

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Molecular

Conjugação de anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário a nanopartículas magnéticas: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer.

Mariana Campos da Paz Lopes

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília, como
requisito para a obtenção do título de Doutor
em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava – Universidade de Brasília

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos – Universidade de Brasília

Co-orientadora: Dra. Claire Billotey – Université Claude Bernard Lyon 1

Brasília, DF

2012

Trabalho realizado nos laboratórios Nanogem e Nanobiotecnologia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília e no Hospital Edouard Herriot – equipe IMTHERNAT, Université Claude Bernard Lyon 1

Comissão examinadora:

Prof^ª. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava (Orientadora)

Prof^ª. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos (Co-orientadora)

Prof^ª. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Prof^ª. Dra. Paula Rahal

Dr. Luciano Paulino da Silva

Prof^ª. Dra. Silene de Paulino Lozzi

Prof. Dr. João Paulo Longo (Suplente)

“(...) pode-se sempre perguntar por que e sempre continuar sem resposta: será que consigo me entregar ao expectante silêncio que se segue a uma pergunta sem resposta?”

Clarice Lispector

*Ao meu querido noivo Alessandro, que, com certeza,
foi quem mais esperou pelo término deste trabalho.*

A Deus, sempre tão presente em minha vida, por me conceder tantas graças e bênçãos, especialmente neste ano de passos tão importantes.

À Nossa Senhora, minha mãe querida, que sempre está ao meu lado intercedendo por mim e por todos que eu amo.

Aos meus amados pais, Murilo e Maria Lucia, por serem meu exemplo, minha força, meu amparo, minha fonte de discernimento e amor. Somos, eu e minha irmã, muito sortudas de termos vocês como pais. Não existem pais melhores do que vocês.

À minha querida irmã Carolina, por ser tão diferente de mim, por me ensinar outras formas de ver a vida e pela certeza de que para sempre terei alguém a quem recorrer.

Ao meu noivo querido, Alex, por todo o amor e incentivo, por tudo o que já passamos, pela superação das dificuldades, pela alegria das conquistas, pela família que estamos construindo e por toda a felicidade que já existe e que ainda virá. Amor, tá chegando o dia!

À minha querida avó Virgínia, pelo carinho que tem por mim, por sempre ter me ajudado quando precisei, pelas orações e por ser um exemplo de bom-humor e disposição aos 90 anos. Vó, você tem ideia de quão especial você é na minha vida?

À minha orientadora professora Zulmira Lacava pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e por possibilitar, com seu jeito tranquilo e sereno, o meu crescimento profissional e amadurecimento científico durante este doutorado.

À professora Maria de Fátima Almeida Santos, minha eterna orientadora, por sempre me ajudar, me acalmar e acreditar em mim, mesmo quando eu acho que “não vai dar tempo”. Obrigada, Fafi, por todo o carinho nesses 12 anos de convivência. Devo a você a minha formação.

À Dra Claire Billotey, pela orientação nos experimentos realizados durante o doutorado sanduíche em Lyon, França, e aos demais integrantes da equipe, pela ajuda nos experimentos, mesmo depois do meu retorno, e pela paciência ao falarem devagar: Dr. Marc Janier, David Kryza, Pauline Bonazza, Jaqueline Taleb e, em especial, Aurélie Berniard e Imen Miladi pela companhia nas viagens, feiras e festas. Merci Beaucoup!

Ao professor Ricardo Bentes, por toda ajuda e conselhos fundamentais para o término deste trabalho.

À professora Anamélia Bocca, pela boa-vontade em ajudar, pela participação fundamental no início deste trabalho, pelas ideias, conselhos e imuno-histoquímicas.

Ao Dr. Florêncio Figueiredo, por disponibilizar o espaço e os reagentes de seu laboratório, o LIB, para a realização dos experimentos de imuno-histoquímica deste trabalho.

À técnica do LIB Viviane Leal, pela disposição em sempre ajudar nos experimentos de imuno-histoquímica.

À professora Luciana Guilherme, ao Fernando Damasceno e ao Lincoln de Souza, pela síntese dos fluidos magnéticos utilizados neste estudo.

À Msc. Juliana Braz, por ceder um dos fluidos magnéticos utilizados neste estudo.

Ao professor Paulo Cesar Morais pelas valiosas sugestões e correções.

Ao professor Sebastião Silva e à Dra. Camila Messias pela ajuda na realização dos experimentos de espectroscopia Raman e na interpretação dos resultados.

Ao Dr. Fernando Kreutz, por ceder as linhagens celulares de câncer colorretal humano LS174T e HT-29, utilizadas nos experimentos *in vitro* deste trabalho.

Ao Dr. Jose Morgado Díaz, por ceder a linhagem celular de câncer colorretal humano HCT116, utilizada nos experimentos *in vitro* deste trabalho.

Ao Dr. Jean-Christophe Saurin, por ceder as células de câncer colorretal humano LS174T utilizadas nos experimentos *in vivo* deste trabalho.

Aos professores do departamento de Biologia Celular do IB/UnB Marcelo Brígido, Andrea Maranhão, Sônia Bão e Bergmann Ribeiro, pela utilização de alguns equipamentos de seus laboratórios e pelas sugestões.

Às minhas amigas de laboratório Luciana Carneiro e Livia Matos, pela ajuda com os experimentos *in vivo* e micro-tomografia, pelas discussões científicas, pelas sugestões e pelas divertidas conversas, inclusive sobre casamento, né, Livia?

Aos demais colegas de laboratório, Flávia Portilho, Ana Luisa Vilela, Luis Carlos e Cesar Romero, e à técnica Adriana, pela agradável convivência.

Ao Msc. Raphael Peixoto pela ajuda no desenvolvimento do modelo de câncer de mama murino.

À Msc. Renata Carvalho pela ajuda nos experimentos e análises de microscopia eletrônica.

À Mary-ann Xavier e ao Samuel Vidal, pela ajuda na utilização do equipamento zetasizer.

À Dra Izabel Silva, pela disponibilidade em sempre ajudar com as análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório vizinho, pela agradável convivência e espírito de equipe, em especial Jaque, Grazi, Maitê, Larissa, Juli, Bia, Lud, João e Luis.

Ao Lab 1 da Biologia Molecular, em especial, Bárbara, Yuri, Flávia, Fernanda, Maryani, Janaína e Rafa, por serem tão queridos.

Às minhas queridas amigas biólogas Carol, Elisa e Patrícia, por me apoiarem, me escutarem, entenderem minha ausência e sempre torcerem pelo meu sucesso profissional e pessoal. Amo vocês!

A todos meus amigos, familiares e pessoas que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Ao CNPq e à Capes, pelo apoio financeiro.

Nanopartículas magnéticas são muito promissoras tanto para o tratamento como para o diagnóstico do câncer. Neste estudo, teve-se como objetivo desenvolver um material nanoestruturado constituído de nanopartículas de maghemita conjugadas ao anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário (anti-CEA) suspensas em um fluido biocompatível (FM) para marcação de células que expressam o CEA, biomarcador característico de células de câncer colorretal e de mama. As nanopartículas do fluido desenvolvido – denominado FMCEA – apresentam um diâmetro hidrodinâmico médio de 500 nm e potencial zeta de -38 mV, conforme resultados obtidos em análise por espalhamento de luz dinâmico. A análise por espectroscopia Raman mostrou um pico em 1655 cm^{-1} , observado apenas para o FMCEA, o que revela uma ligação amida entre o grupo amina do anti-CEA e o grupo carboxil das nanopartículas e indica a eficácia do processo da conjugação. ELISA e testes de coloração de Perls confirmaram que o FMCEA é específico para células que expressam o CEA e análises em microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o anti-CEA conjugado nas nanopartículas do FMCEA facilita a interiorização das mesmas pelas células-alvo. Estudos in vivo mostraram que as nanopartículas do FM e do FMCEA se acumulam principalmente no fígado, nos rins e no baço após administração intravenosa e nos rins após administração intraperitoneal e que nanopartículas conjugadas ao anti-CEA chegam ao tumor em menor quantidade, porém permanecem nele por maior período de tempo. Além disso, o FMCEA se mostrou adequado para técnicas de imagem. A partir desses resultados, pode-se concluir que o FMCEA desenvolvido neste estudo é específico para células tumorais que expressam o CEA e, portanto, uma ferramenta teragnóstica promissora.

Palavras-chave: Nanopartículas Magnéticas; Anti-CEA; Teragnóstico; Câncer Colorretal; Câncer de Mama.

Magnetic nanoparticles are very promising for both treatment and diagnosis of cancer. This study was aimed to develop a nanosized material device consisted of nanosized maghemite particles coated with DMSA and surface-functionalized with anti-carcinoembryonic antigen (anti-CEA) suspended as a biocompatible magnetic fluid sample (FM) for targeting cell lines expressing CEA, a biomarker characteristic of colorectal and breast cancer cells. Anti-CEA conjugated nanoparticles of the as-developed magnetic fluid – labeled FMCEA – presented a mean hydrodynamic size of 500 nm and zeta potential of -38mV as observed by dynamic light scattering. Analysis by Raman spectroscopy showed a peak at 1655 cm^{-1} observed only in FMCEA, which reveals the amide bond between anti-CEA amine groups and nanoparticles carboxyl groups and the conjugation process efficiency. ELISA and Prussian blue iron staining tests confirmed that the as-prepared FMCEA is specific for CEA-expressing cells and transmission electron microscopy analyses showed that the anti-CEA conjugated onto nanoparticles facilitates their uptake by target cells. In vivo studies showed that nanoparticles of both fluids accumulate mainly in liver, kidneys and spleen after intravenous injection and in kidneys after intraperitoneal injection, and that anti-CEA conjugated nanoparticles come to tumor in less extent, but remain there for longer periods of time than nanoparticles without anti-CEA. Furthermore, FMCEA is adequate for imaging techniques. In conclusion, FMCEA can specifically target CEA, and it is therefore promising as a theragnostic tool for CEA-expressing tumors.

Keywords: Magnetic Nanoparticles; Anti-CEA; Theragnostic Device; Colorectal Cancer; Breast Cancer.

	p.
Figura 1. Obtenção de tumor de Ehrlich ascítico.	29
Figura 2. Reação química entre os grupos carboxil e amina mediada por EDC e NHS.	33
Figura 3. Padrão de classificação adotado para a localização de nanopartículas.	40
Figura 4. Camundongos Balb-c <i>nude</i> fêmeas.	41
Figura 5. Injeção IV (veia caudal) do fluido magnético em animal anestesiado (2% de isoflurano em uma mistura oxigênio/nitrogênio (25%/75%)).	44
Figura 6. Equipamento NanoSPECT/CT utilizado para aquisição das imagens de tomografia computadorizada por emissão de fóton único.	45
Figura 7. Procedimento para aquisição das imagens de RM.	48
Figura 8. Camundongos Balb-c fêmeas.	50
Figura 9. ELISA com diferentes linhagens de câncer colorretal humano.	54
Figura 10. Fotomicrografias de tecidos de mama de camundongos submetidos à imuno-histoquímica.	55
Figura 11. Micrografias eletrônicas com diferentes aumentos de FMa, FMaCEA, FMs e FMsCEA.	57
Figura 12. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de FMs sobre linhagens de câncer colorretal humano, por meio de ensaio de MTT.	59
Figura 13. Curva padrão de absorvância a 560 nm em função da concentração de ferro obtida a partir do FMs avaliado pelo método colorimétrico do Ferrozine.	60
Figura 14. Diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas dos fluidos FMs e FMsCEA determinados por espalhamento de luz no equipamento zetasizer.	61
Figura 15. Espectros SERS.	62
Figura 16. Imagens obtidas a partir do microtomógrafo.	64
Figura 17. Capacidade de ligação e especificidade do FMsCEA avaliadas por ELISA.	65
Figura 18. Capacidade de ligação e especificidade do FMsCEA avaliadas por coloração de Perls.	66

Figura 19. Micrografias eletrônicas de células LS174T e HCT116.	68
Figura 20. Imagens obtidas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) em diferentes tempos após a administração intravenosa do fluido FM.	71
Figura 21. Imagens do mesmo animal obtidas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) em diferentes tempos após a administração intraperitoneal do fluido FM.	72
Figura 22. Imagens do mesmo animal obtidas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) em diferentes tempos após a administração intravenosa do fluido FMCEA.	73
Figura 23. Imagens do mesmo animal obtidas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) em diferentes tempos após a administração intraperitoneal do fluido FMCEA.	73
Figura 24. Porcentagem de radioatividade restante em cada órgão após 24 h da administração intravenosa (iv) dos fluidos FM e FMCEA.	75
Figura 25. Porcentagem de radioatividade restante em cada órgão após 24 da administração intraperitoneal (ip) dos fluidos FM e FMCEA.	76
Figura 26. Porcentagem de radioatividade restante em cada órgão após 24 h da administração intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv) dos fluidos FM e FMCEA.	77
Figura 27. Porcentagem de radioatividade restante por grama de órgão após 24 h da administração intravenosa (iv) dos fluidos FM e FMCEA.	80
Figura 28. Porcentagem de radioatividade restante por grama de órgão após 24 h da administração intraperitoneal (ip) dos fluidos FM e FMCEA.	81
Figura 29. Porcentagem de radioatividade restante por grama de órgão após 24 h da administração intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv) dos fluidos FM e FMCEA.	82
Figura 30. Porcentagem de radioatividade restante por grama de tumor e de músculo após 24 h da administração intravenosa (iv) e intraperitoneal (ip) dos fluidos FM e FMCEA.	84
Figura 31. Imagens de ressonância magnética de camundongo portador de tumor antes e imediatamente depois da administração intratumoral de FM.	86
Figura 32. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de FMCEA sobre a linhagem de câncer de mama murino 4T1, por meio de ensaio de MTT.	87

- Figura 33. Fotomicrografias de tumores em mama de camundongo balb-c induzido por células de carcinoma mamário 4T1. 88
- Figura 34. Frequência de cortes analisados com ferro e porcentagem da quantidade de ferro nos tumores coletados 1, 4, 15 e 24 h após a administração intraperitoneal de FM e FMCEA. 89

	p.
Tabela 1. Linhagens de câncer colorretal humano e de mama murino e humano submetidas aos ensaios de ELISA, imunofluorescência e imunohistoquímica para detecção de diferentes biomarcadores tumorais de superfície.	27
Tabela 2. Tratamentos com FMs adicionados a 150µL de meio de cultura para a avaliação da citotoxicidade do fluido FMs sobre as células LS174T e HCT116.	34
Tabela 3. Concentrações de ferro nas diluições de FMs utilizadas como padrões na curva de calibração do método do Ferrozine.	36
Tabela 4. Grupos experimentais de camundongos submetidos à SPECT.	43
Tabela 5. Grupos experimentais de camundongos submetidos à ressonância magnética.	47
Tabela 6. Grupos experimentais de camundongos utilizados para o estudo de biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA.	51
Tabela 7. Características dos fluidos magnéticos FMa e FMs.	56
Tabela 8. Quantidade de células com NPM dos fluidos FMs e FMsCEA interiorizadas ou não.	67
Tabela 9. Radioatividade injetada em cada animal de cada tratamento.	70
Tabela 10. Peso médio dos órgãos e tumores coletados em cada grupo experimental.	78
Tabela 11. Média do sinal da ressonância magnética calculado para cada animal antes e após injeções intratumoral (it) ou intravenosa (iv) dos fluidos FM e FMCEA.	85

°C – grau Celsius

^{99m}TcO₄ – Tecnécio 99

AgNO₃ – Nitrato de prata

APB – Tampão de fosfatase alcalina

ASCO – Sociedade Americana de Oncologia Clínica

BSA – Albumina sérica bovina

CA – Antígeno carboidrato

CCR – Câncer colorretal

CEA – Antígeno carcinoembrionário

CEAr – Receptor de CEA

CEACAM – Molécula de adesão celular relacionada ao CEA

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CT – Tomografia computadorizada

DMSA – Ácido dimercapto-succínico

DMSO – Dimetilsufóxido

EDC – 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR – Receptor de fator de crescimento epitelial

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*

ER – Receptor de estrógeno

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar

FDA – Food and Drug Administration

FJP – Polipose Juvenil Familiar

FM – Fluido magnético

FMCEA – Fluido magnético cujas nanopartículas estão conjugadas com o anti-CEA

FMEN – Fluido magnético submetido à reação com EDC e NHS

GPI – Glicofosfatidilinositol

h – hora

HCl – Ácido clorídrico

HER2 – Receptor de crescimento epidermal humano

HNCC – Síndrome de Câncer Colorretal Sem Polipose

ICAM – Molécula de adesão celular

IFN – Interferon

IgG – Imunoglobulina

IL – Interleucina

ip – Intraperitoneal

it – Intratumoral

iv – Intravenosa

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KDa – Quilodalton

MBq – Megabecquerel

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

min – Minuto

mL – Mililitros

mV – Milivolts

MTT – 3 (4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide)

nm – Nanômetro

NCA – Antígeno normal de reação cruzada

NHS – N-hydroxysuccinimide

NIH – *National Institute of Health*

NPM – Nanopartículas magnéticas

PBS – Salina tamponada com fosfato

PET – Tomografia por emissão de pósitrons

pNPP – Para-nitrofenilfosfato

PR – Receptor de progesterona

PSG – Glicoproteínas específicas da gravidez

PSMA – Antígeno de membrana específico de próstrata

RES – Sistema reticulo-endotelial

RM – Ressonância magnética

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SERS – *Surface enhanced Raman spectroscopy*

SPECT – Tomografia computadorizada por emissão de fóton único

TAE – Tumor ascítico de Ehrlich

TNF – Fator de necrose tumoral

TSE – Tumor sólido de Ehrlich

u.a. – Unidade arbitrária

v - Volume

VCAM – Molécula de adesão vascular

SUMÁRIO

	p.
INTRODUÇÃO.....	1
1. CÂNCER.....	1
1.1. Câncer colorretal.....	2
1.2. Câncer de mama.....	3
2. BIOMARCADORES.....	5
2.1. Antígeno carcinoembrionário (CEA).....	7
3. TERAPIAS E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER.....	14
4. NANOBIOTECNOLOGIA E CÂNCER.....	20
4.1. Nanopartículas magnéticas.....	22
OBJETIVOS.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE ESTUDO.....	27
1.1. Manutenção e propagação das células HT-29, LS174T e HCT116.....	27
1.2. Manutenção e propagação das células MCF-7 e 4T1.....	28
1.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	28
1.4. Tumor Sólido de Ehrlich (TSE).....	29
1.5. ELISA.....	29
1.6. Imunofluorescência.....	30
1.7. Imuno-histoquímica.....	30
2. MODELO DE CÂNCER DE INTESTINO – ESTUDO <i>IN VITRO</i>	31
2.1. Fluidos Magnéticos.....	31
2.2. Conjugação do anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário às nanopartículas.....	32
2.3. Comparação entre os fluidos FMaCEA e FMsCEA.....	34

2.4. Avaliação da citotoxicidade do fluido magnético FMs sobre as células de câncer colorretal humano LS174T e HCT116.....	34
2.5. Obtenção de um volume maior de FMsCEA.....	35
2.6. Caracterização do fluido magnético FMsCEA.....	35
2.6.1. <i>Determinação da concentração de ferro</i>	35
2.6.2. <i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta das nanopartículas do FMsCEA</i>	36
2.6.3. <i>Espectroscopia Raman</i>	37
2.7. Avaliação do potencial da utilização dos fluidos em diagnóstico por imagem.....	37
2.8. Avaliação da capacidade de ligação e da especificidade de FMsCEA.....	38
2.8.1. <i>ELISA</i>	38
2.8.2. <i>Coloração de Perls</i>	38
2.9. Interiorização das nanopartículas pelas células-alvo.....	39
2.10. Avaliação dos efeitos de FMs e FMsCEA sobre a morfologia celular.....	40
2.11. Análise Estatística.....	40
3. MODELO DE CÂNCER DE INTESTINO – ESTUDO <i>IN VIVO</i>	41
3.1. Animais.....	41
3.2. Indução do tumor CEA positivo nos animais.....	41
3.3. Fluidos Magnéticos.....	42
3.4. Avaliação da biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA.....	42
3.4.1. <i>Marcação radioativa dos fluidos</i>	42
3.4.2. <i>Tratamento dos animais</i>	43
3.4.3. <i>Aquisição e análise das imagens cintilográficas da SPECT</i>	44
3.4.4. <i>Contagem radioativa dos órgãos</i>	45
3.4.5. <i>Análise Estatística</i>	46
3.5. Ressonância Magnética (RM).....	46
3.5.1. <i>Tratamento dos animais</i>	46
3.5.2. <i>Aquisição e análise das imagens de RM</i>	47
3.5.3. <i>Análise Estatística</i>	48

4. MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO – ESTUDO <i>IN VITRO</i>	49
4.1. Fluido magnético.....	49
4.2. Avaliação da citotoxicidade do fluido magnético FMCEA sobre as células de câncer de mama murino 4T1.....	49
5. MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO-ESTUDO <i>IN VIVO</i>	49
5.1. Animais.....	49
5.2. Indução do tumor de mama nos animais.....	50
5.3. Fluidos magnéticos.....	50
5.4. Avaliação da presença dos fluidos FM e FMCEA no tumor.....	51
5.4.1. <i>Grupos experimentais</i>	51
5.4.2. <i>Preparação dos tumores para análise histológica</i>	52
5.4.3. <i>Análise Estatística</i>	53
RESULTADOS	54
1. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE ESTUDO.....	54
2. MODELO DE CÂNCER DE INTESTINO – ESTUDO <i>IN VITRO</i>	56
2.1. Fluidos Magnéticos.....	56
2.2. Comparação entre fluidos FMaCEA e FM _s CEA.....	56
2.3. Avaliação da citotoxicidade do fluido magnético FM _s sobre as células de câncer colorretal humano LS174T e HCT116.....	58
2.4. Caracterização do fluido magnético FM _s CEA.....	59
2.4.1. <i>Determinação da concentração de ferro</i>	59
2.4.2. <i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta das nanopartículas do FM_sCEA</i>	60
2.4.3. <i>Espectroscopia Raman</i>	62
2.5. Avaliação do potencial de utilização dos fluidos em diagnóstico por imagem.....	63
2.6. Avaliação da capacidade de ligação e da especificidade de FM _s CEA.....	64
2.6.1. <i>ELISA</i>	64
2.6.2. <i>Coloração de Perls</i>	66
2.7. Interiorização das nanopartículas pelas células-alvo.....	67
2.8. Avaliação dos efeitos de FM _s e FM _s CEA sobre a morfologia celular.....	68

3. MODELO DE CÂNCER DE INTESTINO – <i>ESTUDO IN VIVO</i>	69
3.1. Avaliação da biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA.....	69
3.1.1. <i>Aquisição e análise das imagens cintilográficas da SPECT</i>	70
3.1.2. <i>Contagem radioativa dos órgãos</i>	74
3.2. Ressonância Magnética (RM).....	85
4. MODELO DE CÂNCER DE MAMA – <i>ESTUDO IN VITRO</i>	86
5. MODELO DE CÂNCER DE MAMA – <i>ESTUDO IN VIVO</i>	87
DISCUSSÃO	90
CONCLUSÕES	109
PERSPECTIVAS	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

INTRODUÇÃO

1. CÂNCER

O câncer é uma doença causada por um clone mutante que, em um processo microevolucionário, adquire vantagens de proliferação e sobrevivência em detrimento das células vizinhas, se reproduz apesar das restrições normais da divisão celular e é capaz de invadir tecidos reservados a outros tipos celulares (Alberts *et al.*, 2008).

A integridade e a função de determinado tecido são mantidas por um equilíbrio entre proliferação e morte celular, regulado por um complexo sistema de sinalização extra e intracelular. Para que o clone mutante seja capaz de evadir esse sistema e originar uma massa celular (tumor primário), é necessário que ocorra uma sequência de alterações em diferentes genes acompanhadas de novas expansões clonais até que, em um processo denominado progressão tumoral, surja uma população celular com grande potencial de crescimento e invasão (tumor maligno). Na progressão tumoral, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e proliferam em outros tecidos, formando novos tumores denominados metástases (Parmigiani & Camargo, 2004).

Tanto na promoção como na progressão tumoral, as alterações genéticas relacionadas podem estar não apenas diretamente na sequência de pares de bases no DNA como também na sua metilação. Uma alteração no padrão de metilação do DNA pode modificar a expressão gênica sem alterar a sequência de nucleotídeos e isso é transmitido ao longo das divisões celulares, em um processo denominado de epigenética (Lee & Herceg, 2012). Assim como as mutações, as alterações epigenéticas, que incluem, além de metilação do DNA, a modificação de histonas, estão relacionadas com fatores externos e ambientais e, portanto, o câncer pode ser definido como uma doença resultante de um processo em várias etapas que combina alterações genéticas e epigenéticas e influências ambientais (Su *et al.*, 2012).

Dentre as influências ambientais, vários fatores de risco tem sido relacionados ao câncer humano, como infecções por vírus do papiloma (Gyllensten *et al.*, 2012), da imunodeficiência (Silverberg *et al.*, 2012) e da hepatite B (Gonzalez & Keeffe, 2012), infecções bacterianas por *Helicobacter pylori* (Nanjo *et al.*, 2012), diabetes (Yang *et al.*, 2012a) e consumo de álcool (Parkin, 2011). Além disso, a adoção de hábitos como o cigarro, o sedentarismo e a ocidentalização da dieta, juntamente com o envelhecimento e o crescimento da população mundial, vêm contribuindo para o aumento da incidência do câncer no mundo (Jemal *et al.*, 2011). Apenas para o ano de 2008, foram estimados

aproximadamente 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes ocasionadas pela doença em todo o mundo (World Health Organization, 2012).

No Brasil, para cada um dos anos de 2012 e 2013, estima-se que ocorrerão mais de 518 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, que será o tipo mais incidente para ambos os sexos, seguido dos cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino, e mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino. Para o Distrito Federal, essa estimativa aponta cerca de oito mil novos casos distribuídos igualmente entre homens e mulheres, sendo os tipos mais comuns os mesmos descritos para o país em sua totalidade (Brasil, 2012b).

1.1. Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) é um dos tipos mais frequentes no mundo, especialmente na Europa, Oceania e América do Norte, onde foram registradas as taxas de incidência mais altas entre 1998 e 2002 (Center *et al.*, 2009). Apenas nos Estados Unidos, foram estimados para o ano de 2011 aproximadamente 147 mil casos novos e 50 mil mortes relacionadas com o câncer de intestino grosso (cólon, reto e ânus) (Siegel *et al.*, 2009). Segundo Vettore & Caballero (2004), após os cânceres de pulmão, mama e próstata, o CCR é a causa mais comum de morte por neoplasias no mundo ocidental.

No Brasil, entre os anos de 2008 e 2009, a taxa de mortalidade por esse tipo de câncer foi de sete óbitos a cada 100 mil indivíduos do sexo masculino e seis a cada 100 mil indivíduos do sexo feminino (Brasil, 2012a). Para 2012, as estimativas, que também são válidas para 2013, apontam 30 mil novos casos de CCR (510 no Distrito Federal), que será o quarto tipo de neoplasia mais frequente tanto para homens como para mulheres (Brasil, 2012b).

O CCR pode se apresentar em três padrões: esporádico, hereditário e familiar. O tipo esporádico representa cerca de 70% dos casos e está relacionado com danos no DNA causados pela influência do ambiente ou pelos efeitos da idade. (Vettore & Caballero, 2004). Entre os fatores ambientais, aqueles relacionados à alimentação são os principais interferentes no desenvolvimento de CCR. Em um estudo do tipo caso-controle na Jordânia, Arafa *et al.* (2011) atribuíram, ao risco de desenvolvimento da doença, dietas ricas em carne vermelha e gordura saturada e pobres em frutas, vegetais e fibras. De fato, estudos revelaram uma associação significativa entre obesidade e CCR

em humanos (Matsuo *et al.*, 2012). Em camundongos obesos, verificou-se que esse risco estava associado ao aumento de citocinas inflamatórias que alteravam vias de sinalização e levavam à ativação de fatores de transcrição indutores de proliferação, como o c-myc (Liu *et al.*, 2012). Além disso, Zhao *et al.* (2012) relataram que o consumo do álcool possui um efeito sinérgico em indivíduos obesos quanto ao risco de incidência da doença. No entanto, o CCR esporádico se desenvolve somente se a exposição aos fatores de risco ocorrer durante um período longo o suficiente para permitir o acúmulo de múltiplas alterações em genes relacionados ao controle de proliferação e morte celular (revisto por Migliori *et al.*, 2011).

A forma hereditária (aproximadamente 5% dos casos) ocorre em indivíduos que herdaram dos pais uma mutação em um gene supressor de tumor, por exemplo, ou alterações em múltiplos *loci* com efeitos aditivos. As síndromes hereditárias são classificadas com base em achados clínicos, patológicos e genéticos. Uma forma comum de classificação é quanto à presença de pólipos. As síndromes hereditárias que apresentam uma grande quantidade de pólipos são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e a Polipose Juvenil Familiar (FJP). Já a síndrome de Lynch, também denominada Síndrome de Câncer Colorretal Sem Polipose (HNCC) é caracterizada pela pequena quantidade de pólipos. Estas síndromes são decorrentes de alterações autossômicas dominantes (Jasperson *et al.*, 2010; Vettore & Caballero, 2004).

A terceira forma de CCR representa cerca de 20 a 30% dos casos e é denominada de CCR Familiar. Nas famílias afetadas, a frequência é alta o suficiente para não ser considerado CCR esporádico, mas também não segue o mesmo padrão das síndromes hereditárias. Em algumas famílias, os indivíduos parecem ter herdado as mesmas alterações, enquanto em outras, os casos aparentam ser esporádicos e decorrentes de um mesmo ambiente ou estilo de vida. A etiologia do CCR Familiar ainda não é muito bem compreendida (revisto por Wezel *et al.*, 2012).

1.2. Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais frequente em mulheres e o segundo mais frequente no mundo. Em 2008, estima-se que ocorreram cerca de 1,4 milhões de novos casos, o que representou 10,9% de todos os casos de câncer diagnosticados para ambos os sexos. Além disso, o câncer de mama foi responsável por aproximadamente 460 mil mortes, o que correspondeu à quinta causa de morte

decorrente de câncer no mundo (World Health Organization, 2012). Nos últimos 30 anos, o número de novos casos de câncer de mama vem crescendo em uma taxa anual de 3,1%, passando de 640 mil em 1980 para 1,6 milhões em 2010. O número de mortes também aumentou de 250 mil para 425 mil nesse mesmo período, porém com uma taxa anual menor, de 1,8% (Forouzanfar *et al.*, 2011).

No Brasil, a taxa de mortalidade por câncer de mama em mulheres também vem aumentando ao longo dos anos e é a maior entre os tipos de neoplasias, atingindo, entre os anos de 2008 e 2009, aproximadamente 12 em cada 100 mil pacientes do sexo feminino (Brasil, 2012a). Para o ano de 2012, estima-se que ocorrerão mais de 52 mil novos casos, sendo 880 no Distrito Federal (Brasil, 2012b).

Segundo Forouzanfar *et al.* (2011), o crescimento tanto no número de casos novos como de mortes causadas pelo câncer de mama é decorrente, entre outros fatores, do envelhecimento da população. Em um estudo com 9766 pacientes com câncer de mama com idades variando entre 35 e 96 anos, Water *et al.* (2012) observaram que a incidência de morte decorrente da doença aumentava com a idade.

Além de estar relacionada com a taxa de mortalidade decorrente de câncer de mama, a idade também é um fator de risco para o desenvolvimento da doença (Merviel *et al.*, 2011). De acordo com estimativas de Bouée *et al.* (2010), o envelhecimento da população na França será responsável por um aumento de 4,6% na incidência de câncer de mama no país até o ano de 2018.

Entretanto, a idade como fator de risco para câncer de mama apresenta-se com um padrão bastante característico. O risco é pequeno em mulheres com menos de 35 anos, aumenta rapidamente até os 50 anos e cresce lentamente em mulheres acima de 50 anos (Brasil, 2012c), o que pode ser influência dos aspectos hormonais (Park *et al.*, 2011). Recentemente foi relatado que durante o ciclo estral de camundongos, na fase diestral, caracterizada por níveis máximos de progesterona e correspondente a fase lútea em mulheres, ocorre um aumento de 14 vezes na população de células-tronco mamárias, alvos potenciais no processo de transformação maligna (Joshi *et al.*, 2010). Segundo os autores, isso explicaria porque mulheres com maior número de ciclos menstruais durante a vida são mais susceptíveis ao câncer de mama. De fato, estudos mostram uma correlação entre um risco aumentado da doença e a menarca precoce (Islam *et al.*, 2012) e a menopausa tardia (Phipps *et al.*, 2008). Da mesma forma, outros fatores hormonais e relacionados à vida reprodutiva, como exposição ao estrogênio (Zbuk & Anand, 2012), reposição hormonal (Lai *et al.*, 2011), nuliparidade e idade tardia na primeira gravidez

(Ma *et al.*, 2010), também estão relacionados com um aumento do risco de câncer de mama.

Por ser uma doença de etiologia multifatorial, outros fatores comportamentais e ambientais também são considerados fatores de risco para o câncer de mama. Entre eles, obesidade e a inflamação decorrente dela (revisito por Baumgarten & Frasor, 2012) e consumo de álcool (Protani *et al.*, 2012).

Todos esses fatores de risco descritos estão especialmente relacionados aos casos de câncer de mama esporádico, que é o tipo que atinge a maioria das pacientes. No entanto, assim como o câncer colorretal, uma pequena parcela dos casos - 5 a 10% - é hereditária. Apesar de representar a minoria dos casos, muitos estudos consideram os antecedentes familiares um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do câncer de mama (Merviel *et al.*, 2011; Akushevich *et al.*, 2011). A predisposição herdada pode estar associada a alterações em diferentes genes, mas os principais são os supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* (Caputo *et al.*, 2012). Conforme revisito por Gadzicki *et al.* (2011), cerca de 20 a 40% dos casos hereditários de câncer de mama são caracterizados por mutações nesses genes e, por isso, são considerados importantes biomarcadores de predisposição ao câncer de mama.

2. BIOMARCADORES

De acordo com o *National Cancer Institute*, instituto do câncer do órgão norte-americano NIH (*National Institute of Health*), um biomarcador, também denominado marcador molecular, consiste em uma molécula biológica encontrada nos tecidos, no sangue ou em outros fluidos corporais e que é um sinal de um processo normal ou anormal ou de uma doença (*National Cancer Institute*, 2012). No caso do câncer, a existência de biomarcadores específicos deve-se à descoberta de alterações características de diferentes tumores, como mutações associadas, perda, amplificação e rearranjos de regiões genômicas e aumento ou ausência de transcritos e proteínas, decorrentes da desregulação gênica (Seuáñez *et al.*, 2004). Dessa forma, existe uma enorme variedade de biomarcadores para o câncer, entre eles enzimas, receptores, peptídeos, RNAs não codificadores, além de assinaturas diferentes de proteomas e metabolomas, que combinam várias alterações (Henry & Hayes, 2012).

Em um paciente com câncer, os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: de prognóstico, preditivos e de diagnóstico. Os marcadores de prognóstico são

utilizados para prever o êxito do paciente, independentemente das decisões terapêuticas (Chen *et al.*, 2012a). Um exemplo é a P-cadherina, uma glicoproteína de adesão, cuja localização restringe-se às células mioepiteliais das glândulas mamárias. No entanto, sua superexpressão em tumores de mama malignos está relacionada com um pior prognóstico a curto-prazo (0 a 10 anos), o que inclui piores sobrevidas global e específica da doença, além de menor intervalo de recidiva, independentemente do tratamento a ser administrado (Turashvili *et al.*, 2011). O mesmo é descrito para o marcador de prognóstico FOXM1, um fator de transcrição que quando superexpresso em câncer colorretal também é um indicador independente de um prognóstico ruim (Chu *et al.*, 2012).

