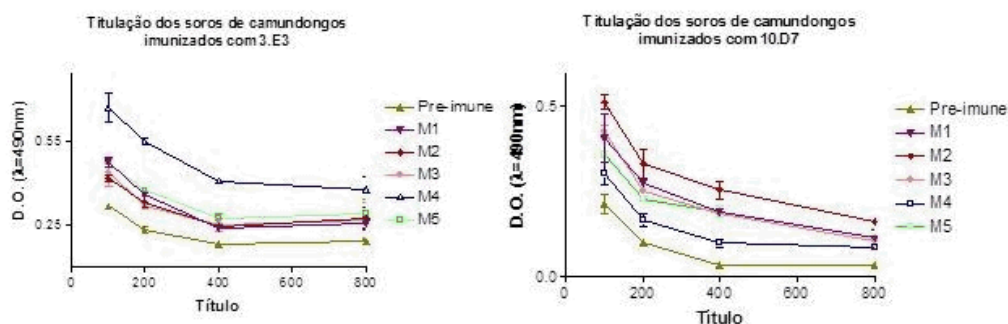


Figura 11: Titulação de soros dos animais imunizados com MABs anti-Id, conjugados a KLH, após a quarta imunização. Soros de animais pre-imunes foram utilizados como controle negativo.

Novos grupos (n=10) de camundongos foram imunizados com AB2 (10.D7 ou 3.E3). Os soros desses animais foram titulados e, posteriormente, serviram de fonte para purificação de IgG para obtenção de anticorpos policlonais ligantes de VEGF (figura 12).

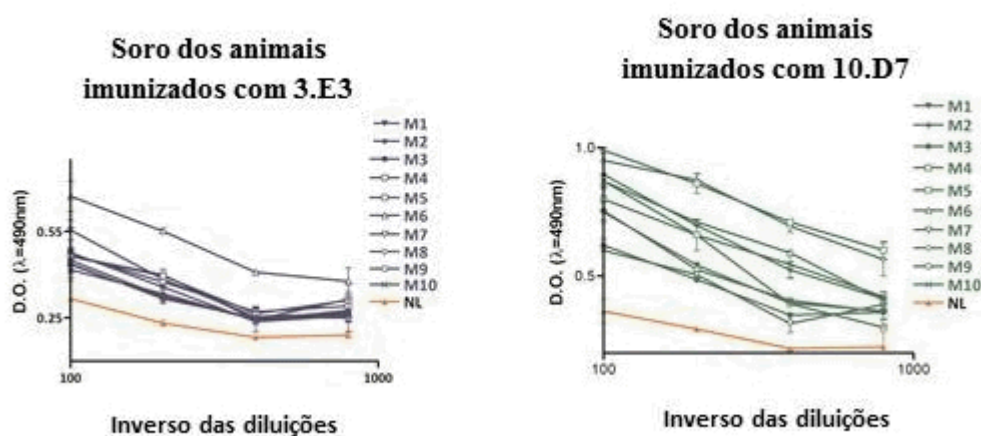


Figura 12: Titulação dos soros dos animais imunizados. Três imunizações foram realizadas e 10 dias depois da última imunização os soros foram analisados por ELISA indireto. Soros pre-imunes serviram como controle negativo (NL).

5.8 Ensaio de ligação dos anticorpos purificados de animais imunizados com MAbs 10.D7 e 3.E3

Anticorpos IgG policlonal, purificados a partir de soros dos animais imunizados com MAbs 10.D7 ou 3.E3, foram submetidos ao ensaio de ELISA indireto. Soros de animais pré-ímmunes foram utilizados como controle (figura 13).



Figura 13: Os dados indicam que há presença de anticorpos ligantes de VEGF nos soros dos animais imunizados (com 10.D7, n=10 e com 3.E3, n=10). IgG purificada de soros dos animais pré-ímmunes (n=20) foi utilizada como controle. Pode-se verificar ainda que o grupo imunizado com o MAb 10D7 respondeu melhor do que o imunizado com 3.E3.

5.9 Fusões realizadas

Foram selecionados os animais que melhor responderam às imunizações (figura 11), para os experimentos de fusão celular: dois camundongos do grupo (n=5) imunizado com 3.E3 e três do grupo (n=5) imunizado com 10.D7 para os experimentos de fusão celular. Como mostrado na Tabela 1, no primeiro, houve um crescimento de híbridos de 90,2% dos poços de placas de cultura onde foram distribuídas as células submetidas ao procedimento de fusão celular. Desses, apenas 0,8% reconheceu fracamente o VEGF e nenhum hibridoma se manteve estável em cultura. No segundo experimento, o crescimento de híbridos de 76,1 % resultou em apenas 2,2% de clones positivos, que reconheceram o antígeno original com intensidade moderada e, também desta fusão nenhum híbrido permaneceu estável em cultura. No terceiro, o crescimento

foi de 41% com 2,5 % de clones positivos que reconheceram VEGF com intensidade moderada ou alta e, destes, dois hibridomas se mantiveram estáveis em cultura. Esses hibridomas foram congelados e descongelados para posterior expansão, produção de ascite e purificação de seus anticorpos. No quarto e quinto experimentos de fusão também não foram obtidos hibridomas positivos estáveis em cultura. Os dois hibridomas monoclonais resultantes da terceira fusão perderam atividade de reconhecimento do VEGF.

Tabela 1: Fusões realizadas.

Fusão	Animal/ imunógeno	% de poços positivos para a presença de hibridoma	Nº de poços positivos para anticorpos ligantes de VEGF	Nº de hibridomas positivos para anticorpos ligantes de VEGF estáveis em cultura	Isotipagem
1ª	3.E3	90,18	6	0	-
2ª	3.E3	76,14	16	0	-
3ª	10.D7	41,04	10	2	IgG1
4ª	10.D7	18,50	1	0	-
5ª	10.D7	17,29	4	0	-

6. DISCUSSÃO

O câncer é uma doença genética que envolve mais de 100 tipos de doenças⁹. Multiplicação independente de estímulos e fatores de crescimento, bem como refratariedade aos mecanismos de controle do crescimento e ciclo celular³ são fatores importantes para a caracterização de uma célula neoplásica³⁹. Outro fator preponderante é a angiogênese ou a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, que são importantes para a nutrição tumoral^{6,16}.

O envelhecimento populacional é um dos fatores que contribui para o aumento dos casos de câncer, levando os órgãos públicos a implementar políticas que incentivem a prevenção, tratamento e pesquisas científicas que estudam a patologia^{9,10,11}. No campo das pesquisas, uma das estratégias que tem sido explorada é o estudo de moléculas biológicas que participam da propagação do câncer. O fator de crescimento do endotélio vascular, VEGF, está incluído nessa categoria.

Envolvido na angiogênese, tanto em condições fisiológicas como patológicas, sabe-se hoje que o VEGF é expresso e secretado por quase todos os tumores sólidos^{12,16,17,41,44}.

Com base na teoria da rede idiotípica²⁸, objetivamos nesse trabalho caracterizar anticorpos anti-idiotípicos (AB2) e anti-anti-idiotípicos (AB3) do anticorpo BEVACIZUMAB ou Avastin[®]. Esse anticorpo, produzido em camundongo e depois humanizado⁴, está disponível comercialmente^{16,41,8,25,33} e tem sido utilizado em protocolos já estabelecidos para o tratamento de alguns cânceres^{8,25,27}. Apesar disso, são descritos efeitos colaterais^{55,21} que limitam sua utilização. Isto aponta para a necessidade de pesquisas e buscas por novos reagentes que possam exercer atividade anti-angiogênica com menos efeitos colaterais.

Assim, propusemos o estudo da utilização de anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id ou AB2), que mimetizem o fator angiogênico VEGF, como imunógeno. Dependendo da eficiência da estratégia, esse anticorpo poderá ser, no futuro, utilizado como tratamento adjuvante de terapias convencionais, visando impedir o reaparecimento de metástases.

Para isso, fizemos a caracterização *in vitro* de dois anticorpos monoclonais anti-Id ou AB2, 10.D7 e 3.E3, obtidos anteriormente e *in vivo* buscamos avaliar a resposta anti-anti-Id ou AB3 obtida após imunização com os anticorpos AB2.