Já os marcadores preditivos contribuem para as decisões terapêuticas, pois predizem qual terapia será possivelmente a mais eficaz (Henry & Hayes, 2012). No câncer colorretal, um exemplo de marcador preditivo para terapias inibidoras do receptor de fator de crescimento epitelial (EGFr) é o *KRAS*, um dos mais importantes oncogenes relacionados com esse tipo de neoplasia. Tanto o EGFr como o *KRAS* participam da mesma via da MAPK, indutora de proliferação celular. No entanto, como a participação de *KRAS* nesta via é posterior à participação de EGFr, se o gene *KRAS* estiver mutado, uma terapia inibidora de EGFr com anticorpos monoclonais será indiferente e, portanto, ineficaz. Ou seja, o *KRAS* é um biomarcador preditivo para terapias inibidoras de EGFr em câncer colorretal (De Mattos-Arruda *et al.*, 2011). Outros exemplos desse tipo de marcador são os receptores de crescimento epidermal humano (HER2) e de estrógeno (ER), que predizem uma boa resposta aos tratamentos contra o câncer de mama respectivamente com trastuzumab, um anticorpo monoclonal terapêutico anti-HER2, e com tamoxifen, um modulador específico para o receptor de estrógeno (revisto por Henry & Hayes, 2012).

O último tipo de marcador é o de diagnóstico, auxiliar no diagnóstico e na classificação da doença. Um exemplo é a vimentina, uma proteína relacionada com a migração de células cancerosas e a formação de metástases (Pan *et al.*, 2012). A detecção da metilação desse gene por um exame de fezes comercialmente disponível significa presença de câncer colorretal (Berg & Soreide, 2011). Além dessa função de diagnóstico, um marcador também é considerado de diagnóstico quando pode ser utilizado no monitoramento das respostas à terapia, como, por exemplo, no que se refere à recidiva da doença e ao aparecimento de metástases (Chen *et al.*, 2012). Recentemente, foi descrito um marcador deste tipo para o câncer de mama: a resistina,

uma molécula secretada por adipócitos e monócitos que está envolvida no processo inflamatório. Segundo Lee *et al* (2012), a superexpressão de resistina nos tumores foi associada a um menor risco de recorrência da doença após terapia hormonal.

Um fato interessante é a possibilidade de um biomarcador ser classificado em mais de uma categoria e ser útil para diferentes tipos de neoplasia, como é o caso do antígeno carcinoembrionário (do inglês CEA). De acordo com a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (do inglês ASCO), a expressão de CEA em pacientes com câncer gastrointestinal pode ser monitorada como um marcador de prognóstico ou preditivo, se avaliada em conjunto com outros fatores. Além disso, o CEA também é considerado um marcador de diagnóstico, uma vez que a ASCO o recomenda para monitoramento de aparecimento de metástases em pacientes com câncer gastrointestinal durante terapia sistêmica (Locker *et al.*, 2006) e para o monitoramento da eficácia do tratamento em pacientes com câncer de mama (Harris *et al.*, 2007).

2.1. Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

O CEA foi descrito pela primeira vez em 1965 como um antígeno presente em tumores primários e metastáticos do sistema digestório (especialmente do intestino) e em tecidos embrionários, mas ausente nos tecidos saudáveis na fase adulta (Gold & Freedman, 1965). Segundo estudos subsequentes destes autores, o CEA consiste em um complexo de proteína e polissacarídeos que faz parte do glicocálix do tumor (Gold *et al.*, 1970 *apud* Krupey *et al.*, 1972) e está presente também no soro de pacientes com esse tipo de neoplasia (Thomson *et al.*, 1969). Alguns anos mais tarde, Denk *et al* (1972) confirmaram que o CEA está presente em tumores do trato gastrointestinal, como câncer de estômago e de pâncreas e que, no câncer de intestino, o nível de CEA detectado é maior do que nas outras neoplasias e diretamente proporcional ao grau de diferenciação do tumor.

Outros estudos mostraram que o CEA também poderia ser encontrado no soro de pacientes com doenças não malignas do fígado e do pâncreas, como cirrose, hepatite crônica e pancreatite, embora em menor quantidade (Khoo & Mackay, 1973), e nos tecidos e soro de pacientes com outros tipos de câncer de origem extra-gastrointestinal, como o câncer brônquico (Pusztaszeri & Mach, 1972), de mama e de bexiga (Martin *et al*, 1976) e de ovário (Hill *et al.*, 1981). Ainda na década dos anos 70, a presença do CEA em tecidos saudáveis durante a fase adulta também foi descrita (Pusztaszeri &

Mach, 1972), contrariando os primeiros resultados obtidos por Gold e Freedman em 1965.

Desde a sua descoberta, vários estudos de purificação e caracterização foram realizados (Krupey *et al.*, 1972; Westwood *et al.*, 1974; Coligan & Slayter, 1979; Zimmermann *et al.*, 1987). Conforme revisões de Thomas *et al.* (1990) e Thomas *et al.* (2011), apesar de o CEA ser uma molécula estruturalmente bastante heterogênea devido às suas cadeias laterais de carboidratos, os resultados dos diversos estudos indicam que o CEA é uma glicoproteína, composta por aproximadamente 60% de carboidratos, com tamanho variando entre 180 e 200 kDa, dependendo da extensão da sua glicosilação.

Em alguns desses estudos de caracterização, observou-se que existiam muitas outras proteínas relacionadas ao CEA, de diferentes tamanhos, mas com estrutura e sequência similares, que poderiam inclusive ser reconhecidas pelo mesmo anticorpo anti-CEA, como, por exemplo, o NCA (do inglês antígeno normal de reação cruzada) (Blaszcyk *et al.*, 1984; Barnett *et al.*, 1988). Essas proteínas relacionadas foram agrupadas, juntamente com o CEA, em uma família gênica, cujos membros tiveram sua nomenclatura oficializada em 1999 (Beauchemin *et al.*, 1999). Segundo os autores, a família CEA, como foi denominada, possui duas ramificações: (i) ramificação CEACAM, abreviação de *CEA-related cell adhesion molecule* (molécula de adesão celular relacionada ao CEA). Esse ramo inclui o CEA, também denominado CEACAM5, e várias outras CEACAM - 1, 3, 4, 6 (antigo NCA), 7, 8 e outras - que tem, como característica comum, o fato de serem ancoradas à membrana celular por meio de domínios transmembrana ou por glicofosfatidilinositol (GPI) e apresentarem homologia nas suas sequências de DNA e aminoácidos relacionadas à ancoragem; (ii) ramificação PSG, abreviação de *pregnancy-specific glycoproteins* (glicoproteínas específicas da gravidez). As proteínas desse ramo são secretadas e altamente conservadas.

A família gênica CEA está incluída em uma família gênica maior: a superfamília das imunoglobulinas. De fato, desde os primeiros estudos de caracterização do CEA, ainda na década dos anos 80, relatou-se uma grande homologia do CEA com vários membros da família das imunoglobulinas (Beauchemin *et al.*, 1987; Paxton *et al.*, 1987). Conforme revisão de Thomas *et al.* (2011), 29 genes da família CEA já foram descritos, incluindo o próprio CEA, que apresenta uma série de domínios imunoglobulina-*like* e um domínio hidrofóbico c-terminal modificado para permitir a ancoragem à membrana celular via GPI. Esta âncora pode ser clivada por fosfolipases específicas, liberando o CEA em sua forma solúvel.

Apesar de a expressão de CEA em tecidos normais estar descrita há 40 anos, ainda não se sabe exatamente a função desta glicoproteína nos indivíduos saudáveis. Durante a fase embrionária, uma grande quantidade de CEA é expressa e localizada em toda a periferia das células epiteliais do intestino, o que persiste até a vigésima semana da gestação. Já na vida adulta, a expressão do CEA diminui bastante e a pouca quantidade da proteína se localiza principalmente na membrana apical do epitélio do intestino, na parte superior das cristas (Benchimol *et al.*, 1989; Ogura *et al.*, 1998). Segundo Benchimol *et al.* (1989), esse padrão de localização é coerente com a função do CEA de molécula de adesão intercelular independente de cálcio, pois os autores observaram que o CEA promove a agregação de células cultivadas em suspensão mesmo na ausência de íons de cálcio, o que foi confirmado em outros estudos, conforme revisão de Thomas *et al.* (1990). Além disso, existem evidências de que tanto o CEA como outros membros da mesma família gênica se ligam, por meio de seus resíduos de manose, a diferentes linhagens de *Escherichia coli* (Leusch *et al.*, 1990), *Salmonella* (Leusch *et al.*, 1991) e *Neisseria gonorrhoeae* (Virji *et al.*, 1996). Com base nesses fatos, Thomas *et al.* (2011) sugerem que o CEA pode ter também uma função protetora na mucosa intestinal, ao se ligarem em patógenos potencialmente perigosos.

Em tecidos neoplásicos, a expressão de CEA é semelhante àquela da fase embrionária. A grande quantidade de proteína não se restringe apenas à membrana apical, mas se estende nas membranas adjacentes, apresentando uma localização difusa (Benchimol *et al.*, 1989). Essa localização difusa provavelmente está relacionada à perda de expressão, nas células cancerosas, da proteína ocludina, uma molécula associada às junções de oclusão. Enquanto nos tecidos saudáveis a presença da ocludina na borda apical das células epiteliais permite que o CEA se localize apenas em uma região ainda mais apical que a ocludina, no tecido neoplásico, a ausência dessa proteína e consequentemente a perda da função de barreira das junções de oclusão levam à perda da polaridade do CEA (Tobioka *et al.*, 2002).

A superexpressão de CEA em células de câncer colorretal foi relacionada com a inibição de *anoikis*, um tipo de apoptose que é desencadeada pela falta de contato das células com a matriz extracelular e que é, portanto, um mecanismo de vigilância contra displasias e a favor da preservação da arquitetura do tecido (Ordoñez *et al.*, 2000). Além da inibição de *anoikis*, Soeth *et al.* (2001) verificaram que a expressão de CEA em células de câncer de cólon também foi acompanhada por uma diminuição da expressão de nove genes apoptóticos e, consequentemente, por uma proteção dessas células contra

a apoptose, mesmo quando esta foi induzida por luz UV e tratamento com IFN- γ e 5-fluorouracil. Em estudos posteriores, estes autores verificaram que a superexpressão de CEA em células de câncer de cólon também aumentava o número de lesões metastáticas em modelo murino e sugeriram que este fato estaria relacionado à inibição da apoptose (Wirth *et al.*, 2002). Da mesma forma, o tratamento de animais com CEA antes da inoculação de células de câncer colorretal com baixo poder de formação de metástase resulta em um aumento significativo no número de lesões metastáticas (Jessup *et al.*, 1993).

Muitos estudos vem discutindo o papel do CEA na progressão tumoral do câncer colorretal e no aparecimento de metástases no fígado. Isso porque o CEA altera o microambiente tumoral interferindo na atividade dos macrófagos tanto no sítio do tumor primário como no fígado, conforme descrito a seguir.

O CEA difusamente expresso e ancorado a todos os domínios da membrana nas células cancerosas pode ser clivado e alcançar a circulação sanguínea diretamente ou via linfa (revisto por Conaghan *et al.*, 2008). Uma vez na sua forma solúvel, sua eliminação é função do fígado. Um mau funcionamento deste órgão interfere no nível de CEA no soro e é devido a isso que pacientes com doenças benignas do fígado, como cirrose, hepatite crônica e pancreatite, também apresentam níveis elevados de CEA no soro (Khoo & Mackay, 1973).

No fígado, há uma veia de conexão entre este órgão e o intestino: a veia porta. Pela veia porta, o fígado recebe sangue venoso com o material absorvido no intestino. A veia porta se ramifica em vasos cada vez mais finos que são os capilares sinusóides. Estes são revestidos por células endoteliais e pelas células de Kupfer (Junqueira & Carneiro, 1999). As células de Kupfer são macrófagos que podem controlar processos inflamatórios no fígado com a eliminação de neutrófilos, atuar como células apresentadoras de antígenos e modular a resposta imune mediada por células T. Além disso, as células de Kupfer são responsáveis pela eliminação de hemácias, células apoptóticas, microrganismos, resíduos e substâncias, como por exemplo, o CEA produzido nas células hepáticas ou cancerosas (revisto por Paschos *et al.*, 2010). Da mesma forma que o fígado recebe o CEA solúvel pela veia porta, a ele podem chegar também células cancerosas que porventura tenham atravessado a membrana basal do intestino e atingido a circulação. Ao chegarem aos sinusóides, as células cancerosas ficam retidas devido ao tamanho, o endotélio é danificado ou se rompe, as células entram em contato direto com os hepatócitos (Ding *et al.*, 2001; Mook *et al.*, 2003) e

ocorre um aumento de leucócitos aderentes, o que leva a um estreitamento dos vasos (Kruskal *et al.*, 2004). Bayón *et al.* (1996) mostraram que não apenas o tamanho mas também as células de Kupfer são responsáveis pela retenção das células cancerosas circulantes nos sinusóides em um primeiro momento, para depois atuarem na eliminação dessas células e na modulação da resposta imune contra elas. No entanto, segundo Paschos *et al.* (2010), uma falha na ação anti-tumoral das células de Kupfer pode levar à progressão metastática, especialmente porque as células malignas estão retidas no fígado. Jessup *et al.* (1993) também mostraram que o pré-tratamento de animais com CEA causa um aumento no tempo de retenção das células malignas nos sinusóides, o que, segundo os autores, facilita a colonização do fígado por células neoplásicas e auxilia na formação de metástase. Também já foi descrito que a presença do CEA no fígado interfere na atividade das células de Kupfer, que passam a liberar diferentes citocinas, alterando o microambiente dos sinusóides e promovendo a expressão de moléculas de adesão e a sobrevivência das células malignas (revisto por Thomas *et al.*, 2011).

Dessa forma, a presença do CEA no fígado promove uma ação controversa das células de Kupfer. Se por um lado elas constituem a primeira linha de defesa no fígado contra células cancerosas, exercendo funções como eliminação das células malignas e apoptose, por outro, elas também facilitam o crescimento e a progressão tumoral.

Essa controvérsia sobre as células de Kupfer, assim como o papel do CEA no processo de metástase, começou a ser discutido a partir dos resultados obtidos em estudos sobre a eliminação do CEA circulante. A remoção do CEA da circulação ocorre por meio de sua ligação a um receptor presente na superfície das células de Kupfer. Esse receptor com especificidade para o CEA foi descrito primeiramente por Toth *et al* em 1982. Mas apenas em 2001 foi demonstrado que esse receptor, posteriormente denominado de receptor do CEA (CEAr), era a proteína hnRNP M4 (Bajenova *et al.*, 2001). A hnRNP M4 é uma proteína ubíqua nas células de mamíferos, responsável, entre outras coisas, por processamento e maturação de RNA mensageiros e respostas *heat-shock*, além de atuarem como fatores de transcrição (revisto por Bajenova *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2011).

Após ligação do CEA ao CEAR, esse complexo é interiorizado por endocitose pelas células de Kupfer, onde o CEA é parcialmente degradado com a remoção do ácido siálico de suas cadeias de carboidratos. O CEA semi-degradado é exocitado e logo em seguida endocitado, por meio de receptor de asialoglicoproteínas, por hepatócitos, que

completam a degradação do CEA em aminoácidos e sacarídeos (revisto por Thomas *et al.*, 1990).

A relação entre a ligação de CEA ao CEAr nas células de Kupfer e o surgimento de metástases no fígado é corroborada pelo estudo de Tobi *et al.* (2011) com primatas da espécie *Saguinus oedipus* que, apesar de apresentarem câncer colorretal com alta frequência, não apresentam lesões metastáticas. Os autores observaram que esses animais apresentam alterações no CEA quando comparado ao CEA de humanos, como diminuição da glicosilação e modificação de aminoácidos na sequência relacionada à ligação ao CEAr. Além disso, os animais possuem uma expressão menor de CEAr em comparação aos humanos. Esses fatores em conjunto levariam a uma menor interação do CEA com o seu receptor e a uma menor retenção de células neoplásicas circulantes no fígado, o que, conseqüentemente, explicaria a ausência de metástase nesses animais.

Existe ainda outro fator relacionado ao papel do CEA no surgimento de metástases. Antes de sua degradação, sua ligação ao CEAr também ativa vias de transdução de sinal dependente de fosforilação de resíduos de tirosina, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL1- α , IL1- β , IL-6 e TNF- α (Gangopadhyay *et al.*, 1996; Gangopadhyay *et al.*, 1997). Interessantemente, o CEAr também está presente no núcleo, citoplasma e membrana de células de câncer de cólon e a ligação do CEA também resulta na fosforilação desse receptor (Laguinje *et al.*, 2005).

A indução, pelo CEA, da liberação de citocinas no fígado pelas células de Kupfer altera o microambiente dos capilares sinusóides, interferindo na habilidade das células endoteliais em interagir com as células tumorais invasoras produtoras de CEA. Segundo Gangopadhyay *et al.* (1996), a produção dessas citocinas poderia levar a um aumento na expressão de moléculas de adesão, que favoreceriam a retenção das células malignas no fígado. Os autores confirmaram essa hipótese posteriormente ao observarem que a presença das citocinas produzidas pelas células de Kupfer ativadas pelo CEA causava um aumento na expressão da molécula de adesão intercelular ICAM-1 e um aumento na adesão de células endoteliais a células cancerosas (Gangopadhyay *et al.*, 1998). Mais recentemente foi demonstrado que, além de *ICAM-1*, a expressão de outros genes codificadores para moléculas de adesão, como E-selectina, P-selectina e a molécula de adesão celular vascular (VCAM), também aumentam após produção de citocinas por células de Kupfer ativadas por células cancerosas (Kathib *et al.*, 2005).

O CEA também promove a sobrevivência de células metastáticas ao protegê-las contra efeitos citotóxicos de espécies reativas de oxigênio no microambiente dos

sinusóides. Jessup *et al.* (1999) relataram que a retenção de células tumorais circulantes nos sinusóides ocasionam um bloqueio do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, microinfartos no fígado e infiltração de células inflamatórias e que espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico gerados na reoxigenação são tóxicas para células tumorais com baixa capacidade de formação de metástases, mas não para células com alta capacidade. Isso ocorre porque as células com alta capacidade de formação de metástase provavelmente possuem um mecanismo de proteção. De fato, esses autores observaram posteriormente que o tratamento com CEA previne contra a toxicidade causada pelas ERO e pelo óxido nítrico, mesmo em células com baixa capacidade de metástase. O CEA ativa as células de Kupfer que produzem, além das citocinas pró-inflamatórias descritas anteriormente, a citocina anti-inflamatória IL-10, que inibe a expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e a produção dos ERO e do óxido nítrico, permitindo a sobrevivência das células malignas (Jessup *et al.*, 2004).

Além disso, foi descrito que a expressão de CEA em células de câncer colorretal e de câncer de mama é induzida por hipóxia, o que também auxilia na sobrevivência dessas células em um ambiente hostil de privação de oxigênio (Kokkonen *et al.*, 2007).

Diante do exposto, pode-se perceber que o CEA desempenha um papel fundamental na progressão tumoral e aparecimento de metástases. E é por isso que a sua detecção está relacionada com a presença de metástases no fígado em pacientes com câncer pancreático (Zhou *et al.*, 2012), no cérebro em pacientes com câncer de pulmão (Lee *et al.*, 2012), em linfonodos, fígado e baço em pacientes com câncer colorretal (Lin *et al.*, 2011; Pavlovic *et al.*, 2011), e em osso, cérebro e outros sítios em pacientes com câncer de mama (Yerushalmi *et al.*, 2012). Além disso, desde a descoberta do CEA, tanto sua forma ancorada como a solúvel vem sendo amplamente utilizadas ao longo dos anos como biomarcadores para diversos tipos de câncer (Thomson *et al.*, 1969; Martin *et al.*, 1976; Sakamoto *et al.*, 1987; Carriquiry & Piñeiro, 1999). O CEA é considerado um importante marcador tumoral para diagnóstico de câncer de pâncreas (Naito *et al.*, 2011), para monitoramento de recidiva de câncer gástrico (Kim *et al.*, 2011) e de pulmão (Nonaka *et al.*, 2004), da recidiva e da sobrevivência dos pacientes com câncer colorretal (Hu *et al.*, 2012) e da eficiência de resposta ao tratamento quimioterápico no câncer de mama metastático (Di Gioia *et al.*, 2011).

Devido às suas características, o CEA também vem sendo estudado como um alvo para tratamento e diagnóstico do câncer (Behr *et al.*, 2002; Schoffelen *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2011). O fato de ser superexpresso na grande maioria dos cânceres

colorretal, em câncer de mama e em diversos outros tipos de neoplasia, enquanto sua presença em tecidos normais é limitada, é bastante promissor para direcionamento de drogas ou agentes de contraste. Além disso, sua expressão difusa nas membranas basolaterais das células cancerosas em contraposição à expressão apenas na superfície luminal das células normais torna esse antígeno mais acessível para anticorpos anti-CEA administrados por via endo-venosa.

3. TERAPIAS E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER

Existem relatos da existência de tumores malignos em registros egípcios e babilônicos desde o século XV antes de Cristo e, desde então, busca-se a cura do câncer. Nos primórdios da terapia contra o câncer, a doença era tratada como úlcera devido à semelhança física em alguns casos, e os remédios utilizados eram principalmente sais de cobre, chumbo, enxofre e arsênio, além de cauterização, o que não apresentava bons resultados. Com o passar do tempo, no século I antes de Cristo, alguns estudiosos passaram a recomendar a remoção do tumor com uma faca, o que seria a pré-concepção da cirurgia, ainda hoje utilizada. No entanto, eles observavam que muitos pacientes morriam após esse procedimento, provavelmente porque na época não existiam técnicas adequadas de anestesia e prevenção contra infecções, nem o conhecimento anatômico necessário. Além disso, os tumores voltavam a crescer após sua remoção e todos concordavam que nem sempre um tumor era passível de ser removido, pois a remoção só deveria ser realizada se o tumor estivesse em estágios iniciais de crescimento e desde que não estivesse conectado a veias, artérias ou nervos (Sigerist, 1932).

Atualmente, a cirurgia, cuja evolução é evidente, ainda é amplamente utilizada e recomendada como tratamento para diversos tipos de câncer (Purushotham *et al.*, 2012; Wei & Harari, 2012). Na cirurgia, removem-se o tumor e suas margens com o objetivo de se eliminar todos os vestígios da neoplasia. No entanto, as margens cirúrgicas dependem da localização do tumor, que pode também não estar acessível. Além disso, é muito difícil que o cirurgião consiga remover cada uma das células malignas. Na maioria das vezes, o insucesso do tratamento cirúrgico está justamente relacionado com a permanência de células tumorais que não foram removidas ou ainda com o fato de que já existem micrometástases ainda não detectadas clinicamente no momento da cirurgia (Pohlmann & Schwartsmann, 2004).

Para aumentar a eficiência da cirurgia, utilizam-se atualmente terapias adjuvantes como, por exemplo, a radioterapia e a quimioterapia. A radioterapia pós-cirúrgica elimina as células remanescentes após a remoção do tumor. Mas ela também pode ser utilizada antes da cirurgia (terapia neoadjuvante) para a diminuição do tumor que será excisado (revisto por Baskar *et al.*, 2012).

Conforme a revisão dos autores, a radioterapia como um potencial tratamento do câncer surgiu na passagem do século XIX para o XX, com os estudos de Marie Curie com o elemento químico rádio e com a descoberta dos raios-X por Wilhelm Conrad Röntgen. Segundo Wood (1923), a radioterapia era, já no início do século XX, um tratamento efetivo para alguns tipos de tumor, além de um importante adjuvante para a remoção cirúrgica e um paliativo para tumores inoperáveis. Ainda hoje, a radioterapia é amplamente utilizada. Estimativas apontam que aproximadamente 50% dos pacientes com câncer serão submetidos a algum tipo de radioterapia como parte de um tratamento otimizado e desses pacientes, 23% necessitarão do tratamento novamente (Delaney *et al.*, 2005).

A radiação é um agente físico ionizante que, ao passar pelas células e tecidos, deposita energia, provocando danos no material genético e conseqüentemente a morte celular. Apesar de as células cancerosas serem mais suscetíveis aos efeitos da radiação do que as células normais, estas também são atingidas pela radiação, especialmente as que circundam o tecido neoplásico (Baskar *et al.*, 2012). Dessa forma, apesar de o sucesso da radioterapia em destruir completamente o tumor depender da dose total de radiação administrada, esta é limitada pela tolerância das células saudáveis vizinhas, o que muitas vezes leva a uma dose submáxima no tratamento (Barnett *et al.*, 2009). E mesmo tendo-se o cuidado de respeitar a dose adequada de radiação, estudos relatam diferentes efeitos adversos decorrentes da toxicidade da terapia, como pneumonite, fibrose, doença cardiovascular e mesmo o aparecimento de tumores secundários, que podem inclusive ocasionar a morte do paciente (Eldh *et al.*, 2012; Travis *et al.*, 2012).

Na tentativa de se explorar as vantagens de cada tipo de tratamento e evitar suas limitações, cada vez mais se utilizam combinações terapêuticas. O uso da quimioterapia pode, por exemplo, tornar as células tumorais mais suscetíveis aos efeitos da radioterapia, aumentando o índice terapêutico. A quimioterapia também é bastante utilizada após a cirurgia para explorar uma condição ótima de volume tumoral mínimo e cinética celular propícia, aumentando a probabilidade de cura (Pohlmann & Schwartzmann, 2004).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a quimioterapia é um tratamento que utiliza medicamentos, que podem ser administrados por diferentes vias (oral, endovenosa, subcutânea, tópica, entre outras), e que são levados pelo sangue a todas as partes do corpo, visando à destruição de células malignas do tumor e circulantes (Brasil, 2012d). Curas efetivas com drogas antitumorais já foram encontradas para linfomas, leucemias e câncer de testículo e, mesmo para os tumores incuráveis, existem agentes quimioterápicos que prolongam a vida e/ou aliviam sintomas dos pacientes (Alberts *et al.*, 2008).

Segundo a revisão de Shurin *et al.* (2012), a utilização da quimioterapia para o tratamento do câncer é historicamente posterior à radioterapia. A descoberta do primeiro agente quimioterápico ocorreu por acaso durante as guerras mundiais com a utilização do gás mostarda, que causava leucopenia profunda. Apenas em 1942, o gás mostarda foi testado em animais e pacientes com linfomas com resultados promissores. Foi a partir daí que se percebeu que o câncer também poderia ser tratado com agentes farmacológicos e uma enorme quantidade de estudos resultou na grande variabilidade de quimioterápicos disponíveis atualmente, como agentes alquilantes, taxanos, inibidores de microtúbulos entre outros (Ribeiro *et al.*, 2012).

No entanto, da mesma forma que a radioterapia, os agentes quimioterápicos causam danos não apenas às células malignas, mas também às saudáveis e por isso o maior problema da quimioterapia é a toxicidade aos tecidos normais e o surgimento de efeitos adversos, o que se torna mais evidente à medida que o tempo do tratamento aumenta (Ribeiro *et al.*, 2012). Isso porque, classicamente, os agentes quimioterápicos são ineficientes em discriminar células tumorais de saudáveis, pois agem principalmente em células com grande atividade proliferativa, o que não é exclusivo do tumor, e essa inespecificidade pode provocar a morbidade dos pacientes (Blanco *et al.*, 2011). Pelo fato de serem levadas pelo sangue a todas as partes do corpo, as drogas quimioterápicas podem causar uma toxicidade sistêmica, além de possuírem distribuição aleatória e rápida eliminação pelo organismo, o que exige a administração de doses altamente concentradas, aumentando os efeitos colaterais (Nie *et al.*, 2007).

Além disso, apesar da combinação entre essas terapias descritas se mostrar eficiente em vários casos, nem sempre ela é bem sucedida. Para o câncer colorretal, por exemplo, 20% dos pacientes apresentam metástase no fígado no momento do diagnóstico e são indicados para cirurgia, mas destes, somente 20% podem ser operados

e a taxa de sobrevivência em cinco anos é de apenas 25 a 40%, mesmo com quimioterapia adjuvante (Lorenz *et al.*, 2000 *apud* Mazzolinin *et al.*, 2007).

Por essas razões, métodos alternativos que apresentem maior especificidade para os tecidos neoplásicos e/ou possam ser utilizados como adjuvantes nas terapias convencionais têm sido, nas últimas décadas, um importante foco dos estudos científicos, como, por exemplo, a hipertermia.

A hipertermia, que consiste em um aumento da temperatura de parte ou de todo o corpo para 42-46°C, tem mostrado eficiente ação antitumoral (Yanase *et al.*, 1998), pois é um agente citotóxico eficaz especialmente para células em hipóxia, necessitadas de nutrientes e que estejam em ambiente de baixo pH (Franckena *et al.*, 2007), características comumente presentes em tumores. Além disso, a hipertermia induz uma resposta imune antitumoral (Shinkai *et al.*, 1999), reduz a detoxificação celular e a capacidade de reparo do DNA (Gori *et al.*, 2005), altera a expressão de genes relacionados à apoptose (Liang *et al.*, 2007) e torna os vasos sanguíneos mais permeáveis (Bahadur & Giri, 2003), aumentando a interiorização celular de drogas antitumorais, como a cisplatina (Gabano *et al.*, 2007). Por apresentar essas características, a hipertermia aumenta a radiosensibilização e a citotoxicidade de agentes quimioterápicos e, por isso, vem sendo utilizada eficientemente como tratamento adicional às terapias convencionais em diferentes tipos de câncer em estágio avançado, como câncer de reto recorrente, de pulmão, de mama, de útero, de cabeça e pescoço e de próstata (Matsumine *et al.*, 2007).

Além da hipertermia, com o progresso do conhecimento da biologia tumoral, novas terapias com alvos moleculares específicos e com capacidade para atuarem em processos críticos para as células malignas vem sendo estudadas e desenvolvidas. Entre elas, bloqueio da angiogênese, terapias hormonais (Puhalla *et al.*, 2012), oligonucleotídeos *antisense* para alterar a expressão de determinadas proteínas (Spugnini *et al.*, 2011) e inibidores de receptores de crescimento, que podem ser inibidores da via de transdução de sinal relacionada ao receptor, ou anticorpos que impeçam a ligação do receptor ao fator de crescimento (Pohlmann & Schwartzmann, 2004).

Atualmente, anticorpos monoclonais terapêuticos constituem um dos setores de maior crescimento da indústria farmacêutica. Entre eles, os produtos para o câncer são os que lideram o mercado (Kim *et al.*, 2005). A terapia para o câncer com base em anticorpos vem sendo estabelecida nas últimas duas décadas e tem se mostrado uma

estratégia bem sucedida no tratamento dos pacientes (Scott *et al.*, 2012). Alguns anticorpos terapêuticos já foram, inclusive, aprovados para uso em pacientes pela agência norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*), como o Rituxan (rituximab - anti-CD20, para tratamento de linfoma), o Herceptin (Trastuzumab - anti-HER2, para tratamento do câncer de mama), o Erbitux (cetuximab – anti-EGFR, para tratamento de câncer de cabeça e pescoço ou de cólon), entre outros (Hoff *et al.*, 2004; Wu & Senter, 2005).

Entretanto, apesar de os anticorpos demonstrarem habilidades terapêuticas, um tratamento concomitante com drogas citotóxicas é geralmente requerido para uma eficiência clínica significativa (Paschetto *et al.*, 2011). Segundo os autores, a observação desse fato ocasionou o estudo e desenvolvimento dos imunocombinados: anticorpos com alvos moleculares presentes no tecido tumoral associados a agentes citotóxicos, a isótopos radioativos (radioimunocombinados) ou a toxinas bacterianas ou de plantas (imunotoxinas).

Segundo Blanc *et al.* (2011), apesar de exemplos bem-sucedidos, não é apenas o desenho racional de uma droga direcionada às células tumorais que garantirá sua eficiência terapêutica contra o câncer, pois existem muitas barreiras para a chegada da droga ao seu alvo. Os autores citam o sistema fagocítico mononuclear (ou sistema retículo-endotelial – RES), o acúmulo da droga em órgãos saudáveis, gradientes de pressão intersticial, e fluxo sanguíneo anormal no microambiente tumoral. Além disso, há a grande densidade do tecido tumoral, alterações na membrana das células cancerosas, e as limitações do próprio fármaco, como solubilidade e estabilidade (revisto por López-Dávila *et al.*, 2012).

Independentemente de qual terapia será administrada, a detecção precoce do câncer está intimamente relacionada a um melhor prognóstico da doença (Kendall *et al.*, 2010) e a uma maior possibilidade de cura (Wajed, 2010). No câncer colorretal, por exemplo, a taxa de sobrevida livre da doença em cinco anos diminuiu quando a neoplasia é diagnosticada em estágios mais avançados (revisto por Bunger *et al.*, 2011). Da mesma forma, para o câncer de mama, quanto mais tardio o estágio da doença no momento do diagnóstico, menor a taxa de sobrevida (Cancer Reserach UK, 2011).

De fato, nos Estados Unidos, entre os anos de 1990 e 2008, houve uma redução na taxa de mortalidade por câncer de 15,3% entre as mulheres e de 22,9% entre os homens, o que foi relacionado com melhores técnicas de detecção precoce e/ou

tratamento, especialmente para os cânceres colorretal, de mama e de próstata (Siegel *et al.*, 2012).

Em geral, os métodos de detecção precoce são simples, como exame clínico, ultrassonografia, autoexame das mamas e dos testículos, exame preventivo papanicolau, mamografia, colonoscopia, entre outros (Brasil, 2012e). No entanto, o diagnóstico precoce ainda é um desafio porque os sintomas clínicos raramente se manifestam antes do câncer progredir para um estágio fatal. Por isso, técnicas cada vez mais avançadas estão sendo desenvolvidas e entre elas, destacam-se aquelas de detecção por imagem, que podem ser utilizadas não apenas no rastreamento, mas também no direcionamento de biópsias para diagnóstico, para detecção de metástases ou tumores secundários decorrentes da radioterapia, para planejamento de tratamento e no monitoramento da recorrência da doença (revisto por Pericleous *et al.*, 2012; Phulpin *et al.*, 2012).

Atualmente existem seis técnicas de detecção de tumor por imagem: ultrassom, ressonância magnética (RM), raio-X (filme e tomografia computadorizada - CT), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), tomografia por emissão de pósitrons (PET) e imagem óptica (por absorção ou espalhamento de luz). Dessas, apenas quatro são capazes de detectar tridimensionalmente tumores em qualquer localização do corpo humano: RM, CT, SPECT e PET. No presente trabalho, tanto a SPECT como a RM foram utilizadas.

A SPECT é uma técnica que tem como base a detecção de radiação gama emitida pelo material que se deseja avaliar. Para isso, um agente contendo um isótopo radioativo (geralmente tecnécio ^{99}Tc , iodo ^{123}I ou índio ^{111}In) deve ser injetado no paciente. Esse agente, após distribuir-se no organismo, emitirá a radiação que será detectada em vários ângulos por câmaras gama capazes de fazerem uma varredura de 360° no paciente. As várias imagens são então reconstruídas em 3-D (revisto por Conway, 2012).

Já no equipamento de RM, há um gradiente de campo magnético gerado ao redor do material sob investigação, que alinha os *spins* nucleares não pareados, também chamados de dipolos magnéticos. O equipamento também emite pulsos de radiofrequência que, momentaneamente, mudam o alinhamento *dos spins*. Quando, após o pulso, os dipolos magnéticos retornam à posição alinhada (relaxamento), um *scanner* detecta o tempo de relaxamento e o traduz em um sinal de RM. Como em diferentes ambientes físico-químicos os dipolos tem tempos de relaxamento diferentes, materiais diferentes apresentam sinais de RM diferentes (revisto por Massoud *et al.*, 2003).

Apesar de o uso de agentes de contraste nas técnicas de imagem auxiliar bastante na detecção do tumor, especialmente quando estes são desenvolvidos com moléculas direcionadoras a biomarcadores tumorais (Weissleder, 2002; Massoud & Gambhir, 2003), muitos agentes de contraste que são amplamente utilizados na clínica, como o gadolínio, são potencialmente tóxicos (Caravan *et al.*, 1999).

Além disso, todas as técnicas tridimensionais disponíveis apresentam limitações na sensibilidade e/ou resolução para a detecção de câncer nos estágios iniciais, ou seja, com um número mínimo de células. Considera-se que o ideal seria a detecção antes que o tumor chegasse à fase angiogênica (em torno de 10^5 células). No entanto, as técnicas possuem uma resolução de detecção de tumor sólido de 10^9 células crescendo como uma massa única (Frangioni, 2008), o que inviabiliza essa detecção ideal e também a de micrometástases.

Para superar as limitações das terapias antitumorais e melhorar a resolução das técnicas de diagnóstico por imagem, a nanobiotecnologia vem sendo bastante utilizada.

4. NANOBIOLOGIA E CÂNCER

O termo nanotecnologia refere-se à criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas por meio do entendimento e controle da matéria em escala nanométrica. Nos materiais nanométricos, surgem propriedades físicas (térmicas, ópticas, elétricas), químicas e biológicas diferentes das existentes para materiais em escalas micro ou macroscópicas, além de a razão superfície/volume ser extremamente maior, o que os torna bastante reativos. Tais características únicas permitem uma infinidade de aplicações nos mais diversos campos, como eletrônica, engenharia de alimentos, sensores químicos, biologia, medicina, entre outras (Bystrzejewski *et al.*, 2007; Ranganathan *et al.*, 2012). A versatilidade da aplicação dos nanomateriais reflete a sua variabilidade quanto à natureza (por exemplo, metais, semicondutores, polímeros), quanto à forma (tubos, esferas, prismas) e quanto à estrutura (dendrímeros, lipossomas, nanocápsulas) (Fortina *et al.*, 2007).

A aplicação da nanotecnologia na área biológica é denominada nanobiotecnologia e vem se mostrando bastante promissora nos sistemas de entrega de drogas e de diagnóstico e no desenvolvimento de novos fármacos e nanorobôs para cirurgias (Jain, 2010). Nos últimos anos, a nanobiotecnologia vem contribuindo para a

superação das limitações no tratamento e no diagnóstico de diferentes doenças, incluindo o câncer.

No que concerne ao tratamento do câncer, alguns problemas, como o fato de muitas drogas serem lipossolúveis e apresentarem baixa biodisponibilidade, podem ser resolvidos com o uso de carreadores nanoestruturados (Wang *et al.*, 2010). Yang *et al.* (2012b) relataram um aumento de 2000 vezes na solubilidade em água do docetaxel, um agente anti-neoplásico hidrofóbico, quando este foi associado a nanopartículas biopoliméricas. Além disso, dependendo das características da cobertura desses nanocarreadores, é possível aumentar o tempo de circulação da droga na corrente sanguínea e manter sua liberação sustentada. Nanopartículas magnéticas recobertas com monooleato de glicerol, por exemplo, ao serem associadas ao paclitaxel, aumentaram a meia vida da droga de cinco horas (droga livre) para mais de 15 horas (Singh *et al.*, 2011). Características como boa biodisponibilidade e tempo de circulação prolongado permitem um acúmulo seletivo da droga no tumor. Esse acúmulo deve-se ao efeito da retenção e permeabilidade aumentada (efeito EPR). O efeito EPR ocorre porque, devido à rápida proliferação do tumor, as células endoteliais acompanham esse crescimento acelerado, com um número mínimo de pericitos, o que cria uma vasculatura tumoral fraca, com poros de até algumas centenas de nanômetros, que permitem a difusão de nanopartículas no tumor. Além disso, o sistema alterado e reduzido de drenagem linfática nos tumores contribui para essa retenção, que é denominada de acúmulo passivo (Maeda *et al.*, 2003; López-Dávila *et al.*, 2012).

Além do acúmulo passivo, o uso de nanocarreadores permite aumentar ainda mais o acúmulo da droga no local de interesse se o direcionamento for ativo, ou seja, se houver, no nanocarreador, uma molécula direcionadora, como, por exemplo, um anticorpo monoclonal (Hapca-Cirstoiu *et al.*, 2009). A elevada área de superfície dos materiais nanoestruturados permite a ligação de várias moléculas direcionadoras. Já foram aprovados, para o uso clínico, diferentes sistemas de entrega de drogas baseados em materiais nanoestruturados associados a anticorpos, como Zevalin e Ontak, que são utilizados para linfoma não-Hodgkin e linfoma de célula T, respectivamente (revisto por Lammers *et al.*, 2010).

Aumentando a biodisponibilidade da droga e o acúmulo da mesma no tumor, a nanotecnologia se destaca por propiciar um aumento na eficácia terapêutica e uma redução na toxicidade da terapia em tecidos saudáveis (Werner *et al.*, 2012). Existem vários tipos de nanocarreadores que podem ser utilizados para se alcançar esses

objetivos, como lipossomas (Carneiro *et al.*, 2011; Server *et al.*, 2011), dendrímeros (Ward *et al.*, 2011), nanotubos de carbono (Ji *et al.*, 2012) e nanopartículas, que podem ser poliméricas (Yang *et al.*, 2012b) ou metálicas, como as magnéticas (Singh *et al.*, 2011).

Além de grandes melhorias na terapêutica do câncer, a nanotecnologia vem contribuindo também para as técnicas de diagnóstico por imagem. Pelos mesmos motivos descritos anteriormente, nanomateriais acumulam passiva ou ativamente no tumor melhorando a eficácia das técnicas de imagem. Em exames de tomografias por emissão de pósitron, o uso de lipossomas nanoestruturados contendo o elemento radioativo apresentou uma meia vida ideal para permitir o acúmulo no tumor sem, no entanto, aumentar o *background* (Petersen *et al.*, 2012). Nanotubos de carbono também se mostraram eficientes em promover a detecção por fluorescência em tecidos profundos mesmo com baixa dosagem (Yi *et al.*, 2012). Nesse tipo de diagnóstico, além dos nanotubos, os *quantum dots* oferecerem muitas vantagens, como aumento da fluorescência e da fotoestabilidade, permitindo a detecção da imagem em um período de tempo muito maior que os fluoróforos convencionais (revisto por Pericleous *et al.*, 2012).

Já as nanopartículas de ferro vêm sendo utilizadas com sucesso como agentes de contraste na ressonância magnética para detecção de tumores primários e metástases em linfonodos (Lim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

As nanopartículas de ferro magnéticas apresentam muitas características promissoras. Além de serem importantes agentes de contraste na ressonância magnética, podem se apresentar como agentes de imagens multifuncionais ou de diagnóstico, ou seja, apresentando simultaneamente propriedades para diagnóstico e terapias, conforme descrito a seguir.

4.1. Nanopartículas Magnéticas

Nanopartículas magnéticas (NPM) podem ser constituídas de diferentes ferritas, como as de ferro, manganês, zinco e cobalto, sendo as mais comuns as de óxidos de ferro magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Devido ao tamanho em escala nanométrica, as nanopartículas de ferro exibem propriedades magnéticas diferentes dos materiais em escala micro ou macroscópicas. Em tamanhos variando entre 10 e 20 nm, cada nanopartícula se torna um domínio magnético único e apresenta características

superparamagnéticas, comportando-se como um átomo gigante paramagnético que responde rapidamente a um campo magnético, mas com magnetismo residual e coercividade quase nulas. As nanopartículas de ferro utilizadas na nanobiotecnologia recebem uma cobertura que tem como objetivo estabilizá-las e também propiciar uma funcionalização dependendo da aplicação desejada (Gupta & Gupta, 2005; Lu *et al.*, 2007).

Para a aplicação na nanomedicina, as NPM necessitam de uma cobertura biocompatível e que proteja contra a degradação em um ambiente fisiológico. Várias moléculas tem proporcionado essas características, como o ácido dimercapto-succínico (DMSA) (Valois *et al.*, 2010) e diferentes polímeros (Arsalani *et al.*, 2012; Akbarzadeh *et al.*, 2012), que permitem ainda a ligação química de moléculas direcionadoras como, por exemplo, anticorpos monoclonais (Acharya *et al.*, 2009).

Uma vez biocompatíveis, as NPM tem um vasto campo de aplicação biomédica e vem sendo amplamente utilizadas no tratamento e diagnóstico do câncer. NPM estão sendo utilizadas como carreadores de quimioterápicos (Carneiro, *et al.* 2011; Estevanato *et al.*, 2011) e em terapia fotodinâmica (Primo *et al.*, 2008). Além disso, devido ao núcleo de ferro, as NPM são adequadas para o tratamento por magnetohipertermia. Quando submetidas a um campo magnético alternado, elas liberam energia térmica, gerando o aquecimento local e levando à morte das células malignas e a uma redução no volume tumoral (Guedes *et al.*, 2005; Balivada *et al.*, 2010; Portilho *et al.*, 2010).

O fato de possuírem um núcleo de ferro magnético permite que as NPM também sejam utilizadas no diagnóstico do câncer por meio de ressonância magnética (RM), apresentando altas sensibilidade e resolução, além de penetração ilimitada em tecidos biológicos (revisto por Yigit *et al.*, 2012). Com essas características, além de serem utilizadas na detecção não invasiva de câncer e metástases (Li *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2011a), podem atuar na terapia guiada por imagem (Cheng *et al.*, 2012) e em métodos especiais de RM, como *ultrashort echo time imaging*, que aumenta ainda mais o contraste (Girard *et al.*, 2011) e permite a quantificação de ferro nos tecidos (Zhang *et al.*, 2011). Além de todas essas vantagens, as NPM são mais biocompatíveis e apresentam um maior tempo de circulação do que o gadolínio, o agente de contraste mais comumente usado na clínica médica (Kim *et al.*, 2011).

De uma forma bastante interessante, as NPM também podem ser multifuncionais no diagnóstico do câncer. Todas as MNP são, por natureza, adequadas ao uso na RM e podem ainda ser modificadas para serem utilizadas em outras metodologias, como a

tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), pela ligação de elementos radioativos como o tecnécio, permitindo maior visualização do tecido e propiciando informações estruturais e funcionais mais detalhadas (Misri *et al.*, 2011; Madru *et al.*, 2012)

Tanto funções terapêuticas como de diagnóstico podem, portanto, ser simultaneamente oferecidas pelo uso de NPM e por isso elas são consideradas como promissoras precursoras de diagnóstico, especialmente porque podem combinar o direcionamento magnético (Cheng *et al.*, 2012; Hua *et al.*, 2011) com o biológico para a detecção de tumores (Lim *et al.*, 2011b; Taylor *et al.*, 2011; Quan *et al.*, 2010) e células tumorais circulantes (Galanzha *et al.*, 2009), aumentando a detecção de micrometástases.

Diante do exposto, pode-se perceber que o direcionamento ativo de agentes terapêuticos ou de contraste é extremamente interessante. Além disso, sistemas nanoestruturados multifuncionais, que possuam simultaneamente propriedades terapêuticas (magnetohipertermia e entrega seletiva de drogas) e de contraste (detecção por imagem), podem aumentar a eficiência e a especificidade do tratamento e do diagnóstico do câncer (Yang *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Considerando-se a importância de se desenvolver terapias com maior especificidade para os tecidos neoplásicos e, conseqüentemente, com menos efeitos colaterais, e ainda a relevância da detecção precoce para um melhor prognóstico da doença e para a maior possibilidade de cura, o objetivo geral deste estudo consistiu em desenvolver fluido magnético constituído de nanopartículas de maghemita conjugadas a anticorpos anti-CEA e avaliar seu potencial para detecção e tratamento do câncer.

Para tal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Escolher modelo de estudo constituído de tecido tumoral que apresentasse marcador de superfície reconhecido por um anticorpo específico;
2. Avaliar a toxicidade *in vitro* do fluido magnético a ser utilizado na conjugação do anticorpo, por meio de teste de MTT;
3. Conjugar o anticorpo escolhido (anti-CEA) às nanopartículas do fluido magnético e confirmar essa conjugação, por meio de espectroscopia Raman;
4. Caracterizar o fluido com nanopartículas conjugadas ao anticorpo, por meio de espalhamento de luz dinâmico;
5. Avaliar a especificidade do fluido com nanopartículas conjugadas ao anticorpo a tecidos tumorais, por meio de estudos de ligação e interiorização de nanopartículas pelas células alvo (ELISA, coloração de Perls e microscopia eletrônica de transmissão);
6. Avaliar a toxicidade *in vitro* do fluido com nanopartículas conjugadas ao anticorpo, por meio de MTT e análise de ultraestrutura celular;
7. Avaliar a biodistribuição das nanopartículas conjugadas ao anticorpo em camundongos portadores de tumor, por meio de marcação radioativa dos fluidos e subsequente contagem da radioatividade em órgãos e tumores coletados 24h após injeção intraperitoneal e intravenosa do fluido;
8. Avaliar o acúmulo das nanopartículas conjugadas ao anti-CEA no tumor após diferentes tempos de tratamentos intraperitoneal ou intravenoso, por meio de análise

histológica dos tumores e de técnicas de imagem, como tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e ressonância magnética;

9. Avaliar o potencial dos fluidos em serem utilizados no diagnóstico por imagem, por meio de testes de ressonância magnética, tomografia computadorizada (CT) e SPECT.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE ESTUDO

Para a realização deste trabalho, foi necessário o estabelecimento de um modelo constituído de células tumorais que apresentasse um biomarcador de superfície (reconhecido por um anticorpo específico), além de células controle (não reconhecidas por esse mesmo anticorpo). Para isso, foram testadas diferentes combinações de células tumorais e anticorpos, por meio de diferentes técnicas, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Linhagens de câncer colorretal humano e de mama murino e humano submetidas aos ensaios de ELISA, imunofluorescência e imuno-histoquímica para detecção de diferentes biomarcadores tumorais de superfície.

Linhagens celulares	Marcador	Metodologia
Adenocarcinoma colorretal humano (HT-29)	Antígeno carcinoembrionário (CEA)	ELISA
Adenocarcinoma colorretal humano (HT-29)	Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Imunofluorescência
Carcinoma colorretal humano (HCT116)	Antígeno carcinoembrionário (CEA)	ELISA
Adenocarcinoma colorretal humano (LS174T)	Antígeno carcinoembrionário (CEA)	ELISA
Adenocarcinoma colorretal humano (LS174T)	Antígeno Carboidrato (CA-19.9)	Imunofluorescência
Carcinoma Mamário murino (4T1)	Receptor de estrógeno (ER)	Imuno-histoquímica
Carcinoma Mamário murino (4T1)	Receptor de progesterona (PR)	Imuno-histoquímica
Carcinoma Mamário murino (4T1)	Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Imuno-histoquímica
Tumor Ascítico de Erlich - mama murino (TAE)	Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Imunofluorescência
Tumor Sólido de Erlich - mama murino (TSE)	Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Imuno-histoquímica
Tumor Sólido de Erlich – mama murino (TSE)	Receptor de crescimento epidermal (c-erb)	Imuno-histoquímica
Adenocarcinoma mamário humano (MCF-7)	Receptor de estrógeno (ER)	ELISA

1.1. Manutenção e propagação das células HT-29, LS174T e HCT116

As linhagens de células de câncer colorretal humano HT-29 e LS174T foram gentilmente cedidas pelo Dr. Fernando Kreutz, FKBiotech, Rio Grande do Sul, e a linhagem de carcinoma colorretal humano HCT116, pelo Dr. Jose Morgado Díaz, INCA, Rio de Janeiro.

As células HT-29, LS174T e HCT116 foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO-BRL) e tamponado com bicarbonato de sódio (Sigma), sendo o pH 7,4 ajustado pela adição de HCl. As culturas foram estabelecidas a partir de uma passagem inicial de 10^5 células em frascos de cultura de poliestireno de 25 cm^2 , ou 2×10^5 células em frascos de 75 cm^2 , e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e 80% de umidade. Uma vez atingidos 80 – 90% de confluência, as células eram soltas do fundo do frasco de cultura por tratamento com solução de tripsina 0,125% / EDTA 0,02% por três minutos, centrifugadas a 175 g por 10 min., contadas em câmara de Neubauer e passadas para novo frasco de cultura.

1.2. Manutenção e propagação das células MCF-7 e 4T1

As células MCF-7 foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC® HTB-22TM) e as células 4T1 foram gentilmente cedidas pela Dra. Suzanne Ostrand-Rosenberg, Universidade de Baltimore; Maryland–EUA. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico e mantidas e propagadas nas mesmas condições que as células HT-29, LS174T e HCT116, conforme descrito no item 1.1 do capítulo Material e Métodos.

1.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

O TAE foi obtido de acordo com os procedimentos já realizados no laboratório Nanogem da Universidade de Brasília (Portilho, 2011), pelo transplante de 10^6 células tumorais retiradas de um camundongo portando a neoplasia (Figura 1a) para o peritônio de um camundongo receptor (Figura 1b). Em até 7 dias o camundongo receptor desenvolveu o TAE.

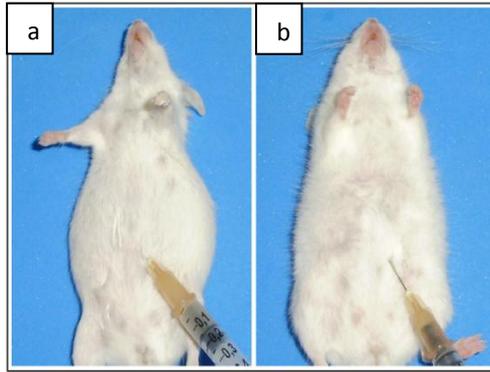


Figura 1. Obtenção do tumor de Ehrlich ascítico. (a) As células tumorais foram retiradas do camundongo doador e (b) inoculadas no peritônio do camundongo receptor. Adaptado de Portilho, 2011.

1.4. Tumor Sólido de Ehrlich (TSE)

O TSE foi induzido pela inoculação de células na orelha do camundongo receptor (Portilho, 2011) e, depois de fixado, desidratado, diafanizado e incluído em parafina, foi gentilmente cedido pela Dra. Flávia Arruda Portilho para a realização dos experimentos de imuno-histoquímica.

1.5. ELISA

A técnica de ELISA foi utilizada para se avaliar a expressão de CEA nas linhagens HT-29, HCT116 e LS174T e a expressão de RE na linhagem MCF-7. Para isso, foi utilizado o protocolo descrito por Chen *et al.* (2007), com modificações. As células foram semeadas em uma placa de cultura de 96 poços (10^4 células por poço) e cultivadas por 24 h. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas com paraformaldeído (4% em PBS) por 10 min. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e uma solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBS) foi adicionada aos poços durante 24 h. No dia seguinte, foi adicionado o anticorpo primário de coelho anti-CEA (DAKO). O anti-CEA não ligado foi removido em três lavagens com PBS e as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina por 1h. Após duas lavagens com PBS e uma lavagem com tampão de fosfatase alcalina – APB (100 mM tris HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$), o substrato pNPP (para-nitrofenilfosfato) foi adicionado por 30 min e a

absorbância foi lida a 405 nm no equipamento SpectraMax M2 (Molecular Device, EUA). Como controle negativo, o PBS foi utilizado em substituição ao anti-CEA.

1.6. Imunofluorescência

Foram testados dois protocolos de imunofluorescência, um em microtubo de 2 mL e outro em placa de cultura de 6 poços. Para o primeiro protocolo, 2×10^6 células em suspensão (PBS) foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 10 min e em seguida centrifugadas por 3 min a 3000 g para a retirada do sobrenadante. O sedimento foi lavado duas vezes com PBS a solução de bloqueio (5% de leite desnatado em PBS) foi adicionada. Após 20 min de incubação com a solução de bloqueio, as células foram lavadas duas vezes em PBS, após centrifugação para a retirada do sobrenadante. O anticorpo conjugado com FITC (anti-CEA ou anti-CA19.9) foi então adicionado (10 $\mu\text{g/mL}$). Após 2 h de incubação no escuro, as células foram lavadas duas vezes em PBS e colocadas em lâminas de microscopia previamente tratadas com poli-L-lisina e após adição de solução anti-fading, as lâminas foram montadas com lamínulas.

Para o protocolo da placa de cultura, as células foram transferidas para os poços contendo lamínulas de microscopia previamente adicionadas, onde cresceram aderidas por 24 h. No dia seguinte, as lamínulas com as células foram retiradas dos poços e transferidas para uma placa de Petri de vidro para a fixação das células em acetona gelada por 10 min. Após a fixação, seguiu-se o protocolo descrito para microtubo de 2 mL.

1.7. Imuno-histoquímica

Foram feitos cortes do TSE de 5 μm em micrótomo e estes foram colocados em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinizados em xileno e hidratados em soluções de etanol com concentrações decrescentes, até 40%. Depois de os cortes serem lavados em água, foi realizado o bloqueio da peroxidase por meio da incubação das lâminas em uma solução de metanol com peróxido de hidrogênio por 17 min. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas em água corrente e realizou-se a etapa da recuperação antigênica em tampão citrato (1 ng/mL) sob pressão e temperaturas elevadas (as lâminas mergulhadas em tampão citrato foram colocadas em uma panela de pressão por 1,5 min (para a detecção de CEA ou c-erb) ou 5 min (para a

detecção de ER ou PR). As lâminas foram então colocadas em temperatura ambiente, esperou-se 30 min e as lâminas foram lavadas em água corrente. Depois, as lâminas foram incubadas em solução de bloqueio (3% de leite desnatado em PBS) por 30 min e em seguida com o anticorpo primário em câmara úmida a 4 °C até o dia seguinte.

No dia seguinte, as lâminas, a temperatura ambiente, foram lavadas 3 vezes em PBS contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) por 10 min cada lavagem e foi utilizado o sistema de biotina/estreptavidina + peroxidase (DAKO): o anticorpo secundário (*Biotinylated link universal* - DAKO) foi adicionado. Após incubação com o anticorpo secundário por 20 min, o complexo Streptavidin-HRP (DAKO) foi adicionado. Após lavagem das lâminas com PBS, o substrato (*DAKO liquid DAB + substrate chromogen system* - DAKO) foi adicionado. Após 10 min, a reação foi interrompida com água destilada e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina (Mayer). Como controle negativo, o PBS foi utilizado em substituição ao anticorpo primário.

2. MODELO DE CÂNCER DE INTESTINO – ESTUDO *IN VITRO*

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizou-se como modelo *in vitro* de câncer de intestino humano as células de adenocarcinoma colorretal LS174T (positivas para o biomarcador CEA) e as células de carcinoma colorretal HCT116 (controle negativo), que foram cultivadas de acordo com o procedimento descrito no item 1.1. do capítulo Material e Métodos.

2.1. Fluidos Magnéticos

Foram sintetizadas, a partir do mesmo protocolo, duas amostras de fluidos magnéticos compostos por partículas de maghemita recobertas por ácido dimercapto-succínico (DMSA). O primeiro, denominado FMa, foi sintetizado no Instituto de Física da Universidade de Brasília por Luciana Guilherme, com as nanopartículas dispersas em água. O segundo, denominado FM_s, foi sintetizado no Instituto de Química da Universidade de Goiânia por Lincoln de Souza, com as nanopartículas dispersas em solução salina.

Para a obtenção dos fluidos, nanopartículas de magnetita foram obtidas misturando-se soluções aquosas de cloreto férrico e cloreto ferroso na proporção 2:1 em

solução aquosa de amônia concentrada, sob agitação vigorosa. As nanopartículas de magnetita foram oxidadas a maghemita por meio de oxigênio medicinal sob aquecimento (95 °C) por 5 h e, em seguida, adicionou-se uma solução de DMSA em uma razão molar DMSA/Fe de 10%. No caso do FMs, o cloreto de sódio foi adicionado para se alcançar uma concentração salina de 0,9%. O pH foi ajustado para 7,2 – 7,4.

Os fluidos foram caracterizados quanto à concentração de ferro total (por absorção atômica) e quanto ao diâmetro médio por difração de raio-X (difratômetro de raio-X Shimadzu XRD 6000) e a partir desses resultados a concentração de nanopartículas foi estimada. O valor médio do diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das nanopartículas foram determinados por espalhamento de luz (zetاسizer Nano Malvern)

Para a escolha de qual fluido seria utilizado nos experimentos *in vitro*, pequenas alíquotas dos fluidos FMA e FMs foram conjugadas com anticorpo e avaliadas quanto à sedimentação e agregação das nanopartículas após o processo da conjugação.

2.2. Conjugação do anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário às nanopartículas

A conjugação do anticorpo policlonal de coelho anti-antígeno carcinoembrionário (anti-CEA) (Diagnostic BioSystems - DBS) às nanopartículas do FMA e do FMs foi realizada de acordo com o método da ligação de EDC/NHS (Figura 2). EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) é uma carbodiimida que facilita a conjugação direta de grupos carboxil (presentes no DMSA) em grupos aminas (presentes no anticorpo). O EDC reage com o grupo carboxil do DMSA, formando um intermediário (O-acilisourea) que é facilmente removido por um ataque nucleofílico das aminas primárias do anticorpo. A amina primária forma uma ligação amida com o carboxil e o subproduto de EDC é liberado em forma de um derivado solúvel de uréia. Essa conjugação é mais eficiente em pH 4,5. Já o NHS (N-hydroxysuccinimide) é adicionado para aumentar a eficiência da conjugação e permitir que ela ocorra em pH fisiológico. O EDC favorece a ligação dos grupos carboxil com o NHS, formando um éster de NHS que é mais estável que o O-acilisourea, permitindo uma conjugação mais eficiente e uma ligação amida estável (Thermo Scientific – Pierce Protein, 2010).

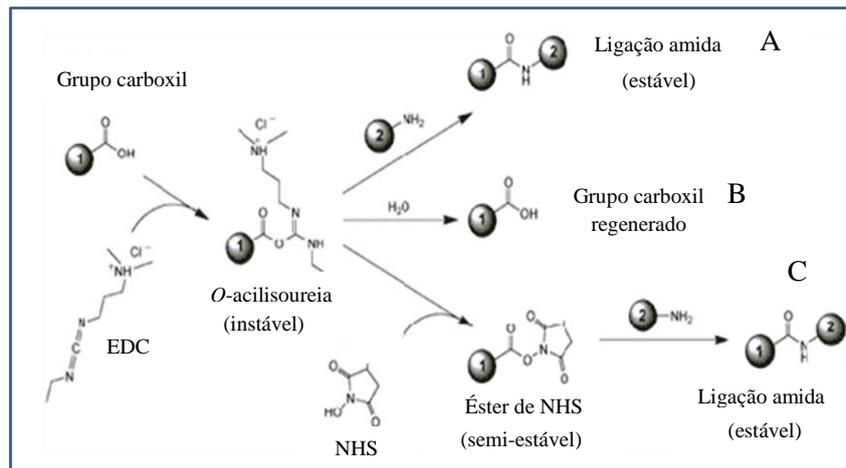


Figura 2. Reação química entre os grupos carboxil e amina mediada por EDC e NHS. O EDC reage com o grupo carboxil da molécula 1 e forma um intermediário (*O*-acilisourea) que pode reagir com a amina da molécula 2, resultando em uma ligação amida estável (A). Entretanto esse intermediário também é suscetível à hidrólise, o que o torna instável na solução aquosa utilizada para a conjugação do anticorpo e resulta na regeneração do grupo carboxil (B). A adição de NHS estabiliza o intermediário capaz de reagir com a amina, aumentando a eficiência do EDC em mediar a ligação química entre grupos carboxil e amina (C). Adaptado de Thermo Scientific – Pierce Protein, 2010.

O protocolo utilizado foi o descrito por Acharya *et al.* (2009), com algumas modificações: 1,5 mL de EDC (1 mg/mL em PBS) e 1,5 mL de NHS (1 mg/mL em PBS) foram adicionados a 30 mL de PBS contendo um volume de fluido correspondente a 60 mg de NPMs dos fluidos FMa ou FM. As misturas foram colocadas sob agitação por 4 h a temperatura ambiente e em seguida submetidas a uma série de três centrifugações a 20000 rpm por 40 min, a temperatura ambiente (Hitachi, modelo CR22G/CR21G) para a remoção do excesso de EDC e NHS. Os sedimentos resultantes foram dispersos em 2 mL de PBS e alíquotas de 500 μ L de cada suspensão (denominadas FMaEN e FMEN) foram reservadas para testes posteriores. Aos 1,5 mL restantes, o anticorpo anti-CEA foi adicionado em uma concentração final de 200 μ g/mL. As suspensões foram novamente mantidas sob agitação por 2 h a temperatura ambiente e em seguida incubadas a 4 °C até o dia seguinte. O excesso de anticorpo não ligado às nanopartículas foi removido por uma série de três centrifugações a 20000 rpm por 40 min (Hitachi, modelo CR22G/CR21G). Os sobrenadantes resultantes das centrifugações foram guardados para testes posteriores. As nanopartículas conjugadas ao anti-CEA foram dispersas em 1 mL de PBS e os fluidos resultantes foram denominados de FMaCEA ou FMCEA.

2.3. Comparação entre fluidos FMaCEA e FMsCEA

Os fluidos recém-conjugados ao anti-CEA foram avaliados quanto à agregação de suas nanopartículas por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Diferentes diluições de FMa, FMaCEA, FMs e FMsCEA foram colocadas em telas de microscopia recobertas com formvar e examinadas utilizando-se um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japão).

2.4. Avaliação da citotoxicidade do fluido magnético FMs sobre as células de câncer colorretal humano LS174T e HCT116

O fluido FMs, escolhido para a realização dos experimentos *in vitro*, foi avaliado quanto a sua citotoxicidade, por meio do ensaio de MTT (3 (4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), realizado em triplicata.

Para a realização do MTT, as células LS174T e HCT116 foram sedimentadas em placas de 96 poços e, no dia seguinte, foram cultivadas por 5, 12, 24 ou 48 h em 200 μ L de uma mistura de 150 μ L de meio de cultura e 50 μ L de PBS contendo o fluido FMs em diferentes concentrações de ferro, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos com FMs adicionados a 150 μ L de meio de cultura para a avaliação da citotoxicidade do fluido FMs sobre as células LS174T e HCT116.

Concentração de Ferro (μ g/mL de meio de cultura)	Diluição do FMs em PBS a ser utilizada	Volume do FMs diluído (μ L)	Volume de PBS (μ L)
0,1	1:1000	1,2	48,8
1	1:1000	11,2	38,2
5	1:100	5,9	44,1
10	1:100	11,8	38,2
30	1:100	35,3	14,7
60	1:10	7,1	42,9
80	1:10	9,4	40,6

O controle negativo consistiu de células cultivadas, pelos mesmos períodos, com a mistura contendo 50 µL de PBS sem FMs e os positivos, de 50 µL de PBS contendo duas concentrações de peróxido de hidrogênio (0,1 e 0,5 mM finais no volume total de 200 µL). A concentração inicial de células sedimentadas foi de 2×10^4 células/poço para os tratamentos de 5 e 12 h e de 10^4 células/poço para os tratamentos de 24 e 48 h.

Após o tempo de tratamento, as células foram incubadas com MTT (Sigma), em concentração de 5 mg/mL em PBS, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 80% de umidade e protegidas da luz. Após 2,5 h de incubação com MTT, o meio de cultura foi retirado, os cristais de formazan formados em cada poço foram dissolvidos em 200 µL de DMSO e a absorbância a 595 nm foi lida utilizando-se o equipamento SpectraMax M2, Molecular Device, EUA.

2.5. Obtenção de um volume maior de FMsCEA

Após ter sido determinado que o fluido FMs seria utilizado para os experimentos posteriores, era necessário se obter um volume maior do fluido conjugado FMsCEA. Para isso, o mesmo protocolo de conjugação descrito no item 2.2 do capítulo Material e Métodos foi realizado, porém em uma maior escala.

2.6. Caracterização do fluido magnético FMsCEA

2.6.1. Determinação da concentração de ferro

A concentração de ferro do FMsCEA foi determinada utilizando-se um reagente do kit Labtest, o Ferrozine. Foram feitas algumas modificações no protocolo proposto pelo fabricante, com base em Sarradin *et al.* (2005) e Müller *et al.* (2007). O fluido FMsCEA foi diluído em água nanopura (1:1000) e a essa diluição foram adicionados 100 µL de HCl 1,2 N. A suspensão foi incubada a 80 °C por 1 h. Após o período de incubação, adicionaram-se à suspensão, 500 µL de solução aquosa de acetato de amônio a 15% e, em seguida, 100 µL de cada uma das soluções aquosas de ácido ascórbico a 4%, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2,5%, e ferrozine (diluído em água na proporção 1:10). A mistura foi então incubada a 37 °C por 10 min e a absorbância foi lida a 560 nm (SpectraMax M2, Molecular Device, EUA). Todas as soluções foram feitas em água nanopura. A concentração de ferro do FMsCEA foi então calculada por meio da

comparação com uma curva de calibração realizada com a amostra FMs. Para a curva de calibração, foi feita uma diluição seriada do FMs em água nanopura, o que resultou em 11 diferentes concentrações de ferro conhecidas, variando de 0,038 a 39,2 µg/mL, conforme descrito na Tabela 3. As diferentes diluições de FMs foram submetidas a este mesmo protocolo.

Tabela 3. Concentrações de ferro nas diluições de FMs utilizadas como padrões na curva de calibração do método do Ferrozine.

Padrões	Concentração de Ferro (µg/mL)
1	39,2
2	19,6
3	9,8
4	4,9
5	2,45
6	1,225
7	0,612
8	0,306
9	0,153
10	0,076
11	0,038

2.6.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta das nanopartículas do FMsCEA

O FMsCEA também foi caracterizado quanto ao diâmetro hidrodinâmico e ao potencial zeta das suas nanopartículas por meio do espalhamento de luz dinâmico. Diferentes diluições de FMa, FMaCEA, FMs e FMsCEA foram colocadas em uma cubeta apropriada para a leitura em equipamento zetasizer Nano Malvern. As medidas de diâmetro hidrodinâmico para cada amostra foram realizadas em triplicata.

2.6.3. Espectroscopia Raman

O efeito Raman baseia-se no espalhamento inelástico de uma radiação monocromática que incide sobre determinada molécula, ou seja, quando um material é submetido a um feixe de ondas eletromagnéticas (*laser*), parte da radiação da onda espalhada pelo material possui frequência distinta desse *laser*. Isso fornece informações sobre os níveis de energia vibracional da espécie em estudo e resulta em um espectro característico de cada material (uma espécie de assinatura), permitindo que sejam obtidos dados sobre a estrutura química e física de uma substância. No entanto, precisa-se de grandes concentrações de amostra para a observação do espectro, uma vez que a maior parte de luz espalhada é elástica (de 10^8 fótons espalhados apenas 1 é inelástico).

Devido à pequena concentração dos materiais a serem identificados (como a presença do anticorpo no fluido após conjugação), fez-se necessária a utilização da técnica SERS – *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* - que consiste na intensificação do espalhamento Raman das moléculas que estão adsorvidas em metais nobres, no caso deste estudo, a prata coloidal.

Para a técnica SERS, os filmes de prata utilizados como substrato foram preparados pelo método eletrolítico, utilizando-se uma solução de nitrato de prata (AgNO_3 a 0,1 mg/mL) como eletrólito. Sobre o filme de prata, foram colocados 20 μL de diluições de cada um dos fluidos FMs, FMsEN e FMsCEA (1:1 em água destilada), que foram secos em nitrogênio. Os espectros de SERS foram então imediatamente gravados.

As amostras foram excitadas por um laser de íon de argônio a 514,5 nm e uma lente cilíndrica foi usada para focar o laser na superfície contendo as amostras, com uma força de 0,1 W/cm^2 . A luz espalhada foi coletada e analisada utilizando-se um espectrômetro triplo (Jobin Yvon Modelo T64000), equipado com um dispositivo detector CCD.

2.7. Avaliação do potencial da utilização dos fluidos em diagnóstico por imagem

Para se avaliar se as amostras conjugadas poderiam ser utilizadas para diagnóstico por tomografia, os fluidos foram aliquotados em microtubos e estes foram imersos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) presentes em um tubo Falcon

de 50mL. Os tubos Falcons contendo os microtubos com os fluidos foram colocados em um microtomógrafo (microCT 1076 – SkyScan) para a verificação do contraste desses fluidos.

2.8. Avaliação da capacidade de ligação e da especificidade de FMsCEA

2.8.1. ELISA

O FMsCEA foi avaliado quanto à capacidade de ligação ao seu antígeno alvo CEA. Para isso, as células LS174T foram avaliadas por ELISA, de acordo com o protocolo descrito no item 1.5 do capítulo Material e Métodos.