O primeiro passo então foi a purificação dos anticorpos AB2 por cromatografia de afinidade em Proteína G-Sepharose (figura 4). O controle da purificação dos AB2, 3.E3 e 10.D7, foi feito através da avaliação da corrida eletroforética do material purificado em géis de poliacrilamida 10%, como mostrado na figura 5. A capacidade de inibir a ligação de Avastin biotilado ao VEGF foi confirmada, como mostrado na figura 7. A atividade anti-idiotípica dos AB2 foi depois testada através de *Immunoblotting*. Para isso, anticorpo Avastin tratado com tampão de amostra redutor e não-redutor foi aplicado em gel de poliacrilamida 10% (figura 8a) e transferido para membranas de PVDF que, em seguida, foram tratadas com os anticorpos AB2 e controles. Anticorpos AB2 só se ligaram às fitas que apresentavam Avastin na forma não reduzida, pois o idiotipo é formado pelas porções variáveis das cadeias leves e pesadas de imunoglobulina. Assim só as tiras contendo o anticorpo não reduzido continham o epítipo idiotípico “íntegro” a ser reconhecido (figura 8b).

Após comprovada a qualidade da purificação dos MAbs AB2, bem como sua atividade inicialmente descrita, novos ensaios foram realizados para demonstrar a atividade anti-Id dos anticorpos obtidos. ECV⁵⁴ e CIP¹³, linhagens de células endoteliais, que sabidamente expressam receptores de VEGF (VEGFR1 e VEGFR2), foram utilizadas. Essas células foram tratadas com os anticorpos anti-Id de

BEVACIZUMAB e depois analisadas em microscopia confocal, que mostrou que tanto 3.E3 quanto 10.D7 se ligaram a moléculas presentes na superfície das células endoteliais. Anticorpo irrelevante de mesmo isotipo foi utilizado como controle (figura 9). Os anticorpos não mostraram atividade de inibição de crescimento das células endoteliais (figura 10). Há a necessidade de novos ensaios com modificações no protocolo, como maior tempo de incubação dos anticorpos com as células endoteliais, incubação com diferentes concentrações dos anticorpos, adição de VEGF às culturas, por exemplo, para avaliarmos se os resultados são realmente negativos como mostrado na figura 10.

Finalmente, a caracterização da atividade anti-idiotípica se completa quando verificamos se a utilização de AB2 como imunógeno leva à produção de uma resposta imune anti-anti-idiotípica capaz de reconhecer o antígeno original. Animais foram imunizados com anticorpo purificado conjugado a KLH e, posteriormente, os soros destes animais foram titulados. O ensaio imunoenzimático indireto, utilizando placas sensibilizadas com VEGF, comprovou a presença de anticorpos ligantes de VEGF no soro destes animais (figura 11).

Mais dois grupos de 10 animais foram imunizados (figura 12) com um ou outro AB2 para permitir purificar uma quantidade suficiente de IgG que pudesse permitir avaliar a resposta humoral anti-anti-Id nesses animais. Para isso, os *pools* de soros dos animais de cada um dos dois grupos foram passados em colunas de sepharose-Proteína G e os anticorpos eluídos quantificados e testados em ensaio imunoenzimático indireto. A figura 13 mostra a ligação desses anticorpos ao VEGF. Como controle negativo foi utilizada IgG purificada de soros de animais pré-ímmes. Os gráficos mostram que o MAb 10.D7 induz uma resposta anti-anti-Id ligante de VEGF melhor do que a induzida pelo MAb 3.E3.

Os animais mais responsivos ao protocolo de imunização (figura 11) foram depois utilizados em experimentos de fusão celular para obtenção de MAb AB3. Cinco experimentos foram realizados. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos. Somente dois hibridomas secretores de anticorpos monoclonais AB3 puderam ser isolados e se mantiveram estáveis em cultura. Mas depois de três meses, esses hibridomas perderam atividade. Como pode ser observado na tabela 2, a eficiência das fusões diminuiu ao longo das tentativas feitas. Pelo menos dois pontos foram levantados para explicar essa perda de desempenho: a mudança de lote do reagente de fusão utilizado e o número de imunizações realizadas – a partir da quarta imunização os animais apresentaram queda nos títulos de anticorpos. O fato é que se a eficiência de fusão das células diminui, caem as chances de híbridos secretores de anticorpos de interesse serem encontrados. Assim, novas tentativas deverão ser feitas, com algumas modificações no protocolo de imunização e avaliação de outros lotes de PEG.