Além do anti-CEA, que constituiu o controle positivo, o fluido FMsCEA também foi utilizado como anticorpo primário, em substituição ao anti-CEA, para a avaliação de sua capacidade de ligação. Para os controles negativos, o fluido sem anticorpo FMs, os sobrenadantes reservados no processo da conjugação (item 2.3) e PBS também foram analisados como anticorpo primário. O experimento foi realizado em triplicata.

O FMsCEA também foi avaliado quanto à sua especificidade. Para isso, o protocolo de ELISA foi repetido para a comparação entre as linhagens LS174T e HCT116.

2.8.2. Coloração de Perls

A capacidade de ligação e a especificidade do FMsCEA também foram avaliadas por microscopia de luz com a coloração de Perls. Para isso, as linhagens LS174-T e HCT-116 foram cultivadas a partir de um repique inicial de 10^5 células por poço de uma placa de 24 poços, que continha lamínulas de microscopia previamente colocadas em cada poço. Após 24 horas, as células, que cresceram aderidas às lamínulas, foram cultivadas na presença de FMs ou FMsCEA em quantidades correspondentes a uma concentração de ferro no meio de cultura de 30 $\mu\text{g/mL}$. Após 5 horas de tratamento com os fluidos, as células foram submetidas à coloração de Perls (coloração específica para ferro), segundo protocolo descrito por Villanueva *et al.* (2009), com adaptações, conforme descrito a seguir. As células foram fixadas por 5 min em metanol gelado, lavadas com PBS e coradas com a coloração de Perls (ácido

clorídrico a 2% e ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 2%, na proporção v/v de 1:1). Após 15 min de coloração, as células foram lavadas em PBS e contra-coradas com vermelho rápido nuclear 0,5% por 3 min. As células foram então lavadas com água destilada e as lamínulas, depois de secas em temperatura ambiente, foram montadas em lâminas de microscopia com a solução de Kisser (mistura na proporção de 1:1 (v/v) de glicerol e 2,5 % de gelatina em água destilada). Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.9. Interiorização das nanopartículas pelas células-alvo

Com o objetivo de se avaliar se o anticorpo anti-CEA conjugado às nanopartículas aumentaria sua interiorização pelas células com alta expressão de CEA, o processamento de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de rotina foi realizado com as células LS174T e HCT116 previamente cultivadas por 5 horas com FMs ou FMsCEA em quantidades correspondentes à concentração de ferro de 60 µg/mL no meio de cultura. Para a MET, as células tratadas foram centrifugadas por 2 min a 1000 g após digestão com tripsina na placa de cultura. Os sedimentos de células formados foram fixados em Karnovsky modificado (2% de paraformaldeído e 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2) por 2 h a temperatura ambiente. Os sedimentos com as células foram então pós-fixados em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio em 5 mM de cloreto de cálcio e contrastados *in bloc* com acetato de uranila. Em seguida, eles foram desidratados em soluções de acetona em concentrações crescentes e embebidos em resina Spurr.

Cortes semi-finos (3 µm) foram corados com azul de toluidina e examinados em microscópio de luz para a localização das células com núcleos visíveis.

Cortes ultra-finos (70 nm) foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Jeol, Tóquio, Japão).

Para a avaliação da interiorização das nanopartículas, foram analisadas, na mesma área da tela, 50 células de cada tratamento, que foram contadas e classificadas quanto à localização de nanopartículas, dentro ou fora das células, de acordo com a Figura 3.

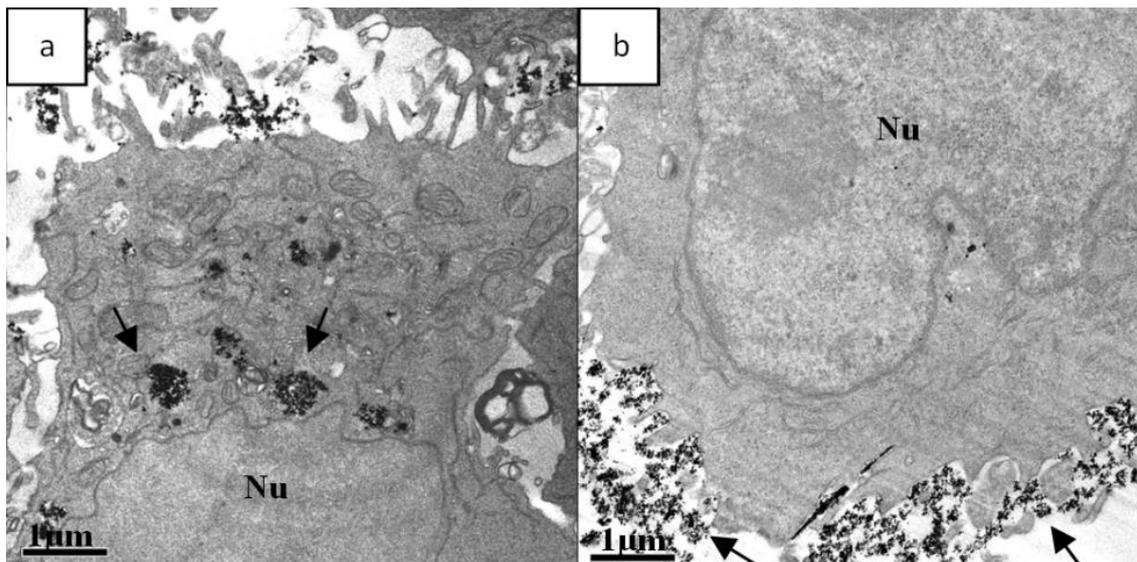


Figura 3. Padrão de classificação adotado para a localização de nanopartículas: (a) dentro ou (b) fora das células. (Nu) núcleo. Setas indicam as nanopartículas

2.10. Avaliação dos efeitos de FMs e FMsCEA sobre a morfologia celular

As mesmas células utilizadas para a avaliação da interiorização das nanopartículas (item 2.9) foram também avaliadas quanto à morfologia celular.

2.11. Análise Estatística

Para a comparação entre o número de células de cada grupo que internalizaram NPM (item 2.9), foi realizado o teste do qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%. Para os demais experimentos que necessitaram de análise estatística, os dados obtidos foram avaliados pelo programa GraphPad Prism 5.0 (Sigma Stat; Prism 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA) por meio do teste de análise de variância *two-way*. Quando diferenças significativas foram encontradas (o nível de significância adotado foi de 5%), a análise foi complementada pelo método de Bonferroni. Os dados foram representados com média \pm desvio padrão.

3. MODELO DE CÂNCER DE INTESTINO – ESTUDO *IN VIVO*

Para o desenvolvimento desse trabalho, utilizou-se como modelo de câncer de intestino humano o tumor induzido em camundongos *nude* pelas células LS174T. Estas foram gentilmente cedidas pelo Dr Jean-Christophe Saurin, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, França, e mantidas nas mesmas condições descritas no item 1.1 do capítulo Material e Métodos.

3.1. Animais

Os animais utilizados nesse estudo foram camundongos Balb-c *nude* fêmeas (Figura 4), com idade entre 4 e 8 semanas, com peso entre 20 e 25 g, fornecidos pelo laboratório Charles River, França. Os animais foram mantidos nos biotérios *Animalerie Commune Rockefeller* e *Module Radioelements HEH* da *Université Claude Bernard Lyon I*, França, em condições de temperatura, higiene e iluminação controladas e com o fornecimento de água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo *Comité d'Experimentation Animale de l'Université Claude Bernard Lyon I*, França.



Figura 4. Camundongos Balb-c *nude* fêmeas

3.2. Indução do tumor CEA positivo nos animais

Células LS174T foram utilizadas para a indução do tumor CEA positivo nos animais. Para isso, os mesmos receberam anestesia gasosa isoflurano/oxigênio

(2,5%/2,5%) e 10^7 células em 100 μL de PBS foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito de cada um dos animais. Após 2 semanas, os animais já apresentavam um tumor visível com volume variando entre 4 e 8 mm^3 e foram submetidos aos experimentos de imagem.

3.3. Fluidos Magnéticos

O fluido magnético (FM) utilizado no estudo *in vivo* foi sintetizado no Instituto de Química da Universidade de Goiânia por Fernando Cruvinel Damasceno e também consistiu de nanopartículas de maghemita cobertas com DMSA, dispersas em água. O FM foi sintetizado e caracterizado conforme descrito no item 2.1 do capítulo Material e Métodos.

Para a realização dos experimentos *in vivo*, as nanopartículas do FM também foram conjugadas ao anticorpo anti-CEA, de acordo com o protocolo do item 2.2 do capítulo Material e Métodos, resultando em um fluido denominado FMCEA.

O FMCEA foi avaliado quanto à sua concentração de ferro por meio do método colorimétrico do ferrozine, conforme descrito no item 2.6.1 do capítulo Material e Métodos.

3.4. Avaliação da biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA

Com o objetivo de se avaliar a biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA, foram realizados experimentos de imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) nos animais que receberam um dos dois fluidos por via intraperitoneal (ip) ou intravenosa (iv).

3.4.1. Marcação radioativa dos fluidos

Para as imagens de SPECT, foi realizada a marcação radioativa dos fluidos FM e FMCEA com tecnécio 99 ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), por meio da mistura dos fluidos (500 a 1000 μL) com cloreto estano e $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$.

Em uma avaliação prévia da marcação, foram testadas diferentes quantidades de cloreto estano (10, 100 e 1000 μg) para a escolha da quantidade adequada que propiciasse a marcação de todas as nanopartículas dos fluidos, sem, no entanto, ocorrer

a redução do $^{99m}\text{TcO}_4$. A marcação das nanopartículas e a redução do $^{99m}\text{TcO}_4$ foi avaliada por cromatografia.

Para os experimentos, um volume de 500 a 1000 μL de FM ou FMCEA foi misturado com 10 μg de cloreto estano e em seguida com $^{99m}\text{TcO}_4$ em quantidades correspondentes a uma atividade variando entre 100 e 500 MBq e a suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 30 min para a complexação do $^{99m}\text{TcO}_4$. Foi preparada uma seringa com FM ou FMCEA marcados para cada animal portador de tumor que receberia a injeção. Cada seringa contendo um dos fluidos marcados foi preparada com a atividade variando entre 27 e 39 MBq para o FM e entre 16 e 28 MBq para o FMCEA e tiveram o volume completado para 100 μL com solução fisiológica de cloreto de sódio.

3.4.2. Tratamento dos animais

Foram utilizados 12 animais, divididos em 4 grupos, que receberam FM ou FMCEA via ip ou iv, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Grupos experimentais de camundongos submetidos à SPECT.

Grupo	Animais	Tratamento	Via do tratamento
1	3	FM	iv
2	3	FM	ip
3	3	FMCEA	iv
4	3	FMCEA	ip

Para as injeções iv, os animais foram previamente anestesiados em câmara de gás (4% de isoflurano em uma mistura oxigênio/nitrogênio (25%/75%)) e transferidos para uma placa aquecedora conectada a um equipamento de anestesia. No momento da injeção iv, os animais permaneceram sob influência de anestesia gasosa (2% de isoflurano em uma mistura oxigênio/nitrogênio (25%/75%)), como ilustra a Figura 5.



Figura 5. Injeção IV (veia caudal) do fluido magnético em animal anestesiado (2% de isoflurano em uma mistura oxigênio/nitrogênio (25%/75%)).

As injeções foram administradas aos animais com intervalo de 30 min entre cada um deles. No momento da injeção de cada animal, foram registradas a hora e a atividade da seringa para cálculo de atividade injetada. Este cálculo foi realizado levando-se em consideração a meia-vida do tecnécio, que é de 6 h e os horários e as datas de três procedimentos: (i) da medição da atividade das seringas com fluido radioativo no momento de seu preparo; (ii) da injeção nos animais; (iii) da medição da atividade da seringa vazia, após os experimentos.

3.4.3. Aquisição e análise das imagens cintilográficas da SPECT

As imagens de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (do inglês SPECT) foram adquiridas entre 1 min e 30 h após a injeção com os fluidos, utilizando-se o equipamento Nano-SPECT/CT system para pequenos animais (Bioscan, Washington, DC, EUA) (Figura 6), conectado a um sistema de anestesia gasosa isoflurano/oxigênio (2,5%/2,5%) (Figura 6b).

Os animais foram previamente anestesiados em câmara de gás, colocados em cama com temperatura controlada (Minerve, Esternay, France) e mantidos sob anestesia durante a aquisição das imagens, realizadas em posição pronada (Figura 6c). Para cada animal, foram adquiridas 20 projeções, com 20000 cps por projeção.

Todas as imagens foram reconstruídas e analisadas utilizando-se o programa InVivo-Scope (Bioscan, Washington, DC, EUA).

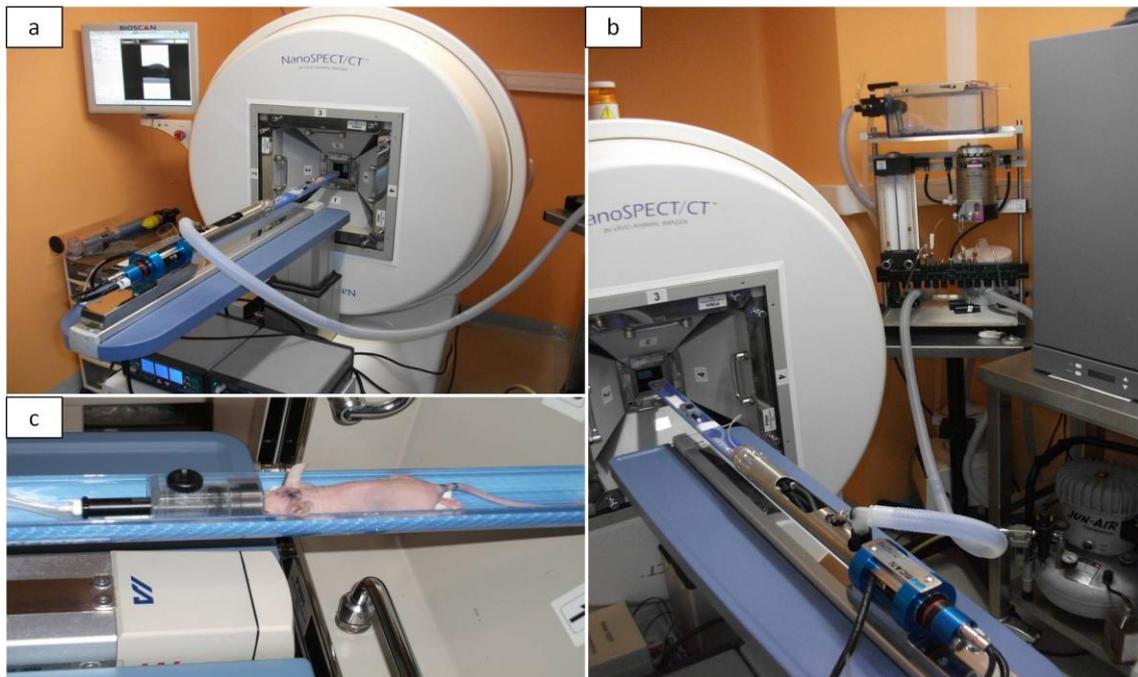


Figura 6. Equipamento NanoSPECT/CT utilizado para aquisição das imagens de tomografia computadorizada por emissão de fóton único. (a) visão geral do equipamento; (b) equipamento conectado a um sistema de anestesia gasosa; (c) camundongo em posição pronada em cama aquecida e mantido sob anestesia para a aquisição das imagens.

3.4.4. Contagem radioativa dos órgãos

Após as últimas imagens adquiridas 24 h depois das injeções, os animais foram sacrificados e o tumor e os seguintes órgãos foram coletados: fígado, baço, rins, coração, pulmão e cérebro, além da cauda, pedaços de músculo e osso, e da carcaça restante, contendo todos os demais órgãos, como os do sistema digestório. Estes foram pesados e submetidos a um contador de radiação gama (Wizard gamma counter, Perkin-Elmer, EUA) para avaliação da biodistribuição dos fluidos.

Os dados obtidos foram expressos como porcentagem de atividade restante nos animais após 24h por órgão e porcentagem de atividade restante nos animais após 24h por grama de órgão. Para os animais que receberam injeção intravenosa dos fluidos, a radioatividade da cauda foi desconsiderada no cálculo da porcentagem, pois poderia representar um erro no procedimento da injeção.

3.4.5. Análise Estatística

Para a comparação da quantidade de radioatividade injetada entre os grupos, foi utilizado o teste t de Student, uma vez que os dados possuíam distribuição normal. O nível de significância adotado foi de 5%.

Para a comparação das porcentagens de radioatividade total e por grama entre dois tratamentos (FM x FMCEA ou iv x ip) e entre o tumor e o músculo, foi realizada a análise de variância *one-way*. Quando diferenças significativas foram encontradas (o nível de significância adotado foi de 5%), a análise foi complementada pelo método de Dunnet. Os dados foram representados como média \pm erro padrão.

As razões de porcentagens de radioatividade por grama de tumor/músculo e o peso dos tumores e órgãos foram comparadas entre os grupos FM e FMCEA em termos de intervalo de confiança a 95% da média das razões em cada grupo.

Para todas as análises, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 (Sigma Stat; Prism 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

3.5. Ressonância Magnética (RM)

Experimentos de ressonância magnética (RM) também foram realizados com o objetivo de se verificar a eficiência dos fluidos FM e FMCEA em diagnóstico por imagem.

3.5.1. Tratamento dos animais

Foram utilizados 8 animais, divididos em 3 grupos, que receberam FM ou FMCEA administrados via iv ou intratumoral (it). Os grupos e as quantidades de animais por grupo estão descritos na Tabela 5.

Todos os animais receberam os fluidos em uma quantidade correspondente a 500 μ g de Fe e foram submetidos à RM antes e depois da administração do tratamento para a comparação do sinal no tumor. O animal do grupo 1 foi submetido à RM imediatamente após a administração do FM via IT e constituiu o controle positivo. Os animais dos grupos 2 e 3 foram submetidos à RM 5 h após o recebimento da injeção iv com os fluidos.

Tabela 5. Grupos experimentais de camundongos submetidos à ressonância magnética.

Grupo	Animais	Tratamento	Via do tratamento
1	1	FM	it
2	3	FM	iv
3	4	FMCEA	iv

3.5.2. Aquisição e análise das imagens de RM

Para a aquisição das imagens, foi utilizado o 7 T Bruker imaging system (Biospec; Brüker, Alemanha) equipado com um gradiente de 400mT/m. Os animais receberam previamente anestesia gasosa de 3 a 4% de isoflurano e esta era mantida durante todo o procedimento de aquisição a 2% de isoflurano em uma mistura oxigênio/nitrogênio (25%/75%) (Figura 7). As imagens foram adquiridas apenas na região referente à localização do tumor.

As imagens foram analisadas com o programa Image J Launcher para a medição do sinal no tumor. As imagens do tumor do mesmo animal de antes e depois da injeção do fluido foram comparadas quanto à intensidade do sinal. Para isso, primeiramente, para cada corte do tumor cuja imagem fora adquirida antes da administração do fluido, obtiveram-se a média e o desvio padrão sinal do tumor e a média e o desvio padrão do *background* (região de fundo sem animal). O sinal do tumor foi normalizado em relação ao *background* por meio da razão entre a média do sinal do tumor e o desvio padrão do *background*. Em seguida, o mesmo corte foi analisado para a imagem adquirida após a injeção do fluido e o sinal do tumor foi normalizado da mesma maneira. Para a comparação entre as imagens, foi calculada a porcentagem de diminuição do sinal após a injeção do fluido (o ferro diminui o sinal), por meio da seguinte equação:

$$DS (\%) = \frac{STN \text{ depois} - STN \text{ antes}}{STN \text{ antes}} \times 100, \text{ onde}$$

DS = diminuição do sinal

STN depois = sinal do tumor na imagem adquirida depois da administração do fluido normalizado em relação ao *background*

STN antes = sinal do tumor na imagem adquirida depois da administração do fluido normalizado em relação ao *background*

Para cada animal, foram analisados 3 cortes diferentes, sendo que cada corte foi analisado 2 vezes (antes e depois do tratamento). Para cada um dos 3 cortes obteve-se a porcentagem de diminuição do tumor, a partir das quais foi calculada a média da porcentagem de diminuição do sinal no tumor para um animal.

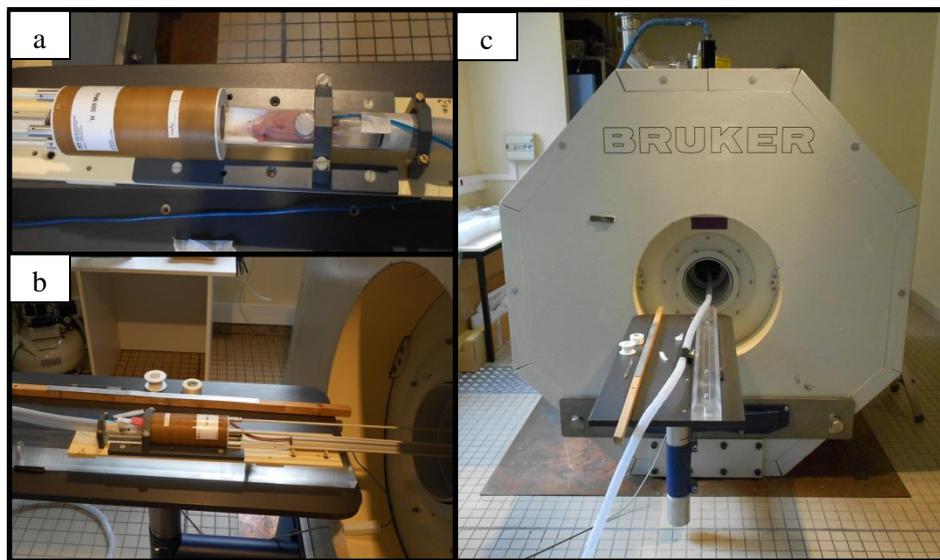


Figura 7. Procedimento para aquisição das imagens de RM. (a) O animal é posicionado na cama aquecida do equipamento e recebe a anestesia gasosa durante todo o procedimento; (b) o animal é colocado, ainda com a anestesia, dentro de um tubo de proteção; (c) a cama com o animal sob a influência de anestesia é colocada no interior do equipamento de RM.

3.5.3. Análise Estatística

Para a comparação entre os sinais de RM antes e após a injeção dos fluidos, foi utilizado o programa SPSS versão 15 para a análise de normalidade, por meio do teste de shapiro-wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância one-way e os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de kruskal-wallis. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

4. MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO – ESTUDO *IN VITRO*

Para esses estudos, utilizou-se como modelo a linhagem de carcinoma mamário murino 4T1 que foram mantidas e propagadas de acordo com o protocolo descrito no item 1.2 do capítulo Material e Métodos.

4.1. Fluido Magnético

O fluido magnético utilizado nos experimentos *in vitro* com as células 4T1 foi o FMCEA (o mesmo utilizado para os experimentos *in vivo* com o modelo de câncer de intestino humano). Sua síntese e caracterização está descrita no item 3.1 do capítulo Material e Métodos.

4.2. Avaliação da citotoxicidade do fluido magnético FMCEA sobre as células de câncer de mama murino 4T1

A citotoxicidade do fluido FMCEA foi avaliada por meio do ensaio de MTT. As concentrações de fluido testadas e o protocolo do ensaio foram praticamente os mesmos utilizados para as células LS175T e HCT116, descritos no item 2.5 do capítulo Material e Métodos. As únicas diferenças foram a quantidade inicial de células utilizadas nesse estudo, que foi de 5×10^3 células/poço, e os tempos de tratamento, que foram de 5, 24 e 48h.

5. MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO – ESTUDO *IN VIVO*

Para o desenvolvimento desse trabalho, utilizou-se como modelo de câncer de mama murino o tumor induzido em camundongos Balb-c pelas células 4T1. Estas foram mantidas nas mesmas condições descritas no item 1.2 do capítulo Material e Métodos.

5.1. Animais

Os animais utilizados nesse estudo foram camundongos balb-c fêmeas (Figura 8), com idade entre 8 e 16 semanas, adquiridos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), Universidade de Campinas. Os animais foram

mantidos no biotério do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, em condições de temperatura, higiene e iluminação controladas e com o fornecimento de água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados nesse estudo estão de acordo com o Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de Brasília (CEUA/63).



Figura 8. Camundongos Balb-c fêmeas

5.2. Indução do tumor de mama nos animais

Células 4T1 foram utilizadas para a indução do tumor nos animais. Para isso, os animais receberam anestesia (cetamina/xilasina) via intraperitoneal e 2×10^4 células em 50 μL de meio DMEM sem soro fetal bovino foram inoculadas na mama superior esquerda dos animais. Após 21 dias, os animais já apresentavam um tumor visível com volume variando entre 4 e 10 mm^3 e foram submetidos aos estudos de biodistribuição dos fluidos magnéticos FM e FMCEA.

5.3. Fluidos Magnéticos

Os fluidos magnéticos utilizados nos experimentos *in vivo* com as células 4T1 foram o FM e o FMCEA (os mesmos utilizados para os experimentos *in vivo* com o modelo de câncer de intestino humano e para os experimentos *in vitro* com as células 4T1). A síntese e caracterização dos mesmos estão descritas no item 3.1 do capítulo Material e Métodos.

5.4. Avaliação da presença dos fluidos FM e FMCEA no tumor

A avaliação da presença dos fluidos FM e FMCEA no tumor foi realizada por meio de análise histológica dos tumores coletados em diferentes tempos (1, 5, 15 e 24h) após a administração ip de um dos fluidos. Tanto o FM como o FMCEA foram injetados em quantidade correspondentes a 400 µg de ferro por animal.

5.4.1. Grupos experimentais

Para os estudos de biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA, foram utilizados 72 animais portadores de tumor de mama que foram divididos em 9 grupos, conforme Tabela 6.

Os animais do grupo 1, que não receberam tratamento, constituíram o controle negativo. Os animais dos demais grupos receberam fluido magnético (FM ou FMCEA) via intraperitoneal em um volume correspondente a 385 µg por cada animal.

Tabela 6. Grupos experimentais de camundongos utilizados para o estudo de biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA.

Grupo	Animais	Tratamento	Tempo de tratamento (h)
1	8	-	-
2	8	FM	1
3	8	FM	4
4	8	FM	15
5	8	FM	24
6	8	FMCEA	1
7	8	FMCEA	4
8	8	FMCEA	15
9	8	FMCEA	24

5.4.2. Preparação dos tumores para análise histológica

Após o tempo de tratamento adequado, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os tumores foram coletados. Imediatamente após a coleta, os tumores foram imersos em fixador de Davidson recém-preparado (1 mL de ácido acético adicionado a 9 mL da solução estoque composta de 40 mL de glicerina, 80 mL de formol 40%, 120 mL de etanol 95% e 120 mL de água destilada). Após 24 h, os tumores foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol (de 70 a 100%), diafanizadas em xileno e incluídos em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 5 µm e para cada animal foram montadas três lâminas com três ou quatro cortes.

Para a avaliação da presença de fluido magnético, os tumores foram corados com a solução de Perls (ácido clorídrico a 2% e ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 2%, na proporção v/v de 1:1) e contra-corados com vermelho rápido nuclear. A coloração de Perls é utilizada para a marcação de ferro. Os cortes foram analisados e fotografados em microscópio de luz (Zeiss Axioskop 2). A análise permitiu a identificação da intensidade da coloração azul no tumor, que indica a quantidade de ferro marcado pela coloração de Perls, e a quantidade de ferro nos tumores foi classificada como (-), (+), (++) , (+++) e (++++) . A partir dessa classificação, foi calculada, para cada grupo, a frequência de cortes que possuíam ferro no tumor em qualquer grau (de + a ++++) e a quantidade de ferro em cada animal atribuindo-se pesos diferentes para cada classificação, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Intensidade de ferro (u.a.)} = \frac{1a + 2b + 3c + 4d}{\Sigma/100}$$

Onde

u.a. = unidades arbitrárias

a = número de cortes classificados como (+)

b = número de cortes classificados como (++)

c = número de cortes classificados como (+++)

d = número de cortes classificados como (++++)

S = número de cortes analisados, incluindo as que foram classificados como (-).

Para cada grupo, foi então calculada quantidade média de ferro e, em seguida, a porcentagem dessa intensidade considerando, como 100%, a quantidade de 400 - todos os cortes analisados classificados como (++++).

5.4.3. Análise Estatística

Para a comparação entre a quantidade de ferro encontrada nos tumores dos grupos tratados com FM e com FMCEA, foi utilizado o programa SPSS versão 15 para a análise de normalidade, por meio do teste de shapiro-wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância one-way e os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de kruskal-wallis. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

RESULTADOS

1. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE ESTUDO

Foram testadas várias combinações de células e tumores com anticorpos e metodologias diferentes. Entre elas, o antígeno carcinoembrionário (CEA) se destacou pela possibilidade da utilização de diferentes linhagens celulares, inclusive para controle dos experimentos.

Três linhagens de câncer de intestino humano foram avaliadas por ELISA quanto à expressão de CEA (Figura 9). As linhagens HT-29 e LS174T mostraram-se positivas para o CEA, enquanto na linhagem HCT116 esse antígeno não foi detectado.

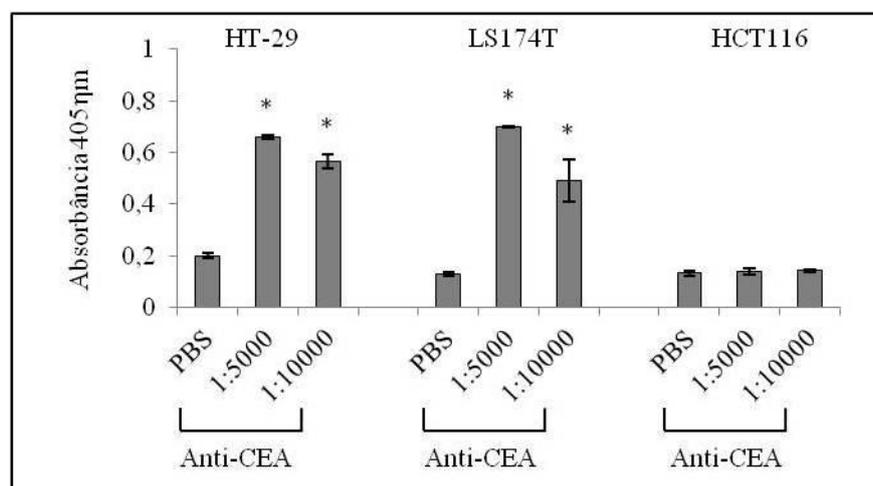


Figura 9. ELISA com diferentes linhagens de câncer colorretal humano. As células foram avaliadas quanto à expressão de CEA utilizando-se o anticorpo primário policlonal de coelho anti-CEA, em duas diferentes diluições. PBS constituiu o controle negativo. * denota diferença significativa em relação ao grupo do PBS (controle negativo) da mesma linhagem ($p < 0,05$).

A expressão de CEA (e de outros biomarcadores) também foi avaliada em tumores de mama da linhagem murina 4T1, por meio de imuno-histoquímica. Pôde-se observar que o tumor de mama induzido pela inoculação de células 4T1 na mama de camundongos apresentava uma marcação positiva para o CEA e para o receptor de estrógeno (ER), conforme ilustra a Figura 10.

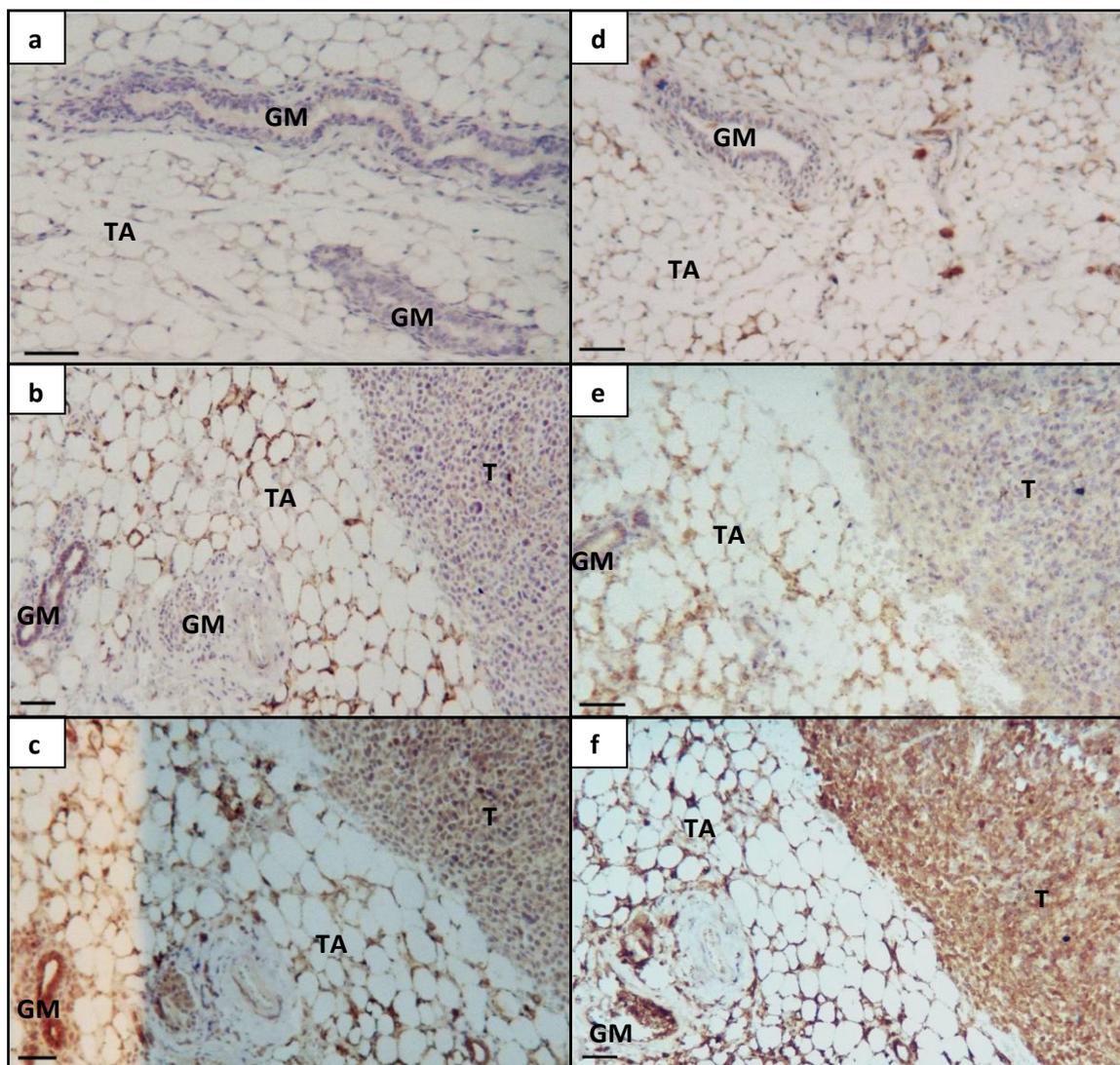


Figura 10. Fotomicrografias de tecidos de mama de camundongos submetidos à imunohistoquímica com anticorpo (a, b, c) anti-CEA ou (d, e, f) anti-ER. (a, d) tecido sem tumor de mama; (b, e) tecido com tumor de mama submetido à reação sem o anticorpo primário; (c, f) tecido com tumor de mama submetido à reação completa. (T) tumor; (TA) tecido adiposo; (GM) glândula mamária; (barra) 100 μ m

Além do CEA e do ER, o câncer de mama 4T1 também foi positivo para PR. Quanto ao TSE, não foi detectada a expressão de CEA nem de c-erb, quando avaliado por imunohistoquímica. Da mesma forma, não foi detectada a expressão de ER nas células MCF-7 avaliadas por ELISA. Não foi possível a padronização dos experimentos de imunofluorescência (dados não mostrados).

Diante desses resultados, optou-se pelo anti-CEA para a conjugação com as nanopartículas magnéticas, pois dessa forma, foram possíveis os estudos *in vitro* e *in vivo* com o modelo de câncer de intestino humano com as células LS174T, positivas para o CEA, sendo que se pôde utilizar a linhagem HCT116 como controle negativo nos

experimentos *in vitro*. Além disso, a escolha do anti-CEA permitiu a utilização também de um modelo de câncer de mama em estudos *in vitro* e *in vivo*, com o uso da linhagem 4T1, também positiva para o CEA.

2. MODELO DE CÂNCER DE INTESTINO – ESTUDO *IN VITRO*

2.1. Fluidos Magnéticos.

Duas amostras de fluido magnético composto por nanopartículas de maghemita (NPM) cobertas com DMSA foram sintetizadas e avaliadas para esse estudo *in vitro*: o FMa (NPM dispersas em água) e o FMs (NPM dispersas em solução salina).

As características desses fluidos estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Características dos fluidos magnéticos FMa e FMs.

Fluido magnético	Diâmetro médio das NP (nm)	Diâmetro hidrodinâmico das NP (nm)	Concentração de ferro (mg/mL)	Concentração de NPM (NPM/mL)
FMa	10,5	96,8	2,42	$1,9 \times 10^{15}$
FMs	8,3	190	17	$1,5 \times 10^{19}$

O FMa e o FMs foram submetidos ao processo de conjugação ao anti-CEA, conforme descrito no item 2.2 do capítulo Material e Métodos e receberam, respectivamente, a denominação de FMaCEA e FMsCEA

2.2. Comparação entre fluidos FMaCEA e FMsCEA

Durante o processo de conjugação do anti-CEA às NPM dos fluidos, percebeu-se uma agregação das NPM. Por isso, decidiu-se avaliar por microscopia eletrônica de transmissão (MET) essa agregação, com o intuito de se escolher o melhor fluido para o prosseguimento do estudo.

As micrografias eletrônicas estão ilustradas na Figura 11. As Figuras 11a e 11c mostram que os fluidos FMa e FMs, respectivamente, possuem NPM com formato esférico e tamanhos variados.

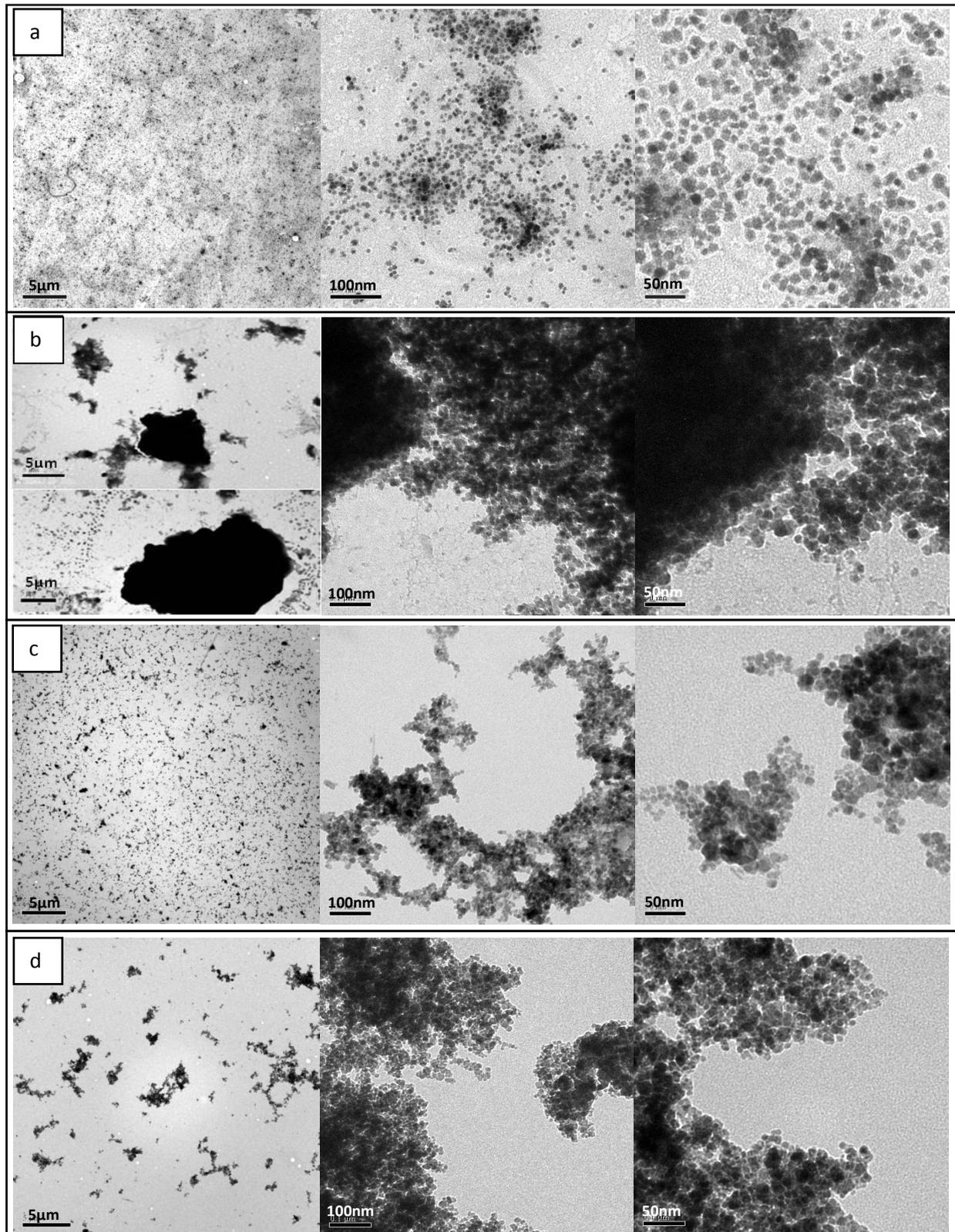


Figura 11. Micrografias eletrônicas em diferentes aumentos de (a) FMa, (b) FMaCEA, (c) FMs e (d) FMsCEA.

Após a conjugação do anti-CEA, pode-se observar que houve uma agregação bem maior das nanopartículas no FMaCEA (Figura 11b) do que no FMsCEA (Figura 11d). Por isso, o fluido FMs foi o escolhido para os estudos *in vitro* com as linhagens LS174T e HCT116.

2.3. Avaliação da citotoxicidade do fluido magnético FMs sobre as células de câncer colorretal humano LS174T e HCT116

Como um passo essencial para a aplicação do FMsCEA na terapia e no diagnóstico do câncer, o seu precursor FMs foi avaliado quanto à sua possível citotoxicidade *in vitro*, por meio de ensaio de MTT com as duas linhagens de câncer colorretal humano (LS174T e HCT116). Os resultados estão apresentados na Figura 12.

Os dados representados na Figura 12a mostram que o FMs reduziu a quantidade de células HCT116 viáveis quando estas foram cultivadas por 5 h em concentrações de ferro de 60 a 80 µg/mL. Essa redução foi também observada após a cultura de 12 e 24 h com o FMs, porém apenas na maior concentração de ferro testada, a de 80 µg/mL. Entretanto, depois de 48 h, a viabilidade celular em todos os grupos experimentais não diferiu significativamente do controle negativo.

Já para a linhagem celular LS174T (Figura 12b), não foi observada diminuição no número de células viáveis após culturas com FMs de até 24 h. No entanto, depois de 48 h, houve uma diminuição nas concentrações de ferro variando entre 30 e 80 µg/mL.

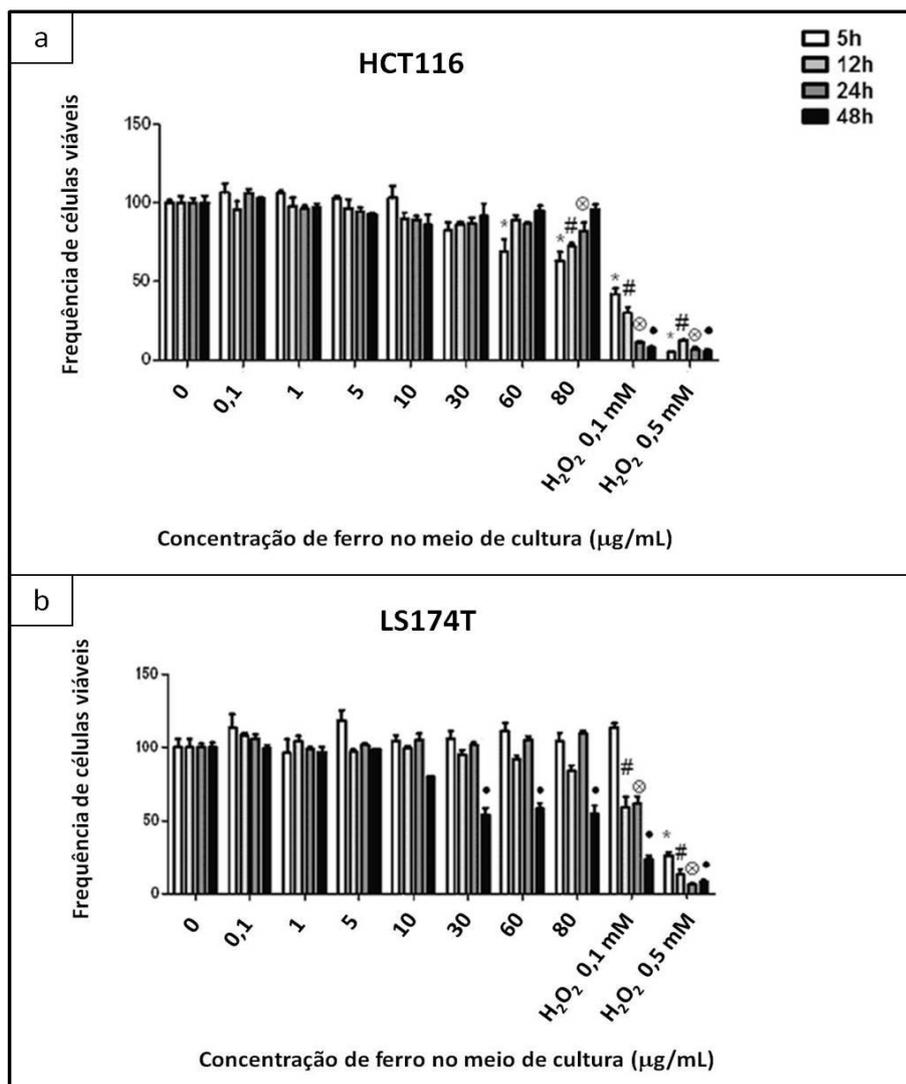


Figura 12. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de FMs sobre linhagens de câncer colorretal humano, por meio de ensaio de MTT. Células (a) HCT116 e (b) LS174T foram cultivadas com FMs em diferentes concentrações de ferro. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo. Símbolos diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo do tempo de cultura de (*) 5 h, (#) 12 h, (⊗)

2.4. Caracterização do fluido magnético FMsCEA

2.4.1. Determinação da concentração de ferro

A concentração de ferro do fluido FMsCEA foi determinada pelo método colorimétrico do ferrozine. De acordo com o protocolo descrito no item 2.6.1 do capítulo Material e Métodos, fez-se necessária a realização de uma curva padrão com

concentrações conhecidas de FMs. Esta apresentou $r^2=0,9975$ (Figura 13) e pôde ser utilizada para a comparação das absorvâncias obtidas e posterior cálculo da concentração de ferro do FMsCEA. Como a média das absorvâncias obtidas para o FMsCEA diluído em água (1:700) foi 0,398, a concentração de ferro de FMsCEA calculada a partir da equação da reta foi de 9,2 $\mu\text{g/mL}$.

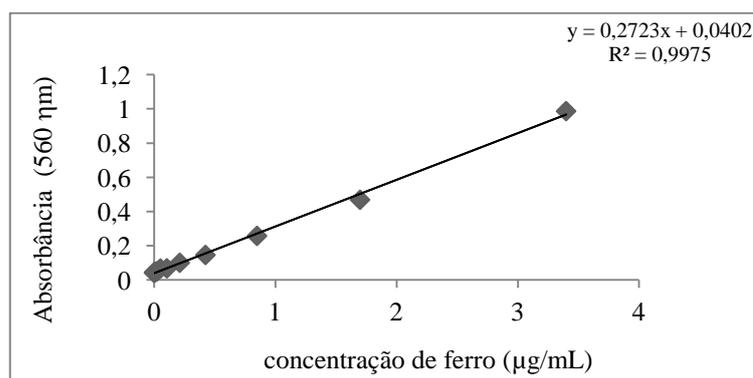


Figura 13. Curva padrão de absorvância a 560 nm em função da concentração de ferro obtida a partir do FMs avaliado pelo método colorimétrico do Ferrozine.

2.4.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta das nanopartículas do FMsCEA

O fluido FMsCEA foi analisado por espalhamento de luz no equipamento zetasizer para a determinação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta das suas NPM. Apesar de o FMs já ter sido caracterizado previamente, ele também foi submetido ao equipamento para a comparação entre os fluidos (Figura 14).

Cada fluido foi avaliado em triplicata. Nos gráficos do lado esquerdo da Figura 14, estão representadas estas 3 medidas, sendo as linhas vermelha, verde e azul correspondentes à primeira, segunda e terceira medidas, respectivamente. Já nos gráficos do lado direito, estão plotadas as médias e os desvios padrão dos tamanhos hidrodinâmicos determinados nestas 3 medidas.

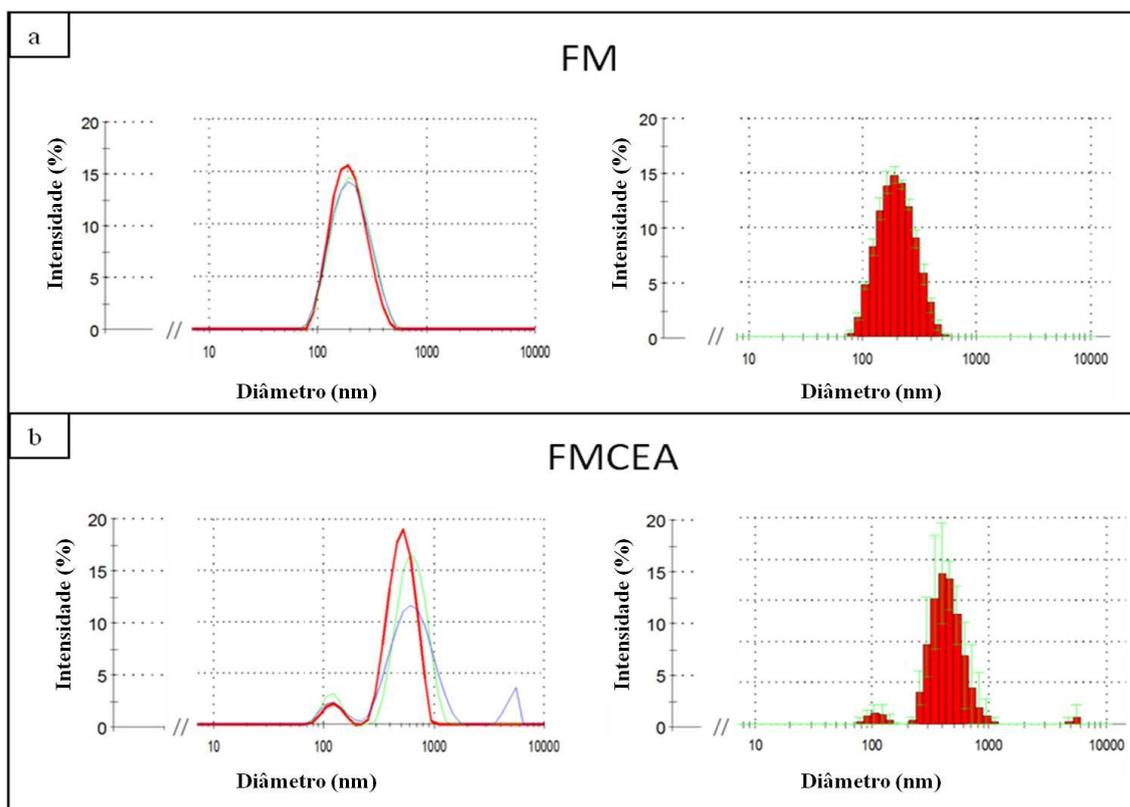


Figura 14. Diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas dos fluidos (a) FMs e (b) FMsCEA determinados por espalhamento de luz no equipamento zetasizer. Para cada fluido, há dois gráficos. No da esquerda, as linhas vermelha, verde e azul representam, respectivamente, a primeira, a segunda e a terceira medida da triplicata. No da direita, está o histograma com as médias e desvios padrão referentes à triplicata.

A análise do FMs mostrou uma típica distribuição normal do diâmetro das NPM, cujo pico é de 190 nm (Figura 14a), conforme havia sido caracterizado previamente (Tabela 7). A existência de NPM de tamanhos diferentes também foi visualizada na MET (Figura 11c).

Após a conjugação com o anticorpo, a análise do FMsCEA (Figura 14b) indicou um pico principal em torno de 500 nm, além de outros dois picos bem menores de aproximadamente 100 nm e 5 μ m. É importante notar que o pico de 5 μ m só apareceu na terceira medida da triplicata.

O potencial zeta das NPM de ambos os fluidos também foi determinado pelo equipamento zetasizer. Após a conjugação do anticorpo, houve um ligeiro aumento, pois o potencial zeta variou de -47,5 mV no FMs para -38 mV no FMsCEA.

2.4.3. Espectroscopia Raman

A SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) (Figura 15) também foi utilizada na caracterização do FM_sCEA para avaliar a eficiência do processo de conjugação do anti-CEA às NPM.

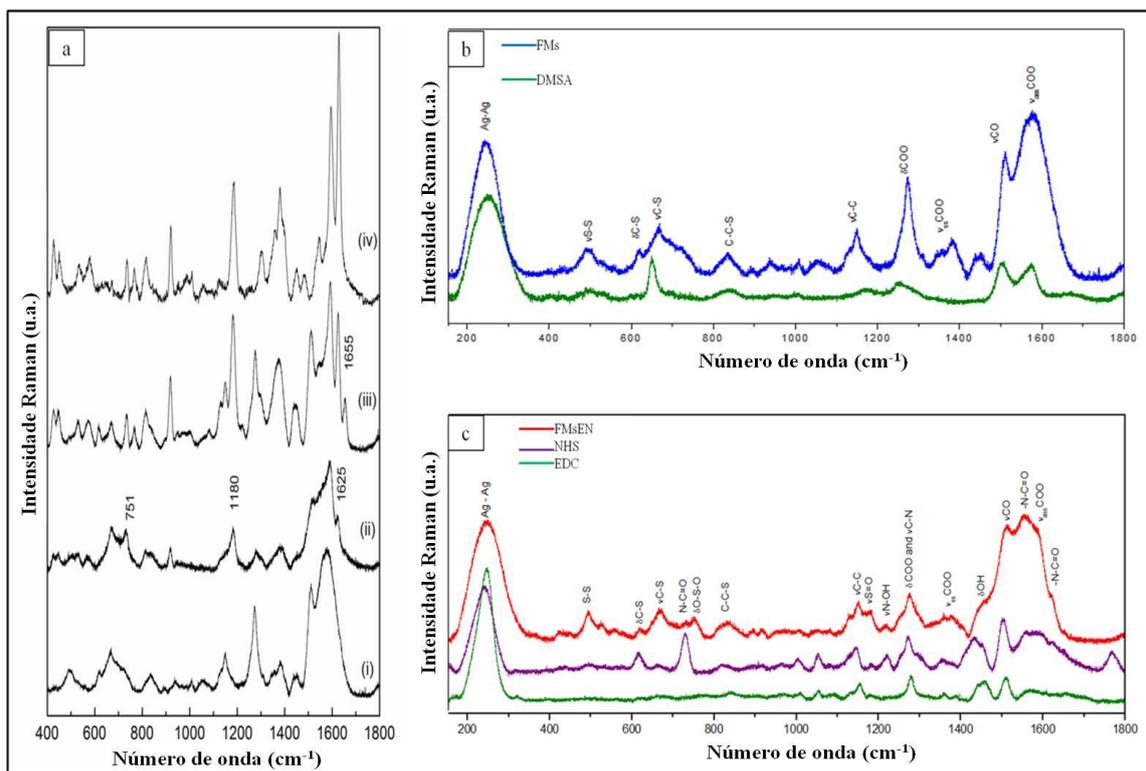


Figura 15. Espectros SERS. (a) Comparação entre os espectros SERS de (i) FM_s, (ii) FM_sEN, (iii) FM_sCEA, (iv) anti-CEA livre. (b) Comparação entre os espectros SERS de FM_s e DMSA. (c) Comparação entre os espectros SERS de FM_sEN, NHS e EDC. FM_s: fluido magnético com nanopartículas de maghemita; FM_sEN: fluido magnético submetido ao processo de conjugação até a etapa da adição dos reagentes EDC e NHS (sem anticorpo anti-CEA), FM_sCEA: fluido magnético submetido ao processo completo de conjugação (com anticorpo anti-CEA).

A Figura 15a (i), (ii) e (iii) mostra os espectros SERS obtidos para os fluidos FM_s, FM_sEN e FM_sCEA, respectivamente. O espectro SERS para o anticorpo anti-CEA também foi adquirido (iv) para comparação, revelando bandas Raman características de quando não está associado às NPM. Cada espectro mostra picos diferentes e específicos de cada amostra.

A Figura 15b mostra os espectros SERS do FMs e do DMSA, que possuem alguns picos comuns. No espectro do FMs, a região de 1300-1650 cm^{-1} apresenta bandas relacionadas ao grupo carboxilato, enquanto na região 800-1300 cm^{-1} , há modos Raman de ligação (C-S) e (C-C) da cadeia de DMSA. Além disso, há o aparecimento de um novo pico em torno de 500 cm^{-1} (vS-S) e pode-se observar a mudança nos picos característicos das vibrações do modo (C-S), em relação ao espectro do DMSA, o que indica pontes S-S entre moléculas vizinhas de DMSA na superfície das NPM.

Para o processo de conjugação do anti-CEA às NPM (item 2.2 do capítulo Material e Métodos), dois reagentes foram utilizados, o EDC e o NHS, cujos espectros SERS estão representados na Figura 15c, que também mostra o espectro do FMsEN. O FMsEN apresenta espectro SERS com alguns picos comuns ao EDC e ao NHS (Figura 15c) e também com o FMs (Figura 15a (i) e (ii)). No entanto, a Figura 15a (ii) revela que a região 1625 cm^{-1} e os fracos picos em 1180 e 751 cm^{-1} estão associados respectivamente com vibrações das ligações C=O, S=O e N-H do NHS. As mesmas regiões são observadas para o NHS livre (Figura 15c), mas com uma leve diferença de energia de 4 cm^{-1} , o que indica uma fraca ligação do NHS ao DMSA das NPM do FMsEN.

A Figura 15a (iii) e (iv) mostra, respectivamente, os espectros SERS do FMsCEA e do anti-CEA livre e pode-se perceber que a maioria dos picos do anti-CEA estão presentes no FMsCEA, com leves mudanças de energia nos modos vibracionais. Estes são modos característicos de grupos amida de proteínas, aminoácidos e aminas e carboxílicos terminais. Quando se compara o FMsCEA ao FMs (Figura 15a (iii) e (i)), também se observam bandas associadas ao DMSA. No entanto, o mais interessante é o pico de 1655 cm^{-1} no FMsCEA (Figura 15a (iii)), que é relacionado ao *stretching* da ligação C=O de uma amida secundária, que está ausente tanto no FMs (Figura 15a (i)) como no anti-CEA livre (Figura 15a (ii)), o que evidencia a ligação do grupamento amina do anticorpo ao grupo carboxil do DMSA.

2.5. Avaliação do potencial da utilização dos fluidos em diagnóstico por imagem

Tentou-se simular um corpo de um camundongo, utilizando-se um tubo tipo Falcon (que tem aproximadamente o tamanho de um camundongo) cheio de PBS.

Dentro do tubo Falcon com PBS, foi colocado um microtubo contendo os diferentes fluidos magnéticos, o FMs ou o FMsCEA, a serem avaliados quanto ao contraste em relação ao PBS, ou seja, quanto à possibilidade desses fluidos serem utilizados diretamente na detecção de tumores, sem a necessidade de contrastes adicionais.

As imagens obtidas pelo microtomógrafo estão ilustradas na Figura 16. Conforme observado respectivamente nas Figuras 16a e 16b, tanto o FMs como o FMsCEA apresentaram contraste em relação ao PBS. No entanto, para o FMsCEA (Figura 16b) foi observada uma leve sedimentação das NPM, o que não permitiu o contraste homogêneo no interior do microtubo.

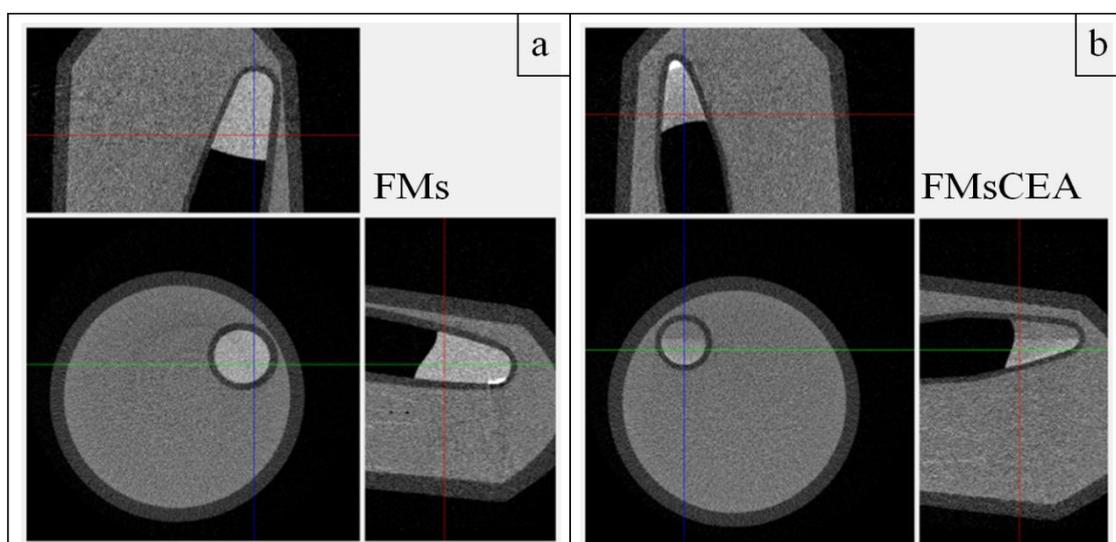


Figura 16. Imagens obtidas a partir de um microtomógrafo. As imagens mostram, para cada um dos fluidos magnéticos (a) FMs e (b) FMs, cortes longitudinais e transversais de tubos Falcons contendo PBS, onde microtubos contendo os fluidos estão imersos.

2.6. Avaliação da capacidade de ligação e da especificidade de FMsCEA

2.6.1. ELISA

Após o processo de conjugação ter sido efetuado com sucesso, conforme dados obtidos na espectroscopia Raman (descrita no item 2.4.3 do capítulo Resultados), a capacidade de ligação e a especificidade do FMsCEA ao seu alvo (CEA expresso na superfície das células LS174T) foi verificada por ELISA (Figura 17).

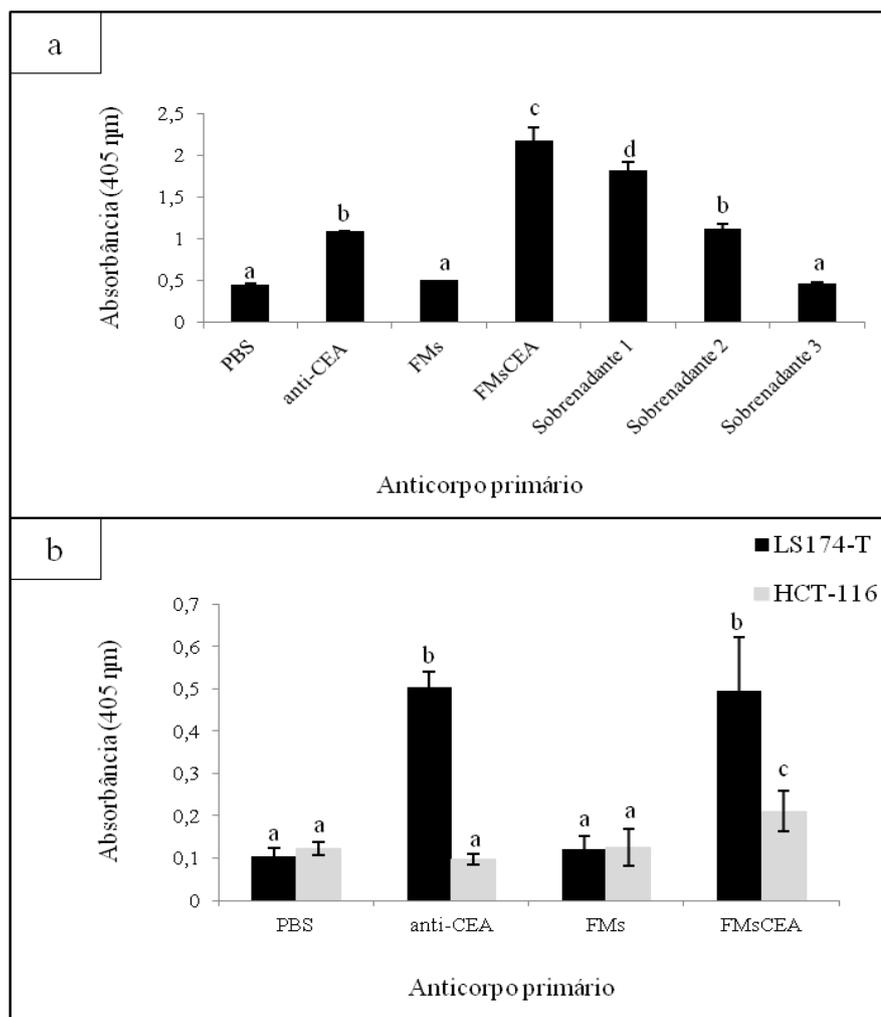


Figura 17. Capacidade de ligação e especificidade do FMSCeA avaliadas por ELISA. (a) Eficácia de ligação do FMSCeA às células LS174T. ELISA foi realizado com a utilização de FMs ou sobrenadantes resultantes do processo de conjugação como anticorpos primários. (b) Especificidade do FMSCeA para o CEA. Células LS174Y e HCT116 foram avaliadas por ELISA com a utilização de FMSCeA como anticorpo primário. Nas figuras a e b, PBS e MF foram utilizados como controles negativos e o anti-CEA, como controle positivo. Letras diferentes denotam diferença significativa.

Quando o FMSCeA foi utilizado em substituição ao anticorpo primário anti-CEA, ele foi capaz de se ligar às células-alvo LS174T (Figura 17a). Nesta mesma figura também se observa um alto sinal do ELISA quando os sobrenadantes 1 e 2 resultantes das lavagens do processo de conjugação foram utilizados em substituição ao anticorpo primário. No entanto, nenhum sinal foi observado para o sobrenadante 3.

O ELISA também foi realizado para a avaliação da especificidade do FMsCEA. Para isso, comparou-se a linhagem LS174T (alta expressão de CEA) com a linhagem HCT116 (baixa expressão de CEA). Os resultados estão representados na Figura 17b e mostram que o sinal obtido para as células LS174T testadas com o FMsCEA é estatisticamente igual ($p=0,63$) ao sinal dessas células testadas com o anti-CEA (controle positivo) e significativamente maior ($p=0$) do que o sinal obtido para as células HCT116 avaliadas com o FMsCEA.

2.6.2. Coloração de Perls

A eficiência de ligação e a especificidade de FMsCEA também foi avaliada por microscopia de luz, por meio da coloração de Perls (Figura 18). A coloração de Perls marca o ferro nas células e a cor azul indica a presença de nanopartículas de ferro.

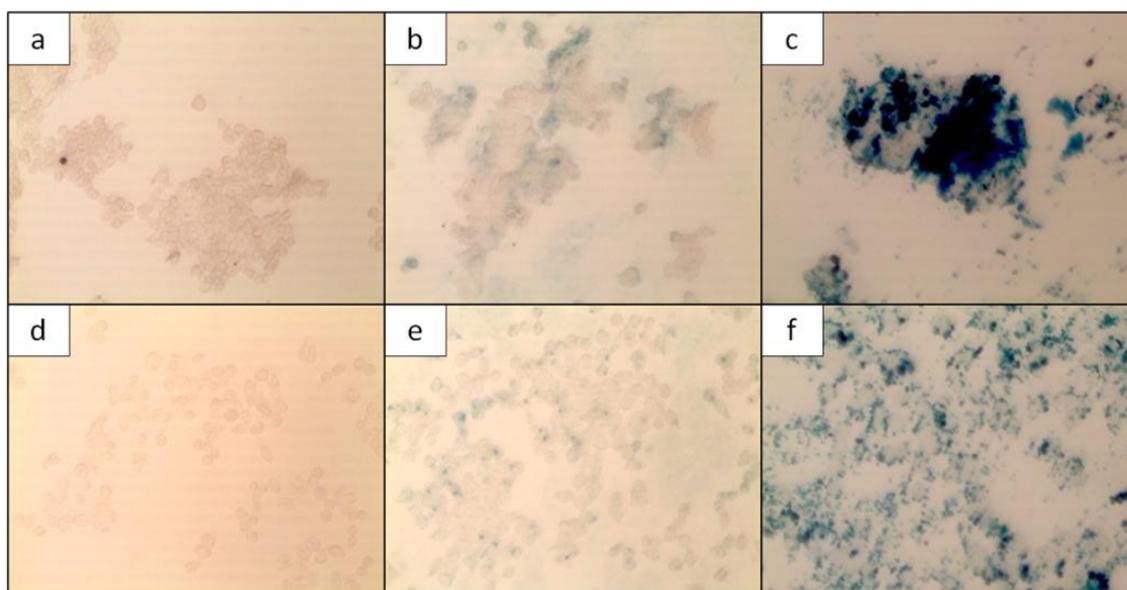


Figura 18. Capacidade de ligação e especificidade do FMsCEA avaliadas por coloração de Perls. Fotomicrografias de células (a, b,c) LS174T e (d, e, f) HCT116 cultivadas por 5 h na presença de (b, e) FMs e (c, f) FMsCEA, na mesma concentração de ferro ($60 \mu\text{g/mL}$). Células não tratadas (a, d) constituíram o controle negativo.

Apesar de a mesma concentração de ferro ter sido utilizada em todos os grupos experimentais, pode-se observar um aumento na quantidade de ferro corado em azul quando as células foram cultivadas com FMsCEA (Figuras 18c e 18f), em relação às células cultivadas com FMs (Figuras 18b e 18e). Além disso, a Figura 18 também evidencia que esse aumento foi maior para as células LS174T (Figura 18c) do que para as células HCT116 (Figura 18f).

2.7. Interiorização das nanopartículas pelas células-alvo

Depois de se confirmar a capacidade de ligação e a especificidade do FMsCEA, decidiu-se avaliar se o anti-CEA conjugado às NPM do FMsCEA aumentaria a interiorização das NPM pelas células-alvo. Para isso, as duas linhagens de câncer colorretal humano (LS174T e HCT116) foram cultivadas tanto com o FMs como com o FMsCEA, na mesma concentração de ferro. Após 5 h, 50 células (correspondentes a 100%) de cada grupo foram contadas e classificadas quanto à localização das NPMs, conforme padrão estabelecido no item 2.9 do capítulo Material e Métodos (Figura 3).

Os dados da classificação estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Quantidade de células com NPM dos fluidos FMs e FMsCEA interiorizadas ou não.