Para finalizar, o conjunto dos resultados mostra que os anticorpos AB2, de alguma forma, mimetizam VEGF, induzem resposta de anticorpos anti-anti-Id ligantes de VEGF e novas fusões, utilizando apenas animais imunizados com o MAb 10.D7, deverão ser feitas para obtenção de anticorpos monoclonais anti-anti-Id que permitirão melhor caracterização do modelo.

7. CONCLUSÕES

1 – Ambos MAbs AB2, 3.E3 e 10.D7, reconhecem epítipo idiótipo no Avastin.

2 – Ambos MAbs AB2, 3.E3 e 10.D7, reconhecem moléculas presentes na superfície de células endoteliais.

3 – Tanto MAb 3.E3 quanto MAb 10.D7 mimetizam VEGF e quando usados como imunógeno podem induzir a produção de anticorpos ligantes de VEGF.

4 – O MAb 10.D7 induz resposta mais eficiente de anticorpos AB3 ligantes de VEGF.

8. REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Básica – Funções e distúrbios do sistema imunológico*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p.195-9.
2. Angiogênese. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Angiog%C3%AAnese>. Acesso em 20/Dezembro/2011.
3. Answer.com. Cell homeostasis. <http://www.answers.com/topic/cell-homeostasis-1>. Acesso em: 10/Dezembro/2011.
4. Asano M, Yukita A, Suzuki H. (1999) Wide spectrum of antitumor activity of a neutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor. *Jpn J Cancer Res*. 90:93-100.
5. AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association (2000) Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc*. 2001 Mar 1;218(5):669-96.
6. Belizário JA. (2002) O próximo desafio reverter o câncer. *Ciência Hoje*. 31(184) 50:57
7. Bergsland EK (2004) Update on clinical trials targeting vascular endothelial growth factor in cancer. *Am J health-Sys Pharm* 61:Suppl5:S12-20.
8. Board RE et al. (2007) Anti-angiogenic therapy in the treatment of advanced renal cell cancer. *Cancer Treat Rev* 33:1-8.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.24p.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 25-27p.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: estimativa de câncer com sete novas localizações de tumores. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2011/inca_lanca_estimativas_de_cancer_2012_com_sete_novas_localizacoes_de_tumores. Acesso em: 06/Dezembro/2011.

12. Brekken RA et al. (2000) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Canc Reserch* 60,5117-5124.
13. Buonassisi, V.; Venter, JC. (1976) Hormone and neurotransmitter receptor in established vascular endothelial cell line. *Cell Biology*. 1976 May; 73:1612-1616.
14. Chang CC et al. (2005) Structural basis of antigen mimicry in a clinically relevant melanoma antigen system. *J Biol Chem*. 280:41546-52.
15. Cruvinel, et. al. (2009) Tolerância ou auto-imuniade? O delicado equilíbrio do sistema imunológico. *Rev Sinopse de Reumatologia*. N1.
16. Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med*. 285, 1182–1186.
17. Folkman J. (1995) Clinical applications of research on Angiogenesis. *N. Engl. J. Med*. 333, 1757–1763.
18. Food and Drug Administration Briefing Document Oncology Drug Advisory Committee Meeting. (July,2010). BLA STN 125085/191 and 192 Avastin® (bevacizumab). FDA, 2010.25-26p.
19. Foon KA et al. (1999) Clinical and immune responses in resected colon cancer patients treated with anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics the carcinoembryonic antigen. *J Clin Oncol*. 17:2889-5.
20. Georgia, EUA. American Cancer Society. <http://www.cancer.org/Cancer/CancerCauses/index>. Acesso em 17/ Setembro/2010.
21. Gerber HP et al. (2002) VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417:954-8.
22. Gerber HP, Ferrara N. (2005) Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*. 65(3):671-80.
23. Grunstein J et al. (1999) Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function *Cancer Res* 59: 1592-8.
24. Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64.