Linhagem Celular	Quantidade de células classificadas com NPM de FMs		Quantidade de células classificadas com NPM de FMsCEA	
	Interiorizadas	Não interiorizadas	Interiorizadas	Não interiorizadas
	LS174T	31 (62%)	19 (38%)	42 (84%)
HCT116	36 (72%)	14 (28%)	34 (68%)	16 (32%)

Conforme descrito na Tabela 8, a quantidade de células LS174T que interiorizaram NPM aumentou quando elas foram cultivadas na presença de FMsCEA: de 62% das células analisadas que internalizaram NPMs do FMs para 84% das que internalizaram as NPM do FMsCEA. Ainda que esta alteração não seja significativa,

houve um aumento de aproximadamente 29% na interiorização de NPM quando estas estão conjugadas com o anti-CEA. Esse aumento não foi observado para as células HCT116.

2.8. Avaliação dos efeitos de FMs e FMsCEA sobre a morfologia celular

As células cultivadas com FMs e FMsCEA por 5 h e processadas por MET também foram avaliadas quanto à morfologia e ultraestrutura celulares.

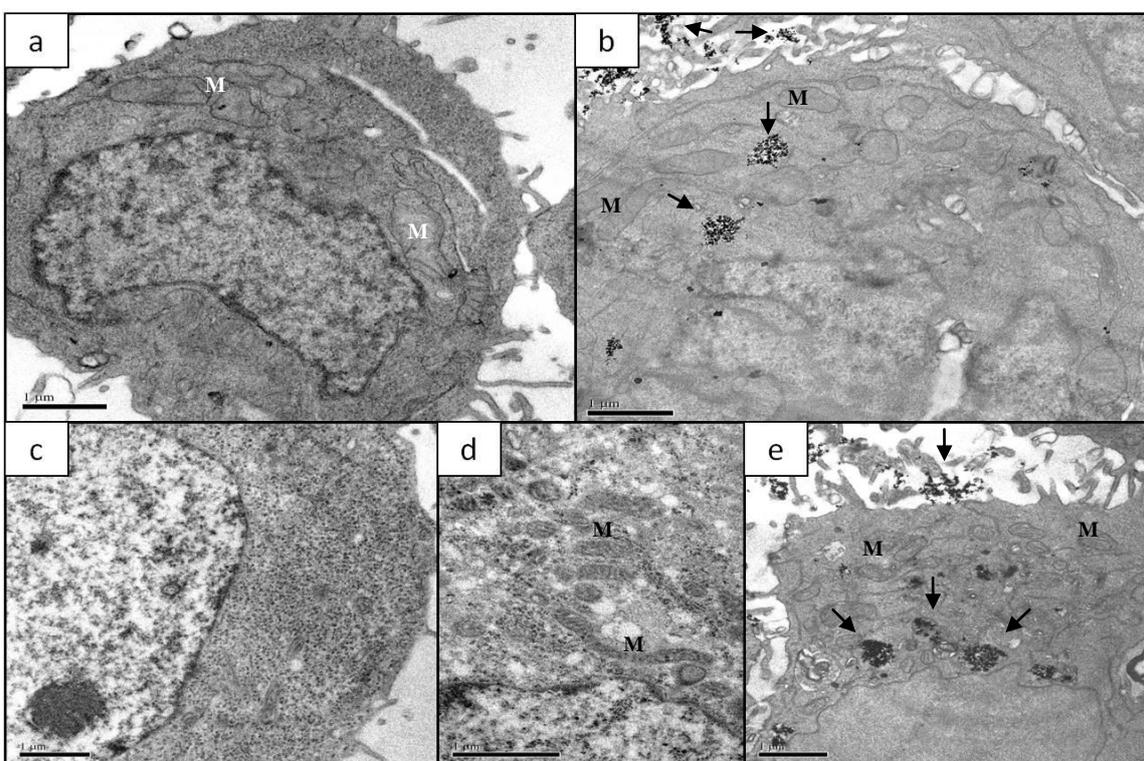


Figura 19. Micrografias eletrônicas de células (a, b) LS174T e (c, d, e) HCT116. As células LS174T cultivadas com os fluidos FMs ou FMsCEA não apresentaram alterações estruturais, mesmo quando havia NPM interiorizadas (b), quando comparadas às células sem tratamento (a). As células HCT116 cultivadas com FMsCEA apresentaram alterações no tamanho das mitocôndrias (e) quando comparadas às células do grupo controle (c,d). (d) detalhe das mitocôndrias de uma célula HCT116. (M) mitocôndrias. Setas indicam as NPM.

As células LS174T (Figura 19a) tem morfologia irregular, oval, com núcleo grande e irregular e citoplasma cheio de mitocôndrias gigantes e de retículo endoplasmático (RE) liso, alguns ribossomos livres e, algumas vezes, vesículas eletrólucidas. As mitocôndrias gigantes apresentam cristas periféricas e transversas e

estão, normalmente, associadas ao RE liso. As células apresentam muitas microvilosidades em sua superfície, conectando as células vizinhas.

Já as células HCT116 (Figuras 19c e 19d) apresentam morfologia irregular e arredondada e grande núcleo que, em maioria, é eucromático. O citoplasma granulado contém muitas mitocôndrias alongadas e eletrondensas, RE, alguns ribossomos livres e, algumas vezes, vesículas eletronlucentes. A superfície das células apresenta algumas projeções de microvilosidades, mas pouco contato entre células vizinhas.

Após cultivo com FMs e FMsCEA, as células LS174T não apresentaram alterações estruturais, mesmo quando as NPM foram interiorizadas (Figura 19b). A linhagem HCT116 também não apresentou muitas alterações estruturais após cultivo com os fluidos. A alteração observada foi nas mitocôndrias das células HCT116 cultivadas com FMsCEA, que, aparentemente, ficaram maiores (Figura 19e).

3. MODELO DE CÂNCER DE INTESTINO - ESTUDO *IN VIVO*

Nesse estudo, foi utilizado um novo lote de fluido magnético (FM), cujas nanopátulas apresentaram um diâmetro de 6,35 nm e diâmetro hidrodinâmico de 101nm. O FM foi utilizado no processo de conjugação de anti-CEA e sua especificidade ao CEA foi confirmada por ELISA com as células LS174T e HCT116.

Para os estudos *in vivo*, foram utilizados camundongos Balb-c *nude* portadores de tumor de intestino induzido por células LS174T. Os animais receberam injeções intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv) de FM e FMCEA conjugados ao tecnécio para a avaliação da biodistribuição dos fluidos, tanto por imagem em tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) como por contagem da radioatividade dos órgãos. Os fluidos também foram avaliados quanto ao potencial para sua utilização como agentes de contraste na ressonância magnética.

3.1. Avaliação da biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA

A avaliação da biodistribuição dos fluidos foi realizada após a injeção intraperitoneal ou intravenosa de FM ou FMCEA conjugados ao tecnécio. As seringas com os fluidos radioativos foram preparadas com uma faixa de atividade entre 16 e 39 MBq, de forma que houve variação na quantidade de radioatividade injetada nos

animais. Essa quantidade foi calculada conforme descrito no item 3.4.2 do capítulo Material e Métodos e está descrita na Tabela 9.

Tabela 9. Radioatividade injetada em cada animal de cada tratamento.

Fluido Injetado	Via de Injeção	Radioatividade Injetada (MBq)
		(média±erro padrão)
FM	iv	16,01±1,18
FM	ip	16,93±3,46
FMCEA	iv	9,17±0,48*
FMCEA	ip	11,83±2,76

* denota diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

3.1.1. Aquisição e análise das imagens cintilográficas da SPECT

Após receberem o tratamento, cada animal foi submetido ao SPECT em diferentes tempos: desde 1 min até 24 h após a injeção do fluido.

A Figura 20 ilustra imagens adquiridas após a administração intravenosa do FM em diferentes animais, que apresentaram o mesmo padrão ao longo do tempo. Após 1 min, a maioria da radioatividade foi detectada na bexiga e apenas uma pequena quantidade aparece na região correspondente à localização do fígado (Figura 20a). Ao longo do tempo, esse padrão é invertido e um acúmulo gradual do fluido no fígado foi observado, além de um acúmulo também na região correspondente à localização dos rins (Figuras 20b-f). A radioatividade na região da bexiga foi detectada até 4 h (Figura 20d). Em 5 h, foi detectada radioatividade na região provavelmente correspondente aos ureteres e à uretra (Figura 20e). Após 20 h (Figura 20f), também se observou um pequeno acúmulo de fluido na região onde foram inoculadas as células tumorais, no flanco dos animais, embora em bem menor intensidade do que o observado no fígado.

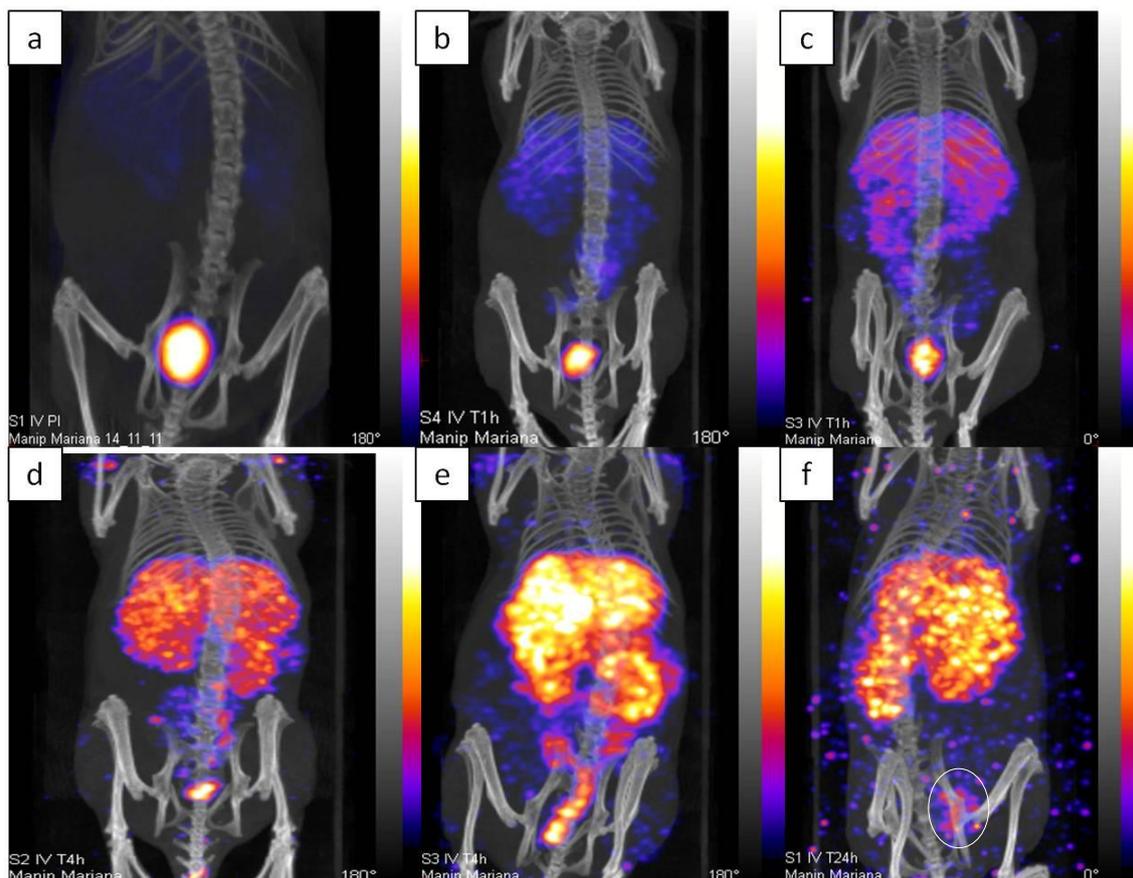


Figura 20. Imagens obtidas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) em diferentes tempos após a administração intravenosa do fluido FM. As imagens foram adquiridas (a) 1 min, (b) 1,5 h, (c) 2 h, (d) 4 h, (e) 5 h e (f) 20 h após a injeção. Na Figura f, o círculo branco indica a região onde provavelmente se encontra o tumor. Na escala de cores, quanto mais próximo do branco, maior a radioatividade detectada. 0° ou 180° correspondem ao ângulo em que o equipamento se encontra em relação ao camundongo, sendo, respectivamente, a posição inicial prona e a posição supina.

Já para a administração intraperitoneal do FM (Figura 21), o padrão de distribuição ao longo do tempo se apresentou de maneira diferente, pois o fluido radioativo foi detectado mais intensamente na região dos rins do que no fígado (Figuras 21b e 21c). Após 1,5 h (Figura 21a), a maior parte da radioatividade foi detectada na bexiga, assim como para a administração iv (Figura 20b), embora também tenha se observado o fluido disperso na cavidade peritoneal. Após 4,5 h, começou a se observar um menor acúmulo de fluido na bexiga e um aumento de sua presença nos rins (Figura 21b), que se manteve até 24h após a injeção (Figura 21c), embora em intensidade menor do que a observada em 4,5 h.

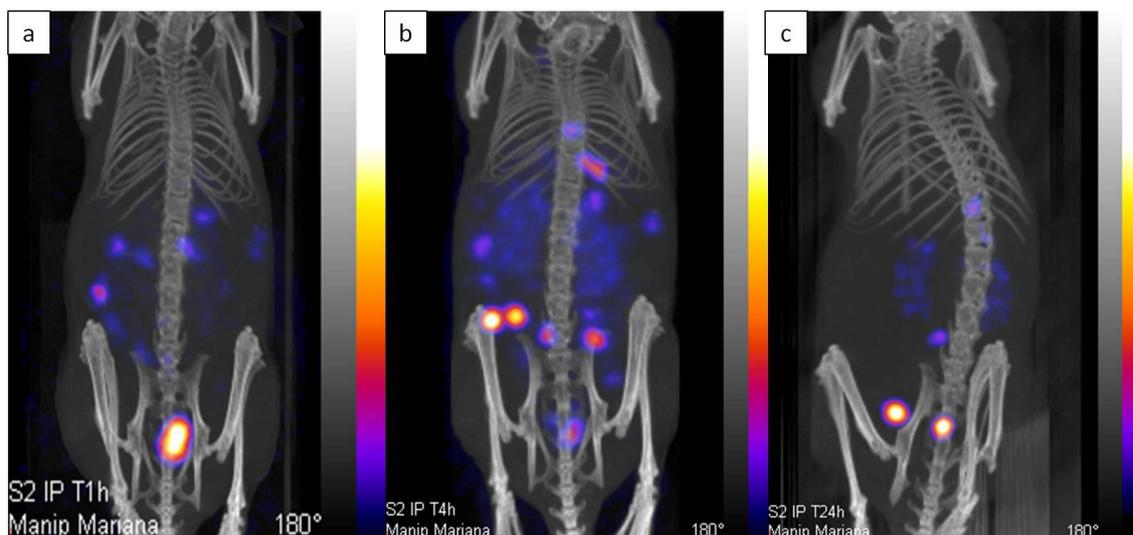


Figura 21. Imagens do mesmo animal obtidas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) em diferentes tempos após a administração intraperitoneal do fluido FM. As imagens foram adquiridas (a) 1,5 h, (b) 4,5 h e (c) 24h após a injeção. Na escala de cores, quanto mais próximo do branco, maior a radioatividade detectada. 180° correspondem ao ângulo em que o equipamento se encontra em relação à posição inicial (prona) do camundongo.

O fluido magnético conjugado com anti-CEA (FMCEA) também foi injetado via ip e iv nos animais para a aquisição das imagens SPECT em diferentes tempos de tratamento. No entanto, devido a um mau funcionamento do equipamento no momento do experimento, não foi possível reconstruir corretamente as imagens adquiridas.

A Figura 22 mostra as imagens adquiridas dos animais que receberam FMCEA via iv. Para os animais que foram submetidos à tomografia 1 h após a injeção, a maior parte da radioatividade foi detectada na bexiga (Figura 22a). Nesse mesmo tempo de tratamento, uma parcela da radioatividade também foi detectada em outra região, mais acima, correspondente à área de localização do fígado. Na Figura 22b, observa-se também um aumento do acúmulo do FMCEA no fígado após 4 h da injeção. Também em 4 h, observa-se que o FMCEA se encontrava ainda na bexiga e, em menor intensidade, nos rins (Figura 22b). Após 24 h, a intensidade da radioatividade detectada foi muito baixa (Figura 22c).

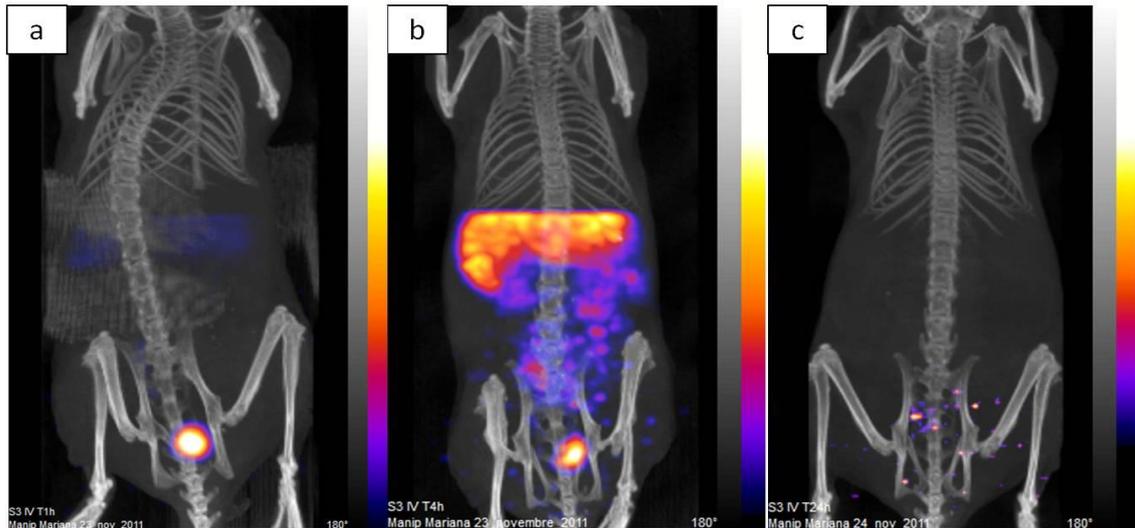


Figura 22. Imagens do mesmo animal obtidas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) em diferentes tempos após a administração intravenosa do fluido FMCEA. As imagens foram adquiridas (a) 1 h, (b) 4 h e (c) 23 h após a injeção. Na escala de cores, quanto mais próximo do branco, maior a radioatividade detectada. 180° correspondem ao ângulo em que o equipamento se encontra em relação à posição inicial (prona) do camundongo.

Assim como o FM, o FMCEA administrado via ip apresentou um padrão de biodistribuição diferente do observado para a administração via iv. A Figura 23 mostra as imagens adquiridas após diferentes tempos da injeção ip do FMCEA em um mesmo animal.

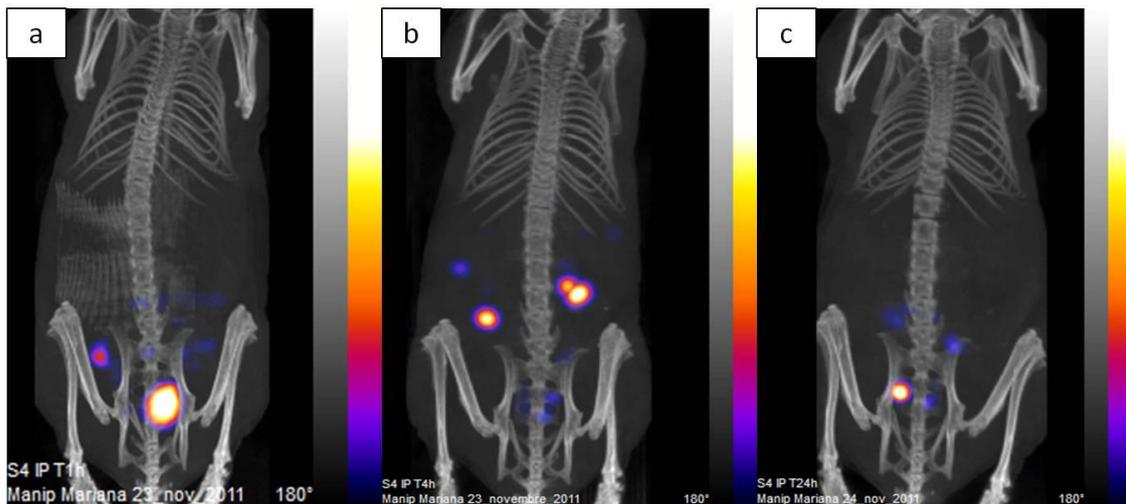


Figura 23. Imagens do mesmo animal obtidas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) em diferentes tempos após a administração intraperitoneal do fluido FMCEA. As imagens foram adquiridas (a) 1 h, (b) 4 h e (c) 24 h após a injeção. Na escala de cores, quanto mais próximo do branco, maior a radioatividade detectada. 180° correspondem ao ângulo em que o equipamento se encontra em relação à posição inicial (prona) do camundongo.

Foi identificado um acúmulo do FMCEA na bexiga após 1 h da injeção ip (Figura 23a). Após 4 h (Figura 23b) e 24 h (Figura 23c), a radioatividade detectada foi baixa, não sendo possível determiná-la em órgãos específicos.

3.1.2. Contagem radioativa dos órgãos

Após a aquisição das imagens, a biodistribuição dos fluidos também foi avaliada por contagem da radioatividade em câmara gama dos órgãos coletados e previamente pesados. Primeiramente, foi calculada a porcentagem de radioatividade restante nos órgãos em cada grupo, para a comparação entre os fluidos e entre as vias de administração. Os resultados estão expressos nas Figuras 24-27.

A Figura 24 ilustra os resultados da comparação entre as porcentagens de radioatividade total dos órgãos dos animais após 24 h da injeção intravenosa dos fluidos FM e FMCEA.

Conforme observado na Figura 24a, tanto para o FM como para o FMCEA, a maior porcentagem de radioatividade restante foi detectada no fígado, seguido da carcaça e dos rins. No entanto, foi observada uma diferença significativa entre os dois fluidos quanto à porcentagem de radioatividade nesses órgãos (Figura 24b). A porcentagem de FM nos rins e na carcaça foi significativamente maior do que a do FMCEA, enquanto que no fígado o oposto foi observado.

No tumor, não foi observada diferença significativa entre as porcentagens de radioatividade total detectadas entre os animais que receberam FM e FMCEA (Figura 24b).

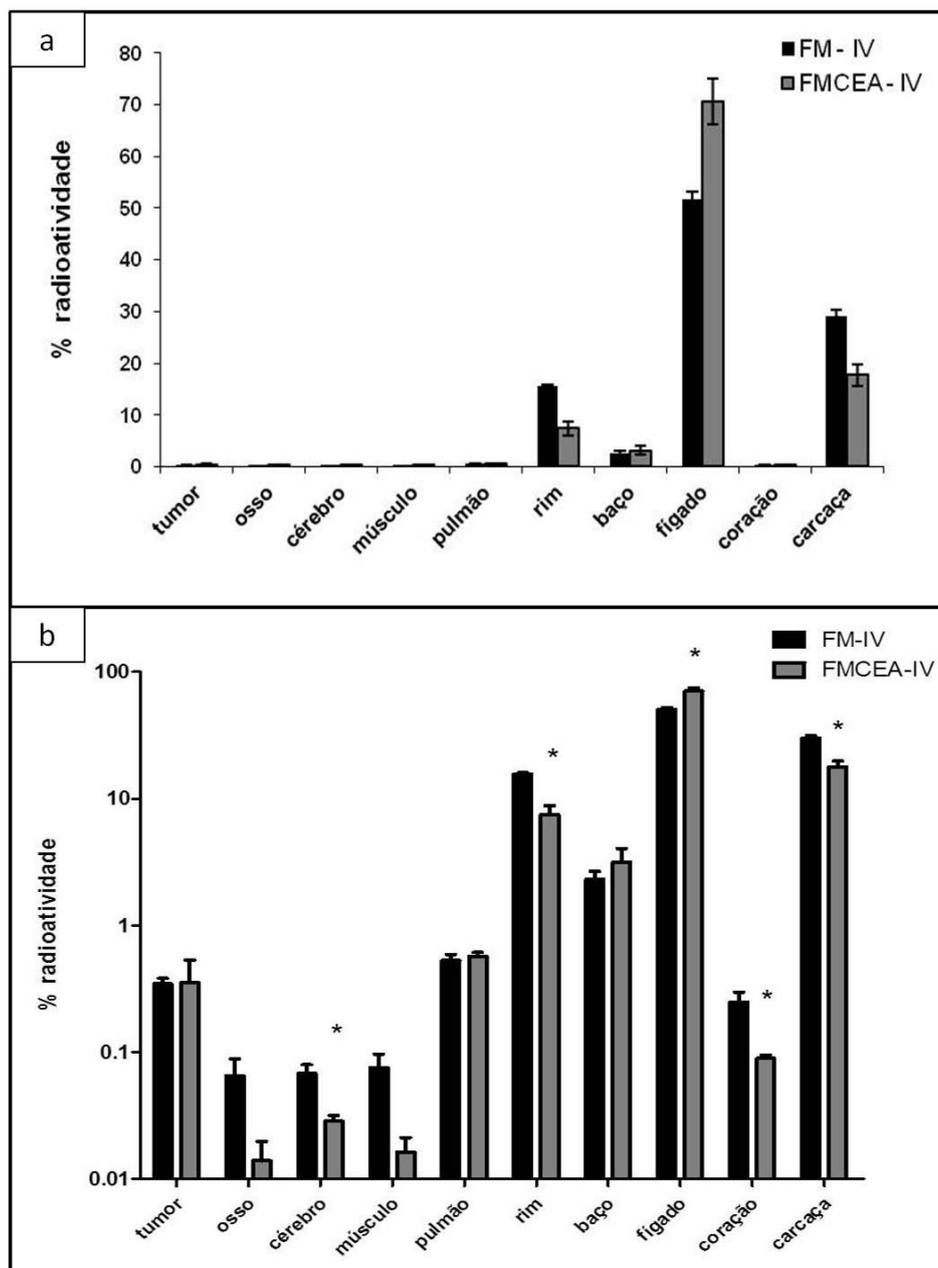


Figura 24. Porcentagem de radioatividade restante em cada órgão após 24 h da administração intravenosa (iv) dos fluidos FM e FMCEA. O eixo y está representado em escala (a) normal e (b) logarítmica. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os fluidos em um mesmo órgão.

Já quando a administração dos fluidos FM e FMCEA foi via intraperitoneal (ip) (Figura 25), a maior porcentagem de radioatividade restante foi detectada na carcaça, seguida dos rins e do fígado (Figura 25a).

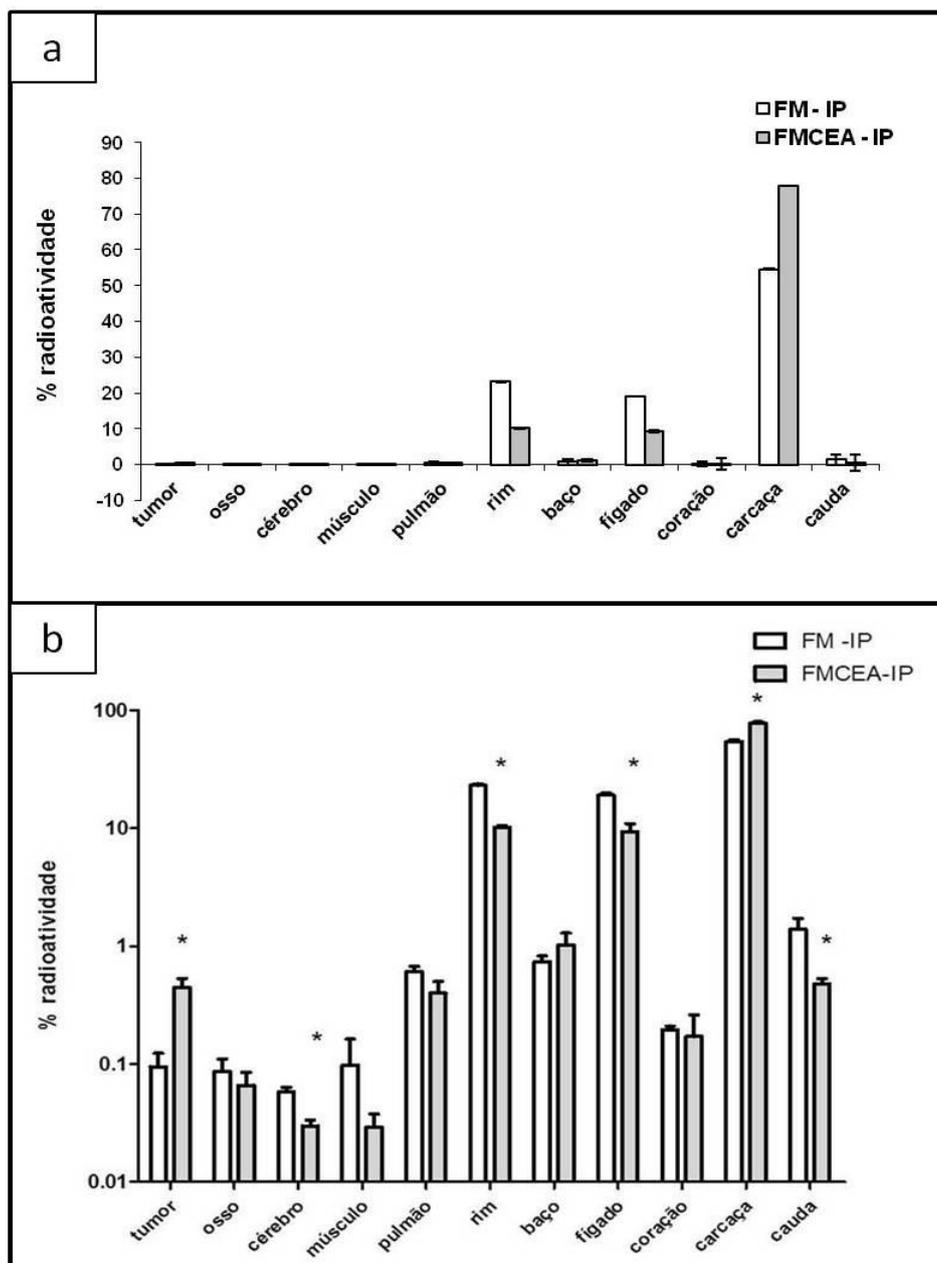


Figura 25. Porcentagem de radioatividade restante em cada órgão após 24 da administração intraperitoneal (ip) dos fluidos FM e FMCEA. O eixo y está representado em escala (a) normal e (b) logarítmica. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os fluidos em um mesmo órgão.

Também foi observada diferença significativa entre as porcentagens de radioatividade detectadas nesses órgãos para cada um dos fluidos. Na carcaça, a porcentagem do FMCEA foi significativamente maior do que a do FM enquanto que nos rins e fígado, foi observado o oposto, ou seja, maior porcentagem de FM do que de FMCEA (Figura 25b).

Além disso, ainda na administração intraperitoneal, foi observada uma porcentagem de radioatividade no tumor significativamente maior no grupo tratado com FMCEA do que no grupo tratado com FM (Figura 25b).

Neste estudo, fez-se também a comparação entre as porcentagens de radioatividade dos órgãos considerando-se as vias de administração dos fluidos (Figura 26).

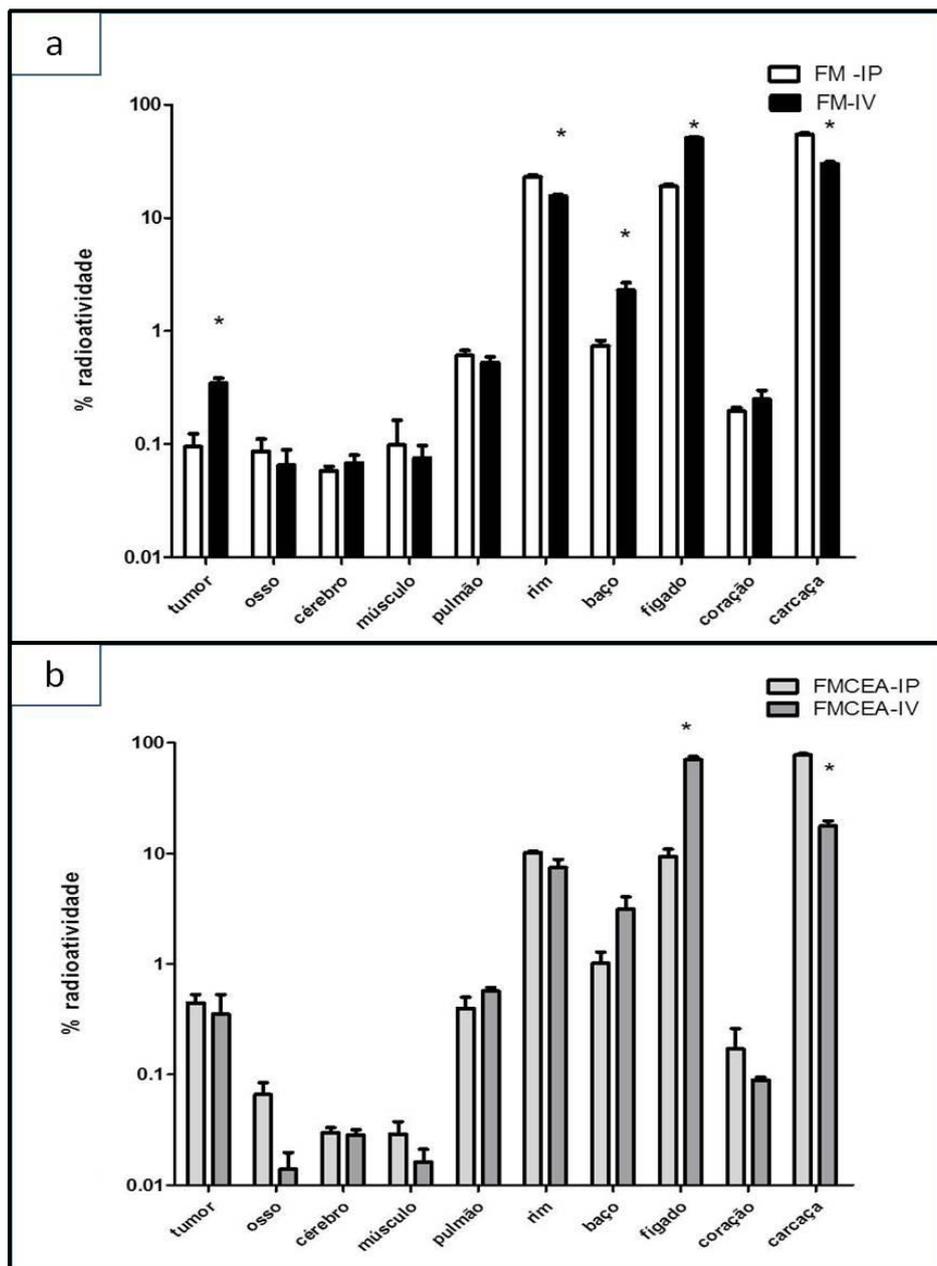


Figura 26. Porcentagem de radioatividade restante em cada órgão após 24 h da administração intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv) dos fluidos (a) FM e (b) FMCEA. O eixo y está representado em escala logarítmica. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre as vias de administração do mesmo fluido em um mesmo órgão.

Para o fluido FM (Figura 26a), a administração iv levou a um acúmulo significativamente maior do fluido no fígado e no baço e a um acúmulo significativamente menor nos rins e na carcaça, em comparação à administração ip. Também para o fluido FMCEA (Figura 26b), a injeção iv levou a um acúmulo significativamente maior no fígado e a um acúmulo significativamente menor na carcaça, quando comparada à injeção ip.

Em relação ao tumor, a administração do FM via iv levou a um acúmulo significativamente maior do fluido do que a administração ip (Figura 26a).

Para a análise de biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA, após administração iv ou ip, considerou-se também a porcentagem de radioatividade restante por grama de cada órgão. Para isso, os órgãos coletados foram pesados. Não foram observadas variações significativas entre os pesos dos órgãos dos diferentes animais. No entanto, o peso do tumor se apresentou de uma forma bastante variável entre os grupos de tratamento, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10. Peso médio dos órgãos e tumores coletados (g) em cada grupo experimental.

Órgão	FM – iv	FMCEA - iv	FM - ip	FMCEA -ip
Tumor	0,083 ± 0,007	0,814 ± 1,041	0,024 ± 0,008	0,288 ± 0,108 *
Osso	0,036 ± 0,017	0,015 ± 0,014	0,047 ± 0,011	0,039 ± 0,018
Cérebro	0,358 ± 0,016	0,370 ± 0,046	0,380 ± 0,023	0,376 ± 0,010
Músculo	0,070 ± 0,029	0,052 ± 0,024	0,071 ± 0,023	0,060 ± 0,017
Pulmão	0,143 ± 0,100	0,147 ± 0,009	0,154 ± 0,021	0,152 ± 0,030
Rins	0,316 ± 0,025	0,300 ± 0,028	0,330 ± 0,025	0,329 ± 0,010
Baço	0,089 ± 0,016	0,081 ± 0,002	0,091 ± 0,003	0,102 ± 0,006
Fígado	1,097 ± 0,113	1,133 ± 0,148	1,195 ± 0,143	1,277 ± 0,089
Coração	0,135 ± 0,015	0,110 ± 0,008	0,116 ± 0,007	0,120 ± 0,016
Carcaça	15,009 ± 0,913	15,159 ± 0,744	15,470 ± 0,928	16,817 ± 1,221
Cauda	-**	-**	0,433 ± 0,025	0,438 ± 0,018

* denota diferença significativa ($p < 0,05$) entre os pesos dos tumores dos grupos ip.

** O peso das caudas não foi considerado para os grupos cuja injeção foi intravenosa.

Como pode ser observado na Tabela 10, o peso médio dos tumores dos animais que receberam o FMCEA por via ip e iv foi cerca de 10 a 12 vezes maior do que o peso médio observado para os animais que receberam o FM, respectivamente, mas apenas para a administração ip essa diferença foi significativa.

Com base no peso de cada tumor de cada animal, foi calculada a porcentagem de radioatividade restante por grama de tumor em cada grupo experimental. O mesmo foi feito para os demais órgãos coletados. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 27-29.

Na Figura 27, pode-se observar a comparação entre as porcentagens de radioatividade restante por grama de cada órgão coletado dos animais após injeção iv de FM e FMCEA.

Como se observa na Figura 27a, o fígado, o baço e o rim foram os órgãos onde a maior porcentagem de radioatividade foi detectada 24 h após a injeção iv. Quando se compara a biodistribuição do fluido FM com a do FMCEA, somente no baço e no pulmão não houve diferença significativa entre eles (Figura 27b). Nos demais órgãos analisados, nos quais se observaram diferenças significativas entre o acúmulo dos dois fluidos, apenas no fígado a presença de FMCEA foi maior que a de FM. Em todos os outros órgãos, o acúmulo de FM foi maior do que o de FMCEA. Em relação ao tumor, o acúmulo do FM também foi significativamente maior do que o observado para o FMCEA, após injeção iv (Figura 27b).

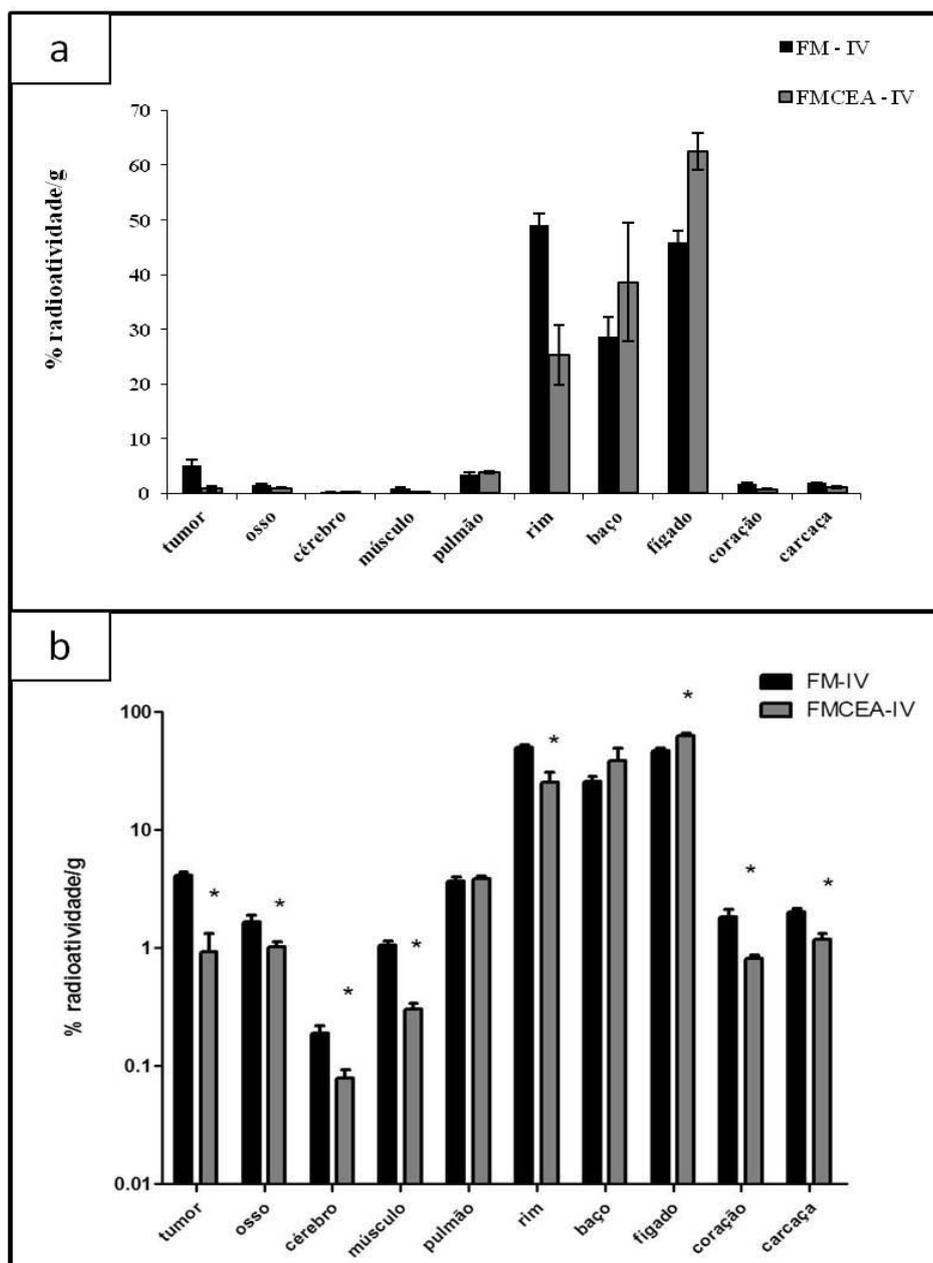


Figura 27. Porcentagem de radioatividade restante por grama de órgão após 24 h da administração intravenosa (iv) dos fluidos FM e FMCEA. O eixo y está representado em escala (a) normal e (b) logarítmica. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os fluidos em um mesmo órgão.

Já para a injeção ip, a biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA se apresentou de forma diferente (Figura 28).

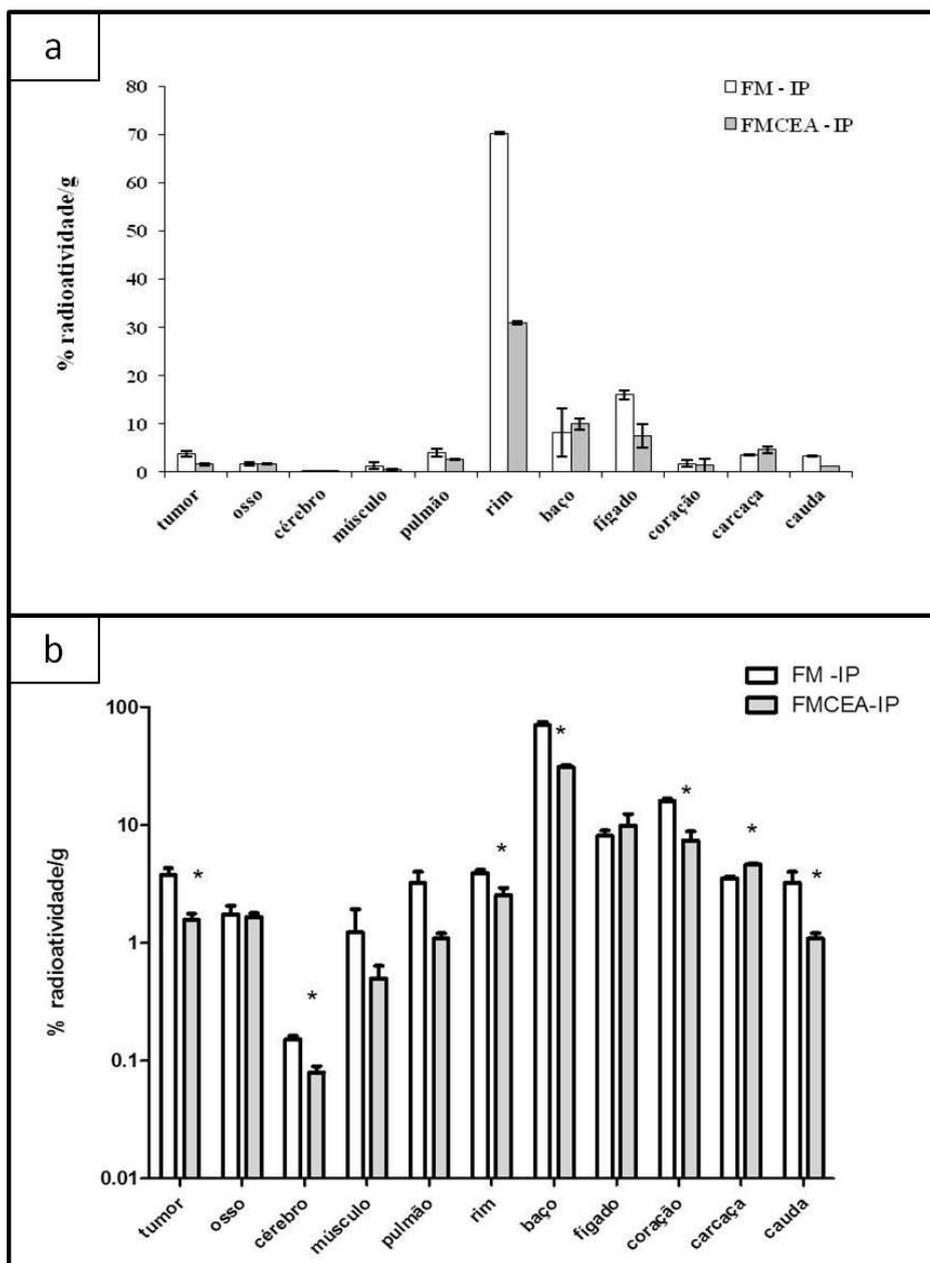


Figura 28. Porcentagem de radioatividade restante por grama de órgão após 24 h da administração intraperitoneal (ip) dos fluidos FM e FMCEA. O eixo y está representado em escala (a) normal e (b) logarítmica. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os fluidos em um mesmo órgão.

A maior quantidade de fluido radioativo após 24 h da injeção ip foi detectada no rim, especialmente o FM (Figura 28a), cujo acúmulo nesse órgão foi significativamente maior do que o do FMCEA (Figura 28b). Nos outros órgãos em que foram observadas diferenças significativas, inclusive no tumor, o acúmulo do FM também foi maior do que o de FMCEA. A única exceção foi a carcaça, onde o acúmulo de FMCEA foi significativamente maior do que o de FM (Figura 28b).

Além da comparação entre a quantidade dos diferentes fluidos em um mesmo órgão, após a mesma via de injeção, a comparação entre as vias de administração para cada fluido também foi realizada (Figura 29).

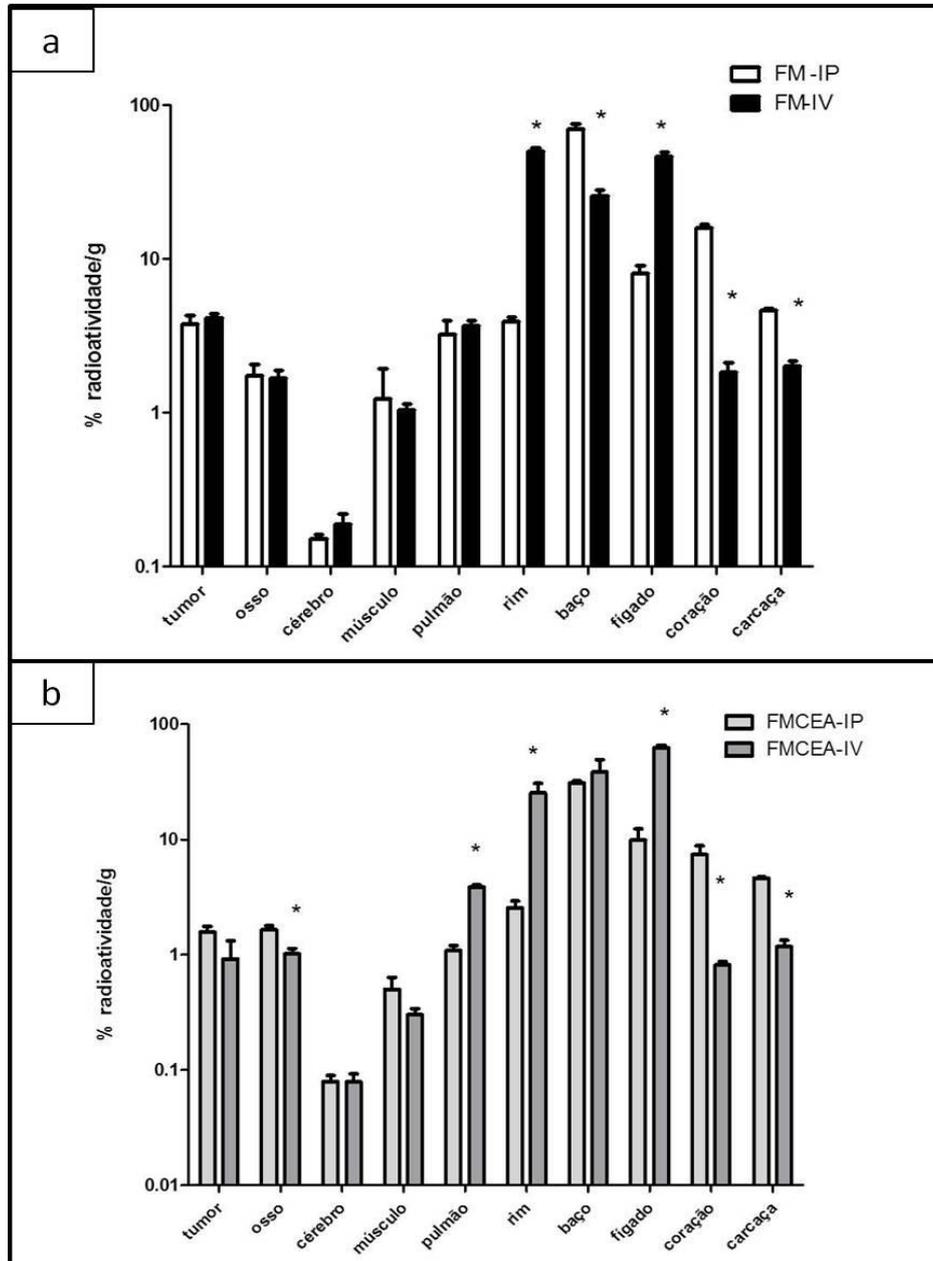


Figura 29. Porcentagem de radioatividade restante por grama de órgão após 24 h da administração intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv) dos fluidos (a) FM e (b) FMCEA. O eixo y está representado em escala logarítmica. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre as vias de administração do mesmo fluido em um mesmo órgão.

Tanto para o FM (Figura 29a) como para o FMCEA (Figura 29b), quando a administração foi iv ocorreu um acúmulo no fígado e no rim significativamente maior do que o observado na administração ip. Esta por sua vez, levou a um acúmulo de ambos os fluidos no coração e na carcaça significativamente maior do que a administração iv (Figuras 29a e 29b). Além dessas diferenças, também foi observado que a administração do FM via ip levou a um maior acúmulo do fluido no baço do que quando esse fluido foi administrado via iv (Figura 29a) e que a administração iv do FMCEA levou a um acúmulo maior do fluido no pulmão do que quando ele foi administrado via ip (Figura 29b). Em relação ao tumor, não houve diferença significativa entre as vias de administração para ambos os fluidos (Figuras 29a e 29b).

Como um resumo dos principais resultados obtidos neste estudo de biodistribuição por contagem radioativa dos órgãos, pode-se afirmar que, considerando a porcentagem de radioatividade restante por grama de órgão, o fígado, o baço e o rim são os principais órgãos onde ambos os fluidos se acumulam 24 h após a administração iv (Figura 27), enquanto que o rim é o principal órgão de acúmulo desses fluidos após a injeção ip (Figura 28). Além disso, quando se compara os dois fluidos, em todos os órgãos nos quais se observaram diferenças significativas, o FMCEA administrado por ambas as vias se acumula menos nos órgãos do que o FM (Figuras 27 e 28), com a única exceção do fígado após injeção iv (Figura 27b) e da carcaça após injeção ip (Figura 28b). Em relação ao tumor, ao se considerar a porcentagem de radioatividade detectada, houve um aumento significativo de acúmulo de fluido quando este foi o FMCEA administrado via ip (Figura 25b). No entanto, considerando a porcentagem de radioatividade por grama de tumor, foi detectado um menor acúmulo de FMCEA do que de FM, em ambas as vias (Figuras 27b e 28b).

Com o objetivo de avaliar se os fluidos acumulavam preferencialmente no tumor em relação aos outros órgãos, também foi feita uma comparação da porcentagem de radioatividade detectada por grama de tumor com a radioatividade detectada por grama de um órgão não relacionado, como, por exemplo, o músculo (Figura 30).

Em relação à injeção iv (Figura 30a), apenas para o FM o acúmulo no tumor foi significativamente maior do que o acúmulo no músculo. Apesar disso, a diferença entre as razões médias das porcentagens de radioatividade do tumor/músculo no FM e no FMCEA não foi significativa. Para o FM essa razão foi de 4,02, enquanto que para o FMCEA foi de 3,09.

Já para a injeção ip (Figura 30b), o acúmulo de ambos os fluidos no tumor foi significativamente maior do que o acúmulo no músculo, sendo que as razões médias das porcentagens de radioatividade do tumor/músculo no FM e no FMCEA foram praticamente a mesma – 2,46 e 2,65, respectivamente.

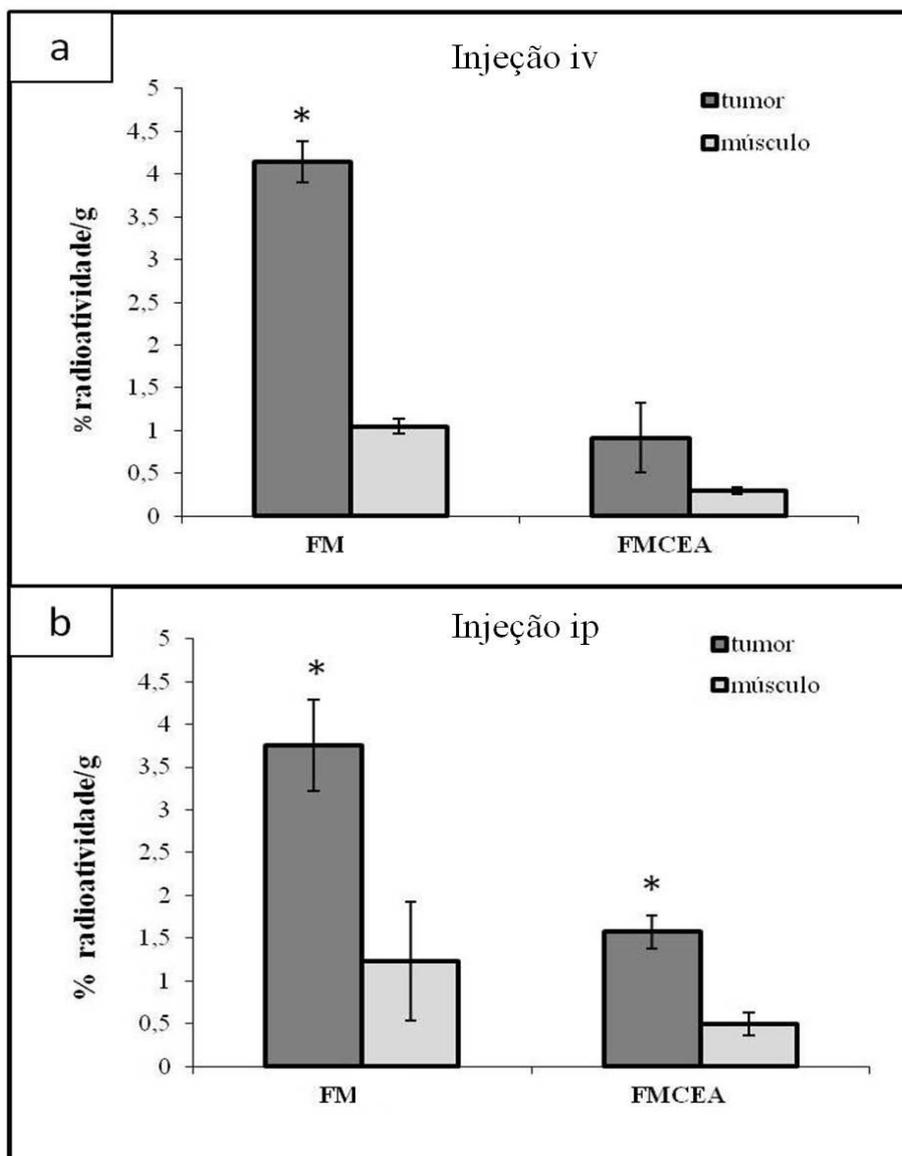


Figura 30. Porcentagem de radioatividade restante por grama de tumor e de músculo após 24 h da administração (a) intravenosa (iv) e intraperitoneal (ip) dos fluidos FM e FMCEA. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tumor e o músculo após a mesma via de administração do mesmo fluido.

3.2. Ressonância Magnética (RM)

Para se avaliar o potencial dos fluidos como agentes de contraste para o diagnóstico do câncer, experimentos de RM foram realizados com animais portadores de tumor 5 h depois de terem recebido os fluidos FM e FMCEA via intravenosa (iv). A região do tumor foi avaliada quanto à perda do sinal (o ferro diminui o sinal na RM), comparando-se a mesma região antes e 5 h após a injeção do fluido, conforme descrito no item 3.5.2 do capítulo Material e Métodos. Como controle positivo desse experimento, um animal portador de tumor recebeu uma injeção it de FM e foi imediatamente submetido à RM. Foram calculadas as intensidades do sinal nos tumores antes e 5 h após as injeções iv de FM e FMCEA e os resultados estão representados na Tabela 11.

Tabela 11. Média do sinal da ressonância magnética calculado para cada grupo experimental antes e após injeções intratumoral (it) ou intravenosa (iv) dos fluidos FM e FMCEA.

Grupo experimental	Média do sinal do tumor antes da injeção	Média do sinal do tumor após a injeção
FM – IT	20,20±3,99	6,66±0,50*
FM – IV	19,66±4,11	11,01±3,06*
FMCEA – IV	16,81±4,52	20,64±5,41

* denota diferença significativa ($p < 0,05$), em um mesmo grupo, do sinal após a injeção do fluido em comparação ao sinal antes da injeção.

Como se pode observar na Tabela 11, apenas para o fluido FM foram observadas reduções significativas no sinal da RM para a região do tumor, especialmente quando este fluido foi injetado via IT. Com o cálculo da porcentagem de diminuição de sinal (fórmula descrita no item 3.5.2 do capítulo Material e Métodos), observou-se que a injeção IT do FM (controle positivo) provocou uma redução média de $66,40 \pm 4,78$ %. A redução do sinal pôde ser observada na própria imagem adquirida na RM (Figura 31).

Pode-se perceber que, após a administração it do FM, ocorreu uma significativa perda de sinal no tumor, causando, inclusive uma deformação da imagem, o que significa que o FM responde à RM e pode ser utilizado como agente de contraste.

Já para os animais que receberam o FM via iv, essa redução média foi um pouco menor: $47,65 \pm 9,19\%$, mas suficiente para a detecção do FM no tumor após 5 h.

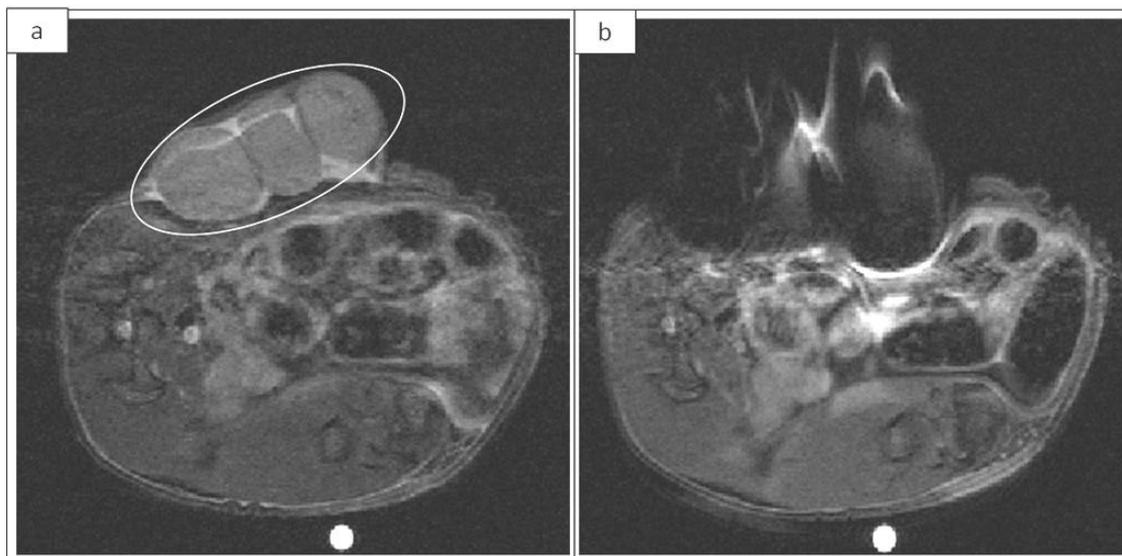


Figura 31. Imagens de ressonância magnética de camundongo portador de tumor (a) antes e (b) imediatamente depois da administração intratumoral de FM. O círculo destaca o tumor.

4. MODELO DE CÂNCER DE MAMA – ESTUDO *IN VITRO*

O FMCEA foi utilizado também no modelo de câncer de mama murino. Para que se pudesse dar prosseguimento aos experimentos *in vivo*, era necessária a avaliação da possível citotoxicidade *in vitro* desse fluido também para a linhagem de mama 4T1. Por isso, o ensaio de MTT foi realizado com as células 4T1 cultivadas com o FMCEA em diferentes concentrações de ferro, conforme descrito no item 4.2 do capítulo Material e Métodos.

Os dados obtidos no ensaio de MTT (Figura 32) mostram que o FMCEA não causou toxicidade às células 4T1 em nenhum dos tempos de tratamento avaliados. Diante desse resultado, o FM e o FMCEA foram avaliados quanto à biodistribuição após injeção ip em camundongos portadores de tumor de mama.

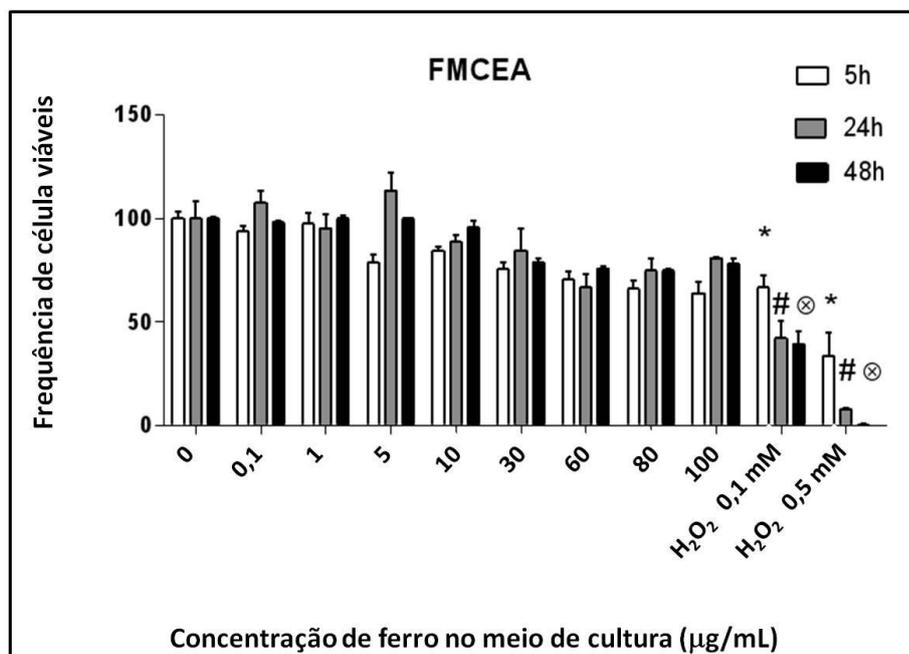


Figura 32. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de FMCEA sobre a linhagem de câncer de mama murino 4T1, por meio de ensaio de MTT. Células foram cultivadas com FMCEA em diferentes concentrações de ferro. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo. Símbolos diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo do tempo de cultura de (*) 5 h, (#) 24 h e (⊗) 48 h

5. MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO – ESTUDO *IN VIVO*

Esse estudo foi realizado para a avaliação da presença dos fluidos FM e FMCEA no tumor após 1 h, 5 h, 15 h ou 24 h de administração intraperitoneal, por meio da coloração de Perls.

A análise dos cortes histológicos mostrou que o tumor se desenvolveu no tecido mamário (Figura 33a), inclusive com células tumorais presentes entre as células do tecido adiposo da glândula mamária (Figura 33b) e em divisão celular (Figura 33c).

Após a injeção intraperitoneal, ambos os fluidos FM e FMCEA foram encontrados nos tumores nos diferentes tempos de tratamento. Em alguns casos, o ferro foi detectado principalmente na periferia do tumor (Figura 33d) enquanto em outros, ele estava disperso por toda a massa tumoral (Figura 33e). Em alguns cortes, o ferro foi encontrado também no citoplasma das células tumorais, mesmo em áreas necróticas (Figura 33f).

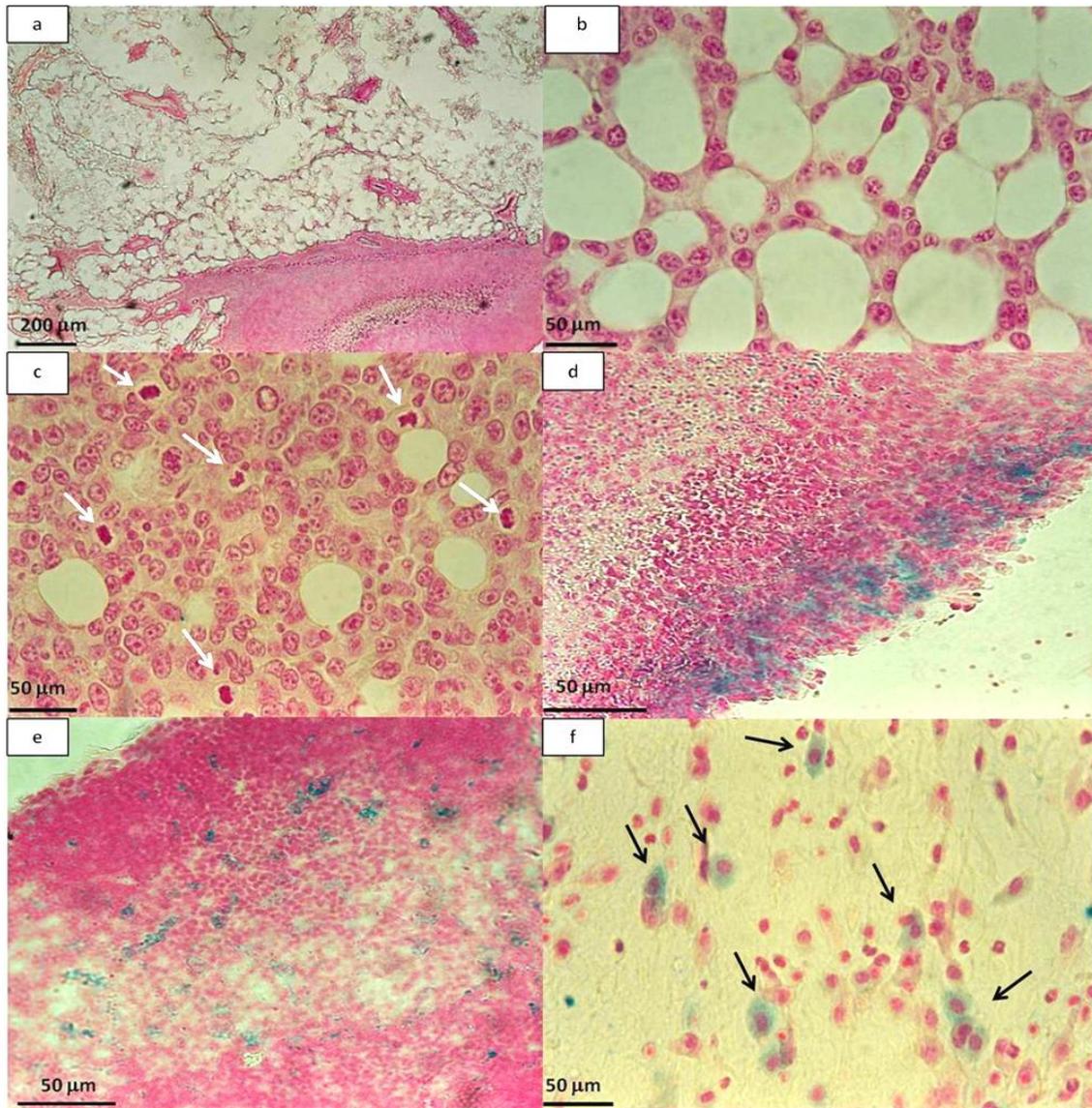


Figura 33. Fotomicrografias de tumores em mama de camundongo balb-c induzido por células de carcinoma mamário 4T1. (a) massa tumoral desenvolvida no tecido mamário; (b) células tumorais entre as células do tecido adiposo da glândula mamária; (c) figuras mitóticas no tecido mamário; (d) ferro detectado na periferia do tumor 1h após injeção it do FMCEA; (e) ferro detectado de forma dispersa no tumor 1h após injeção it do FM; (f) ferro detectado no citoplasma das células tumorais. Setas brancas indicam as células em divisão celular. Setas pretas indicam células com ferro no citoplasma.

Os cortes foram então classificados quanto à presença e a intensidade de ferro. Os resultados obtidos (Figura 34) estão apresentados de duas formas: (a) frequência de cortes com ferro, o que indica a frequência de cortes que foram classificados como (+), (++) , (+++) e (++++); (b) porcentagem de quantidade de ferro em cada grupo.

Como se pode observar na Figura 34a, a frequência de cortes histológicos do tumor com ferro diminuiu ao longo do tempo após a administração do FM. Por outro lado, essa mesma frequência se manteve constante até 24 h após a injeção do FMCEA. Quando se considera a porcentagem de ferro no tumor (Figura 34b), esse fenômeno também ocorreu. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos tratados com FM e com FMCEA, pode-se perceber que a quantidade de ferro nos tumores dos animais que receberam FM diminuiu ao longo do tempo, enquanto que nos tumores dos que receberam FMCEA, essa quantidade após 24 h é semelhante à detectada após 1h.