25. Hinoda Y et al. (2004) Monoclonal antibodies as effective therapeutic agents for solid tumors. *Cancer Sci.* 95:621-5.
26. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335–42.
27. Hurwitz HI et al. (2005) Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23:3502-8.
28. Jerne NK (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol* 125c:373-89.
29. Jobim M, Jobin LFJ (2008) Natural killer cells and immune surveillance. *Jornal de Pediatria.* 84(4 Supl): 58-67.
30. Kim KJ et al. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362:841-4.
31. Laemmli UK (1970). *Nature (London).* 227:681-685.
32. Léo P, Ucelli P, Augusto EF, Oliveira MS, Tamashiro WM (2000) Anti-TNP monoclonal antibodies as reagents for enzyme immunoassay (ELISA). *Hybridoma.* 19(6):473-9.
33. Loss CM et al. (2010) Anti-human vascular endothelial growth (VEGF) antibody selection for immunohistochemical staining of proliferating blood vessels. *Jorn of Histochem & Cytochem.* 58(2):109-118.
34. Manual Merck – saúde para a família. Tratamentos do câncer http://mmspf.msdonline.com.br/pacientes/manual_merck/secao_15/cap_166.htm l. Acesso em 19/Dezembro/2011.
35. Marincola FM et al. (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74: 181-273.
36. Moraes JZ et al. (1992) Induction of an immune response through the idiotypic network with monoclonal anti-idiotypic antibodies in the carcinoembryonic antigen system *J Cell Biochem* 50: 324-35.
37. Moraes JZ et al. (1994) Anti-idiotypic monoclonal AB3, reacting with the primary antigen (CEA), can localize in human colon-carcinoma xenografts as efficiently as AB1. *Int J Cancer* 57: 586-91.

38. Neningen E et al. (2007) Active immunotherapy with 1E10 anti-idiotypic vaccine in patients with small cell lung cancer: Report of a phase I trial. *Cancer Biol Ther.* 6:145-50.
39. Neoplasia. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Neoplasia>. Acesso em 11/Dezembro de 2011.
40. Pignatari GC et al. (2007) Carcinoembryonic antigen (CEA) mimicry by an anti-idiotypic scFv isolated from anti-Id 6.C4 hybridoma. *J Biotechnol.* 127:615-25.
41. Presta LG et al. (1997) Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57:4593-9.
42. Ramos AS, Parise CB, Han SW, Travassos LR, Campos-Lima PO, Moraes JZ. Anti-anti-Id antibody of MAb R24 inhibits human melanoma tumor growth *in vivo*. *Cancer Science* (no prelo).
43. Reinartz S et al. (2004) Vaccination of patients with advanced ovarian carcinoma with the anti-idiotypic ACA125: immunological response and survival (phase Ib/II). *Clin Cancer Res.* 10:1580-7.
44. Ria R et al. (2010) Angiogenesis and progression in human melanoma. *Dermatology Research and Practice* 2010: 3-4.
45. Ribatti D et al. (2006) Angiogenesis and anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Cancer treat Rev* 32:437-44.
46. Rini BI et al. (2008) Bevacizumab plus Interferon Alfa compared with Interferon Alfa Monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J Clin Oncol* 16.9847.
47. Rio de Janeiro, Brasil. Revista oncogua: Os tratamentos do câncer. http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=83. Acesso em 19/Novembro/2011.
48. Rio de Janeiro, Brasil. Fisiopatologia do câncer – capítulo 2. <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>. Acesso em 06/Dezembro/2011.
49. Rosen LS. (2002) Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 9(2 Suppl):36-44.

50. Rosenblatt MI, Azar DT (2006) Anti-angiogenic therapy: prospects for treatment of ocular tumors. *Semin Ophthalmol* 21:151-60.
51. Senger DR et al. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-5.
52. Shearer MH et al. (2000) Idiotypic cascades associated with the CD4-HIV glycoprotein 120 interaction: immunization with anti-idiotypic antibodies induces anti-anti-idiotypic responses with anti-CD4 specificity and in vitro neutralizing activity. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16:77-86.
53. Stgroth SF, Scheidegger D (1980) Production of monoclonal antibodies: strategies and tactics. *J Immunol METH* 35: 1-21.
54. Wang, B. et al. (2007) Protective effect of total flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* (L.) *Scheleid* on human umbilical vein endothelial cell damage induce by hydrogen peroxide. *Science Direct*. 60(2007):36-40.
55. Yildirim T et al. (2004) Generation of anti-idiotypic antibodies that mimic HBsAg and vaccination against hepatitis B virus. *Hybrid Hybridomics*. 2004 Jun;23(3):192-7.
56. Yokoi K, Fidler I. (2004) Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabina. *Clin Cancer Res* 10: 2290-306.