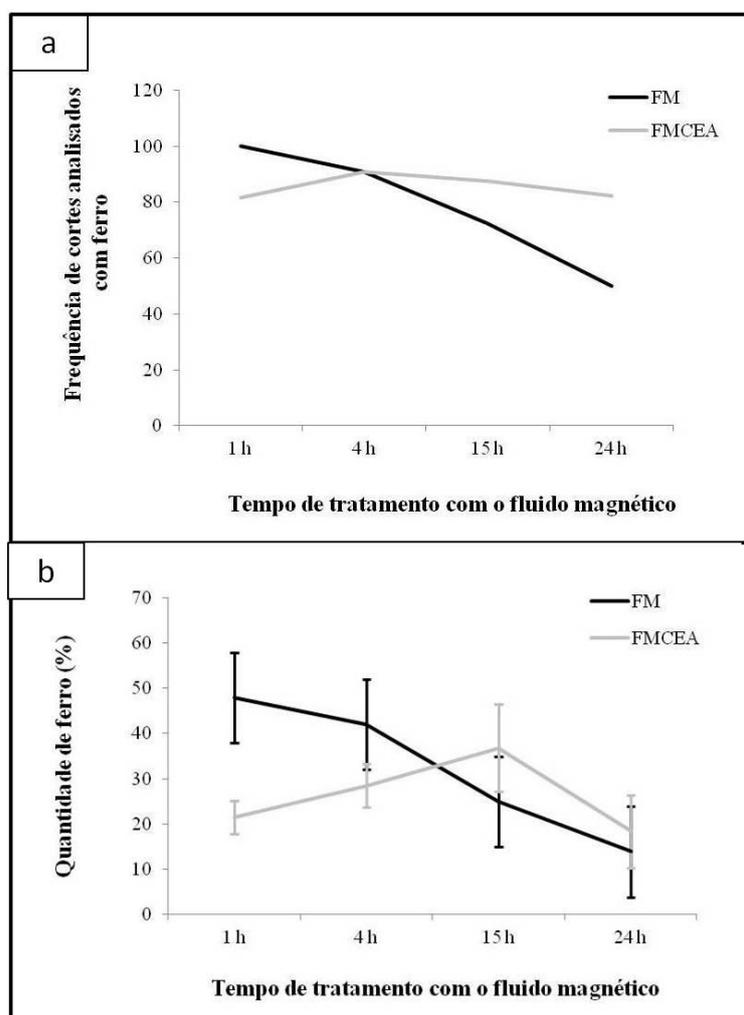


Figura 34. (a) Frequência de cortes analisados com ferro e (b) porcentagem da quantidade de ferro nos tumores coletados 1, 4, 15 e 24 h após a administração intraperitoneal de FM e FMCEA.

DISCUSSÃO

A destruição específica das células tumorais sem que ocorram danos às células saudáveis é atualmente o principal desafio no tratamento do câncer, já que as principais terapias utilizadas ainda induzem muitos efeitos colaterais, como toxicidade sistêmica. Devido à distribuição aleatória e à rápida eliminação dos fármacos pelo organismo, é necessário administrar doses altamente concentradas dos mesmos, as quais aumentam os efeitos colaterais induzidos (Pohlmann & Schwartzmann, 2004; Nie *et al.*, 2007).

Além disso, estudos mostram que o sucesso da terapia escolhida depende do diagnóstico da doença ainda nas fases iniciais. A possibilidade de cura e a taxa de sobrevivência livre da doença em cinco anos aumentam com a detecção precoce do câncer (Wajed, 2010; Cancer Research UK, 2011).

Por isso, métodos de tratamento que apresentem maior especificidade para os tecidos neoplásicos e tecnologias de diagnóstico por imagem que sejam minimamente invasivas e eficientes na detecção de células malignas têm sido, nas últimas décadas, um importante foco de estudos. Nesses dois setores da conduta da erradicação do câncer (terapia e diagnóstico), a utilização de materiais nanoestruturados vem se destacando devido a algumas características interessantes e vantajosas, como o fato de um mesmo nanomaterial possuir, simultaneamente, atribuições de terapia e diagnóstico (teragnóstico).

Diante disso, neste estudo, nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA foram conjugadas a anticorpos anti-CEA com o objetivo de se obter um nanomaterial potencialmente teragnóstico e altamente específico para células tumorais positivas para o CEA, um importante biomarcador para diferentes tipos de câncer (Locker *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2007).

Nanopartículas magnéticas (NPM) foram escolhidas para o desenvolvimento desses fluidos por apresentarem características bastante interessantes que permitem sua multifuncionalidade. No tratamento do câncer, podem ser utilizadas tanto como carreadoras de drogas como na magnetohipertermia, inclusive simultaneamente, e com resultados bastante promissores.

Em um estudo *in vitro*, Carneiro *et al.* (2011) avaliaram o efeito citotóxico do agente anti-tumoral citrato de ródio (II) livre e associado a NPM de maghemita (encapsuladas ou não em lipossomos) em linhagens celulares de carcinoma mamário e de ducto mamário normal e observaram que a associação do citrato de ródio (II) a NPM aumentou em 10 vezes a sua citotoxicidade em células de carcinoma mamário e, ao mesmo tempo, diminuiu a citotoxicidade em células normais da mama, revelando uma

importante função das NPM em tornar o tratamento anti-neoplásico mais eficaz, com menos efeitos adversos para as células saudáveis. Corroborando esses resultados, Carneiro (2011) observou que o tratamento de animais portadores de tumor de mama com o citrato de ródio (II) associado a NPM encapsuladas em lipossomas propiciou uma taxa de sobrevivência em 23 dias de 100% em contraposição a uma taxa de 75% para os animais tratados com a droga livre.

A eficiência do fluido desenvolvido no presente estudo como carreador de drogas antitumorais poderia ainda ser aumentada ao se explorar o fato de suas nanopartículas serem magnéticas e poderem ser utilizadas na magnetohipertermia. Sabe-se que o aumento da temperatura tumoral aumenta a radiosensibilização e a citotoxicidade de agentes quimioterápicos (Matsumine *et al.*, 2007) e por isso o uso de NPM para uma ação terapêutica sinérgica tem sido avaliado (Sonoda *et al.*, 2010; Meenach *et al.*, 2012). Em um estudo *in vitro* com células de sarcoma de rato, foi observado que enquanto o tratamento com o quimioterápico cisplatina induziu morte de aproximadamente 25% das células, no tratamento com cisplatina associada à magnetohipertermia, a frequência de morte celular subiu para mais de 75% (Babincová *et al.*, 2008).

Além de promissor para o tratamento do câncer, o fluido desenvolvido com NPM também poderia ser utilizado no diagnóstico por imagem. Segundo Johannsen *et al.* (2007), quase 90% das nanopartículas injetadas em tecidos são detectadas na tomografia computadorizada, permitindo uma análise acurada. Entretanto, a aplicação em detecção por imagem mais avaliada para NPM é a ressonância magnética (RM), especialmente por se mostrarem mais biocompatíveis e apresentarem um maior tempo de circulação do que o gadolínio, o agente de contraste mais comumente usado na clínica médica (Kim *et al.*, 2011). Em vários estudos *in vivo*, as NPM têm se mostrado bastante eficientes na RM tanto após injeção endovenosa como intraperitoneal, especialmente quando associadas a moléculas direcionadoras (Ku *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2010).

Por isso, no presente estudo, uma molécula direcionadora, um anticorpo, foi utilizada para aumentar a especificidade do fluido magnético às células-alvo, de modo a concentrá-lo no tumor. Segundo Nie *et al.* (2007), a conjugação de moléculas direcionadoras a NPM permite o acúmulo preferencial dessas nanopartículas no tumor, ou mesmo em células cancerosas individuais, inclusive quando administradas sistemicamente (DeNardo *et al.*, 2005). Além disso, a administração sistêmica dessas

partículas possibilitaria que elas alcançassem cânceres mais profundos ou mesmo aqueles ainda não detectados (Campbell, 2007). Interessantemente, a obtenção de um fluido composto por NPM associadas a anticorpos acumula dois possíveis métodos de direcionamento: o magnético e o biológico. O direcionamento magnético pode aumentar em até oito vezes o acúmulo das NPM no tumor (Cheng *et al.*, 2012). Em relação ao direcionamento biológico, Chen *et al.* (2007) observaram um acúmulo cinco vezes maior de NPMs em tumores de mama positivos para o receptor de crescimento epidermal humano (HER 2) quando estas estavam associadas a anticorpos anti-HER. Além de um acúmulo maior, os autores também observaram a especificidade das NPM conjugadas a anti-HER, já que estas eram dez vezes mais absorvidas por tumores com alta expressão de HER 2 do que por tumores com baixa expressão desse biomarcador.

Para a escolha do anticorpo a ser associado às NPM, foi testada a expressão de alguns biomarcadores tumorais em diferentes linhagens de células de câncer de intestino (LS174T, HT-29, HCT116) e de mama (TAE, TSE, 4T1 e MCF-7), dois tipos de câncer que figuram entre os mais frequentes e com maior taxa de mortalidade no mundo (Vettore & Caballero, 2004; Center *et al.*, 2009; Forouzanfar *et al.*, 2011; World Health Organization, 2012).

Dentre as combinações testadas para as linhagens celulares de câncer de intestino, observou-se, por ELISA, que o CEA era expresso nas células LS174-T e HT-29 (Figura 9). De fato, as células LS174T são descritas como positivas para o CEA (Fahlgren *et al.*, 2003), produzindo cerca de $2 \mu\text{g}/10^6$ células a cada 10 dias (ATCC, 2012). É importante ressaltar que apesar de o CEA ter sido detectado nas células HT-29, a literatura científica mostra que essa linhagem é caracterizada pela baixa expressão de CEA (Fahlgren *et al.*, 2003; Jung & Lee, 2006). Já nas células HCT116, o CEA não foi detectado, o que está de acordo com os dados da literatura. Wang *et al.* (1999) mostraram que essa linhagem apresenta baixos níveis de expressão desse antígeno, produzindo cerca de $1-2 \text{ ng}/10^6$ células a cada 3 dias.

Com relação às linhagens celulares de câncer de mama testadas, a expressão do CEA foi detectada, por imuno-histoquímica, apenas nos tumores de mama murino 4T1 (Figura 10). Este é o primeiro estudo que relata a expressão de CEA em células murinas 4T1, apesar desta já ter sido descrita em células de câncer de mama humano por vários autores, sendo, inclusive, indicado como biomarcador de diagnóstico (Martin *et al.*, 1976; Harris *et al.*, 2007; Di Gioia *et al.*, 2011).

Além do CEA, também foi testada a expressão dos receptores de estrógeno nas células 4T1 e MCF-7 e de progesterona nas células 4T1, pois, de acordo com dados na literatura, esses receptores são superexpressos em diferentes tipos de câncer de mama (Folgueira & Brentani, 2004; Taneja *et al.*, 2010). Entretanto, neste estudo somente nas células 4T1 foram detectados os dois receptores (Figura 10).

Diante desses resultados, optou-se pela conjugação do anticorpo anti-CEA a nanopartículas de maghemita. É importante ressaltar que o anti-CEA já foi aprovado pela agência americana FDA (*Food and Drug Administration*) para exames com imagem e é bastante promissor para a terapêutica do câncer. Além disso, Shish *et al.* (1990) relataram, em modelo murino de câncer colorretal, redução nos efeitos adversos do agente 5-fluorouridine (FUR) quando este foi conjugado com o anti-CEA, além de inibição do crescimento do tumor mais eficiente do que a observada para a droga livre. Da mesma forma, radioisótopos conjugados ao anti-CEA também já foram testados para o tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo o colorretal, e se mostraram promissores em estudos clínicos de fases I (Wong *et al.*, 2006) e II (Behr *et al.*, 2002).

A escolha do anti-CEA também permitiu a utilização de dois modelos de câncer diferentes, de intestino e de mama, o que torna o estudo mais interessante devido à versatilidade do fluido magnético desenvolvido. Para o modelo de câncer de intestino, foi escolhida a linhagem celular LS174T. Apesar do CEA também ter sido detectado nas células HT-29, esta linhagem foi descartada devido à controvérsia com os dados descritos na literatura.

A linhagem LS174T (46XX ou 45X, dependendo do número da passagem celular) foi estabelecida em 1976 e consiste em uma linhagem variante após tripsinização das células LS180, estabelecidas no mesmo ano a partir de uma mulher caucasiana de 47 anos com adenocarcinoma de cólon primário. As células LS174T, mesmo depois de imortalizadas, mantêm características neoplásicas, como a produção de CEA e a capacidade de formar tumor quando inoculadas em camundongos imunodeprimidos (Tom *et al.*, 1976; Rutzky *et al.*, 1980).

Camundongos imunodeprimidos foram utilizados para crescimento xenográfico de tumor pela primeira vez em 1960 e desde então tem sido o principal modelo de estudo *in vivo* de diversos tipos de câncer (revisto por Kelland, 2004). Este modelo fornece importantes informações sobre o tumor e sua resposta a tratamentos anticâncer apresenta uma boa correlação com os resultados clínicos (revisto por Winograd *et al.*, 1987). Recentemente também foi relatado que a expressão gênica no tumor crescido em

camundongos imunodeprimidos é bastante similar à expressão gênica encontrada nos pacientes com aquele mesmo tipo de tumor, indicando uma metodologia potente desde que a linhagem celular escolhida seja adequada para os objetivos propostos (Kashofer *et al.*, 2009). Por isso, neste estudo, as células LS174T foram utilizadas para a indução de tumor em camundongos *nude*.

Já para o modelo de câncer de mama, foi utilizada a linhagem murina 4T1. Ela foi estabelecida a partir de um carcinoma mamário desenvolvido espontaneamente em um camundongo Balb-c e apresenta características similares ao câncer de mama humano no estágio IV de desenvolvimento, como a capacidade de gerar metástases espontaneamente em osso, fígado, rim e pulmão. Além disso, as células 4T1 são facilmente inoculadas na glândula mamária dos camundongos, permitindo um modelo ortotópico (revisto por Yoneda *et al.*, 2000 e Carneiro, 2011), com o desenvolvimento no tumor no mesmo sítio anatômico que ele se desenvolveria espontaneamente. Isso é bastante interessante, já que o ambiente do órgão em que o tumor se encontra pode alterar o seu comportamento (Talmadge *et al.*, 2007).

Tendo-se determinado os modelos tumorais a serem estudados, foi necessária a avaliação da possível citotoxicidade do fluido composto de nanopartículas de maghemita com DMSA, uma vez que esse tipo de análise é um quesito indispensável para o desenvolvimento de novos materiais com aplicação biomédica (Ankamwar *et al.*, 2010). Dessa forma, o teste do MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade das células LS174T e HCT116 cultivadas com FMs em diferentes concentrações de ferro e por diferentes períodos de tempo (Figura 12).

O teste de MTT mostrou que, apesar de uma diminuição inicial na viabilidade das células HCT116, estas foram capazes de se recuperar e atingir o mesmo nível de viabilidade do controle negativo. Pode-se observar que o tempo para a recuperação celular foi dependente da concentração de ferro. Para a cultura das células com concentração de ferro de 60 µg/mL, a viabilidade celular foi comparável ao controle negativo já em 12 h, enquanto que para a concentração de ferro de 80 µg/mL, foi necessário um período de 48 h para se atingir esse mesmo resultado. É possível que as células tenham sido capazes de se recuperar porque não estavam mortas nem danificadas de uma forma irreversível. De fato, para células epiteliais cultivadas por 25 h com nanopartículas de maghemita e carbono, Berg *et al.* (2010) observaram diminuição na viabilidade das células, por meio do teste de MTT mas não detectaram morte celular por meio de outras metodologias.

Já para as células LS174T, não foi observada redução na viabilidade até 24 h de cultivo com FMs nas diferentes concentrações de ferro. Resultados semelhantes foram obtidos por Chen *et al.* (2011) em um estudo com células HeLa cultivadas por 24 horas com nanopartículas de magnetita cobertas com óxido de grafeno. Estas foram consideradas pelos autores como nanopartículas biocompatíveis porque não causaram diminuição na viabilidade celular mesmo em concentrações de ferro de até 80 µg/mL, a mesma concentração máxima utilizada neste estudo.

Na literatura científica, tem se sugerido que nanopartículas de magnetita podem ser consideradas biocompatíveis se não provocarem queda na viabilidade de diferentes linhagens de células cultivadas com uma concentração de ferro de até 10 µg/mL, mesmo que em uma concentração de 100 µg/mL elas venham a causar alguma redução na viabilidade (Ankamwar *et al.*, 2010). Nesse sentido, apesar de um decréscimo na viabilidade das células LS174T cultivadas com FMs em concentrações de ferro variando entre 30 e 80 µg/mL, o fluido pode ainda ser considerado biocompatível.

Além disso, ao se comparar, entre as duas linhagens, a viabilidade das células nos grupos de controle positivo, pode-se perceber que as células HCT116 foram mais susceptíveis aos efeitos do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) do que as células LS174T. Após serem cultivadas por 5 h com 0,1 mM de H₂O₂, as células HCT116 apresentaram redução significativa na viabilidade celular, enquanto que para as células LS174T, essa redução só foi observada após 12 h de cultura. Assim como o peróxido de hidrogênio, as nanopartículas de ferro também podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) (Foy & Labhasetwar, 2011). Assim, é possível que a diminuição transiente na viabilidade celular observada para as células HCT116 após cultivo com FMs tenha sido causada por ERO. Dessa forma, se os efeitos do peróxido de hidrogênio nas células LS174T são mais tardios em relação aos efeitos nas células HCT116, pode-se sugerir que esteja ocorrendo o mesmo padrão para os efeitos do FMs e, conseqüentemente, que as células LS174T seriam capazes de se recuperar, atingindo um nível de viabilidade celular comparável ao controle negativo, se o teste de MTT fosse realizado em períodos de tempo mais longos. De acordo com o que é proposto na literatura, portanto, os resultados de MTT mostraram que o FMs contendo nanopartículas de magnetita cobertas com DMSA pode ser considerado biocompatível.

Por isso, o FMs foi utilizado para a conjugação das NPM ao anti-CEA e obtenção de um volume de FMsCEA suficiente para os experimentos. Após a conjugação, o FMsCEA foi caracterizado por espalhamento de luz, assim como o seu

precursor FMs (Figura 14). No FMs, as nanopartículas apresentaram uma típica distribuição normal dos diâmetros hidrodinâmicos, com média de 190 nm, confirmando a caracterização prévia realizada no momento de sua síntese. Após a conjugação, essa média aumentou para 500 nm. O aumento no tamanho hidrodinâmico de NPM conjugadas a anticorpos é frequentemente descrito (Driskell *et al.*, 2011; Ling *et al.*, 2011). No entanto, ele é geralmente menor, variando entre 15 e 60 nm. O grande aumento observado neste estudo está provavelmente relacionado não apenas à ligação do anticorpo como também a um processo de agregação das NPM, pois tanto o aumento no tamanho das NPM quanto a sua agregação aumentam o espalhamento de luz (Jans *et al.*, 2009). Além de uma possível agregação das NPM após a conjugação do anticorpo, a análise do espalhamento de luz também sugere uma sedimentação, pois foi observado um pequeno pico de 500 nm apenas na terceira medida da triplicata. Apesar de uma pequena agregação e da sedimentação das NPM ao longo do tempo, o potencial zeta do fluido FMsCEA (-38 mV) está de acordo com os valores descritos para NPM conjugadas a anticorpos e sugere estabilidade do fluido (Satishkumar *et al.*, 2011).

O FMsCEA também foi avaliado por espectroscopia Raman com o objetivo de se avaliar a eficiência do processo de conjugação do anti-CEA às NPM. A técnica se mostrou adequada e satisfatória na análise da modificação da superfície das NPM em todas as etapas, desde a cobertura com DMSA até a ligação do anti-CEA (Figura 15). No fluido FMs, as bandas relacionadas ao carboxilato e os modos Raman das ligações (C-S) e (C-C) da cadeia do DMSA indica que o DMSA está covalentemente ligado à superfície das NPM por meio do carboxilato terminal. Além disso, no espectro do FMs, também foi observado o modo Raman (ν S-S), que é característico das ligações dissulfeto (S-S) entre as moléculas vizinhas no DMSA ligado às NPM e tem uma importante função na estabilização da camada molecular de superfície das NPM (Soler *et al.*, 2011).

A espectroscopia Raman também permitiu a observação da ligação do *linker* NHS utilizado na conjugação à superfície das NPM no fluido intermediário FMsEN: os picos em 1625, 1180 e 751 cm^{-1} são respectivamente associados às vibrações das ligações C=O, S=O e N-O do NHS. Além disso, quando se compara o FMs e o FMsCEA, percebe-se que as variações dos modos vibracionais dos grupos carboxilato são pequenas, o que sugere que o NHS não está fortemente ligado ao DMSA, como esperado, já que o NHS é apenas um intermediário para a ligação do carboxil do DMSA aos grupos amina das moléculas de anticorpo. Essa reação entre o DMSA e o anticorpo

também foi evidenciada pelo espectro Raman do FMsCEA, que mostra um pico em 1655 cm^{-1} que não ocorre no espectro do FMs. De acordo com Parker (1983), o pico Raman em $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ é atribuído ao *stretching* C=O de amina secundária. Portanto, a presença desse pico é devida à vibração de um grupo carbonil formado após a conjugação do anti-CEA às NPM. Além disso, de uma maneira muito interessante, os espectros de FMsCEA e do anti-CEA livre são bastante parecidos, pois os picos presentes no espectro do anti-CEA livre atribuídos a aminoácidos, estruturas de proteínas e grupos aminas e carboxil terminais também estão presentes no espectro do FMsCEA, confirmando o sucesso da conjugação. É importante observar que esses picos semelhantes entre os espectros de FMsCEA e anti-CEA livre apresentam mudanças muito leves na energia vibracional, indicando que o processo de conjugação não ocasionou desnaturação da proteína e consequentemente sugerindo que as funções biológicas do anti-CEA conjugado estão preservadas.

De acordo com Occhipinti *et al.* (2011), a conservação da função biológica de anticorpos após conjugação geralmente não pode ser evidenciada pela escassez de métodos confiáveis que forneçam informações sobre características estruturais/conformacionais indicativas da funcionalidade biológica. Entretanto nesse estudo o Raman foi utilizado com sucesso como uma ferramenta-chave na investigação das etapas do processo de conjugação do anti-CEA às NPM. Além de ser adequado para demonstrar a ligação química do anti-CEA às NPM, ele também forneceu informações que sugeriam a preservação da funcionalidade do anti-CEA.

A funcionalidade do anti-CEA conjugado foi confirmada por ELISA (Figura 17), uma vez que foi capaz de se ligar às células LS174T. O ELISA também mostrou que a marcação das células LS174T pelo FMsCEA foi estatisticamente maior do que a observada para as células HCT116, mostrando a especificidade do fluido. Além disso, não houve marcação quando o sobrenadante 3, que representa a última lavagem das NPM no processo de conjugação, foi utilizado como anticorpo primário no ELISA, revelando que todo o anticorpo não ligado foi eficientemente removido do FMsCEA.

Com os resultados do ELISA pode-se afirmar, portanto, que o FMsCEA é altamente específico para células que expressam CEA, o que também foi confirmado pelos experimentos de coloração de Perls (Figura 18). Além disso, os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que existe uma tendência de aumento da quantidade de células LS174T, positivas para o CEA, que interiorizam NPM quando estas estão associadas ao anti-CEA (Tabela 8). Isso significa que o anti-CEA conjugado

às NPM, além de propiciar a ligação específica do FMsCEA, também facilitou a interiorização das NPM pelas células-alvo. Esse resultado indica que o FMsCEA pode ser um material promissor para o carregamento de drogas, já que a eficiência de um sistema de entrega de drogas com base em NPM pode depender do acúmulo das NPM dentro das células alvo (Acharya *et al.*, 2009).

A amostra FMsCEA desenvolvida neste estudo mostrou potencialidade para ser utilizada em um sistema de diagnóstico, pois ela responde a um campo magnético – por ser constituída de nanopartículas de ferro, podendo assim ser utilizada na magnetohipertermia, possui uma superfície capaz de ser modificada para o acoplamento de drogas que podem ser interiorizadas pelas células malignas e também pode ser utilizada em metodologias de imagem para a detecção dos tumores ou de micrometástases, uma vez que o CEA também é um biomarcador de células circulantes (Gervasoni *et al.*, 2007). De fato, em um experimento *in vitro* piloto com o microtomógrafo (Figura 16), pôde-se confirmar o contraste proporcionado tanto pelo FMs como pelo FMsCEA.

A partir da observação de que a amostra desenvolvida teria grande potencial para aplicação biomédica, seguiu-se com os experimentos *in vivo* em modelo de câncer de intestino e de mama. Para isso, um novo lote de fluido magnético de maghemita com DMSA foi sintetizado (FM) e submetido ao processo de conjugação do anti-CEA (FMCEA).

A biodistribuição das NPM em camundongos portadores de tumor induzido por células LS174T foi então avaliada após injeções intraperitoneal (ip) ou intravenosa (iv) dos fluidos. Para isso, os fluidos foram previamente associados a um elemento radioativo, o tecnécio (^{99m}Tc). O ^{99m}Tc é um metal radioativo bastante comum nos radiofármacos utilizados em exames de imagem de tumor por técnicas cintilográficas (Kumar *et al.*, 2012), como por exemplo a cintilografia de osso recomendada para pacientes com câncer de próstata com risco de doença metastática (revisado por Lecouvet *et al.*, 2012).

A marcação radioativa de nanopartículas permite estudos de biodistribuição quantitativa *ex vivo* desses nanomateriais, além de possibilitar a obtenção, com grande sensibilidade, de imagens seriais de animais vivos, diminuindo o número de animais necessários para o estudo e a variabilidade de resposta interindividual (Schipper *et al.*, 2007; Kryza *et al.*, 2010). Neste estudo, a biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA foi avaliada tanto por meio de imagens cintilográficas obtidas por SPECT após diferentes

tempos da administração dos fluidos, como por contagem da radioatividade em órgãos coletados 24 h após a injeção dos mesmos.

As imagens cintilográficas obtidas na SPECT mostraram que, após a administração iv, houve um acúmulo do FM inicialmente na bexiga e, em seguida e gradualmente, no fígado e nos rins, sendo que o acúmulo máximo nesses órgãos ocorreu em 5 h (Figura 20). Para o FMCEA, esse mesmo padrão foi observado, com a diferença de que, em 4 h, o acúmulo no fígado foi maior do que nos rins (Figura 22). O acúmulo dos fluidos FM e FMCEA no fígado e nos rins após injeção iv foi confirmado por contagem radioativa 24 após a injeção. Este experimento também mostrou que as NPM se acumularam no baço, além dos órgãos já mencionados (Figura 27). Este resultado está de acordo com os resultados de Cho *et al.* (2010), que também descreveram esses três órgãos como os principais locais de acúmulo de nanopartículas de ferro cobertas com sílica 2h após injeção iv. Da mesma forma, nanopartículas de ferro cobertas com dextran tiveram um acúmulo máximo no fígado e no baço de camundongos aproximadamente 2 h após administração iv (Estevanato *et al.*, 2011). Vários outros estudos também apontam o fígado como principal órgão de acúmulo de diferentes nanopartículas após injeção iv, como, nanopartículas de ferro recobertas com ácido oleico administradas em ratos (Jain *et al.* 2008) e de ouro administradas em camundongos (Sadauskas *et al.*, 2007). Apesar de Sadauskas *et al.* (2007) não terem observado diferenças significativas de quantidade de nanopartículas presentes no fígado em 1, 4 ou 24h, Jain *et al.* (2008) verificaram um acúmulo de nanopartículas de ferro no fígado significativamente maior em 6 h após a injeção iv do que em outros tempos analisados, o que está bem próximo aos resultados obtidos no presente estudo.

Monge-Fuentes *et al.* (2011) também observaram acúmulo de nanopartículas de maghemita cobertas com DMSA em hepatócitos de macacos após injeção iv dessas nanopartículas e sugerem que o importante papel do fígado no metabolismo do ferro, na captura, transformação e acúmulo de metabólitos e na neutralização e eliminação de substâncias tóxicas explica por que esse órgão é o principal local em que nanopartículas de ferro são encontradas após injeção iv. Além disso, o acúmulo de nanopartículas no fígado após injeção iv está relacionado com a captura das mesmas pelo sistema reticulo-endotelial (RES) e a atividade fagocitária das células de Kupfer – os macrófagos residentes do fígado (Jain *et al.*, 2008). Estudos mostram que as nanopartículas administradas via iv que são encontradas no fígado estão em sua grande maioria no interior das células de Kupfer, apesar de também serem encontradas, em menor

quantidade, nas células endoteliais e no interior dos capilares (Sadauskas *et al.*; 2007; Lunov *et al.*, 2010; Estevanato *et al.*, 2011).

Além das células de Kupfer, os macrófagos do baço também constituem o RES e, por isso, o acúmulo das NPM no baço observado 24 após injeção iv dos fluidos FM e FMCEA (Figura 27) também pode estar associado à captura pelas células desse sistema. Weissleder *et al.* (1989) relataram captura de cerca de 90% das nanopartículas de ferro administradas via iv em ratos pelas células do RES e relacionaram esse fato à presença de nanopartículas nas células de Kupfer e nos macrófagos da polpa vermelha do baço.

Além de presentes no fígado e no baço, estudos mostram que cerca de 25% das nanopartículas administradas via iv são eliminadas por meio da urina e das fezes (revisto por Jain *et al.*, 2007 e Kunzmann *et al.*, 2011), o que significa que a detecção de nanopartículas nos rins e na bexiga após administração iv é bastante plausível. Nesse estudo, a avaliação da biodistribuição dos fluidos FM e FMCEA mostrou um grande acúmulo dos fluidos tanto na bexiga como nos rins (Figuras 20, 22 e 27).

No entanto, comparando-se as imagens cintilográficas dos animais que receberam FM via iv (Figura 20) com as imagens daqueles que receberam FMCEA pela mesma via (Figura 22), pode-se observar uma diferença após 20 h da injeção dos fluidos. Enquanto que o FM continuou presente em grande quantidade especialmente no fígado e nos rins, quase não foi detectada radioatividade em 23 h para os animais que receberam FMCEA. Isso pode ter ocorrido devido a vários fatores. Um deles é o fato de que a quantidade de radioatividade injetada no grupo que recebeu FMCEA foi significativamente menor do que a injetada no grupo que recebeu FM (Tabela 9). Considerando que o tecnécio tem uma meia-vida relativamente curta – 6 h (Kryza *et al.*, 2011) – é possível que, após 23 h, o decaimento da radioatividade do grupo FMCEA tenha contribuído para a baixa quantidade de radioatividade detectada, especialmente porque a avaliação deste grupo foi feita 3 horas após a última avaliação do FM, em 20 h, diminuindo ainda mais a quantidade de radioatividade no grupo FMCEA. Além disso, no processo da conjugação do tecnécio aos fluidos, foi observado por cromatografia que, para o FM, não havia tecnécio livre, enquanto que para o FMCEA, uma pequena parcela (em torno de 5%) permaneceu não conjugada, em sua forma livre (dados não mostrados). A forma livre do tecnécio, segundo dados da literatura, se acumula, após diferentes vias de administração, nas glândulas salivares e na tireoide (Harden *et al.*, 1969; Zuckier *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012). A parcela de tecnécio livre com uma biodistribuição em uma região não escaneada nos experimento de SPECT

realizados neste estudo pode ter contribuído para a baixa detecção de radioatividade em 23h no grupo tratado com FMCEA via iv.

Um terceiro fator importante a ser considerado para a diferença de detecção de radioatividade após 20h entre os grupos FM e FMCEA que receberam tratamento iv é a diferença de tamanho entre as nanopartículas destes fluidos. Apesar de o lote de fluido magnético utilizado no estudo *in vivo* não ter sido caracterizado após o processo de conjugação do anti-CEA, supõe-se que, assim como o primeiro lote utilizado nos estudos *in vitro*, o tamanho hidrodinâmico inicial das suas nanopartículas (101 nm) também tenha aumentando após a conjugação, pois cada molécula de anticorpo possui aproximadamente 20 nm de tamanho hidrodinâmico (revisto por Alexis *et al.*, 2008) e vários autores relatam este aumento após o processo de conjugação (Driskell *et al.*, 2011; Ling *et al.*, 2011). Além disso, durante o tratamento dos camundongos utilizados neste estudo, teve-se certa dificuldade em administrar a injeção iv do FMCEA. Em alguns animais – que não foram considerados nos resultados apresentados – não foi possível a administração iv pelo fato de que o FMCEA ficava retido na cauda e não atingia a circulação. Esse fato não ocorreu com nenhum camundongo tratado com FM. Acredita-se que a diferença de tamanho entre as nanopartículas dos fluidos possa ter contribuído para esse fato.

Considerando que existia uma diferença de tamanho das nanopartículas dos fluidos FM e FMCEA, a baixa detecção de radioatividade após 20h nos animais que receberam FMCEA em comparação com os que receberam FM pode ter sido causada, também, pela diferença de eliminação dessas nanopartículas com tamanhos diferentes. Fang *et al.* (2006) observaram que a taxa de eliminação de nanopartículas com 243 nm foi mais de quatro vezes maior do que a observada para as mesmas nanopartículas com 80 nm. Conforme revisão de Alexis *et al.* (2008), nanopartículas com tamanho de até 100 nm apresentam menor filtração hepática, maior tempo de circulação e maior taxa de extravasamento para tecidos do que nanopartículas maiores.

Essa mesma diferença na quantidade de radioatividade detectada ao longo do tempo entre os animais tratados com FM e FMCEA foi observada para a administração ip dos fluidos FM (Figura 21) e FMCEA (Figura 23), provavelmente pelos mesmos motivos descritos para a injeção iv: menor quantidade de radioatividade injetada, embora esta diferença não seja significativa (Tabela 9), parte do tecnécio na sua forma livre e diferença de tamanho entre as nanopartículas do FM e do FMCEA. Reddy & Murthy (2004), avaliando a biodistribuição de duas formulações de nanopartículas de

poli butil cianocrilato contendo doxorubicina com tamanhos de 175 e 315 nm após injeção ip em camundongos, observaram que o desaparecimento, da cavidade peritoneal, das nanopartículas maiores foi mais rápido do que o observado para as nanopartículas menores.

Neste estudo, as imagens cintilográficas dos grupos tratados via ip com FM e FMCEA mostraram uma biodistribuição diferente em comparação à administração iv. Ambos os fluidos apareceram na bexiga em aproximadamente 1 h após injeção ip (Figuras 21a e 23a). Em tempos maiores, o FM apareceu principalmente nos rins (Figura 21b e 21c), o que foi confirmado na contagem radioativa dos órgãos (Figura 28). Apesar de não ter sido possível a identificação, nas imagens cintilográficas, da região de acúmulo do FMCEA em tempos maiores (Figuras 23b e 23c), a contagem radioativa dos órgãos mostrou que o rim também foi o principal órgão de acúmulo do FMCEA após injeção ip, embora significativamente em menor quantidade do que o FM (Figura 28b). O padrão diferente de biodistribuição das nanopartículas após administração ip em comparação ao observado para a administração iv pode ser em parte explicado pelo fato de que nanopartículas são reconhecidas e interiorizadas principalmente por células do sistema imune, que podem não utilizar o mesmo repertório de reconhecimento, ou seja, a interação de nanopartículas com os macrófagos peritoneais pode ocorrer de forma diferente da interação com as células de Kupfer, o que, segundo revisão de Kunzmann *et al.* (2011), pode interferir na biodistribuição das nanopartículas.

As diferentes vias de administração dos fluidos FM e FMCEA podem interferir não apenas na biodistribuição, mas também na taxa de eliminação das nanopartículas. Neste estudo, foi detectada uma menor quantidade de radioatividade nos animais que receberam os fluidos via ip (Figuras 21 e 23) em comparação com os animais que receberam o mesmo fluido via iv (Figura 20 e 22), apesar da mesma quantidade de radioatividade injetada (Tabela 9). Isso pode ser uma consequência de diferentes taxas de eliminação das nanopartículas nas duas vias de administração, pois em um estudo com camundongos portadores de tumor induzido por meio de diferentes vias de inoculação de células LS174T, foi observado que a taxa de eliminação de anticorpos radioativos foi maior quando estes foram administrados via ip do que quando administrados via iv (Nayak *et al.*, 2012). Apesar de alguns autores não terem observado diferenças na biodistribuição de nanopartículas após as vias iv e ip (Cirstoiu-

Hapca *et al.*, 2010), outros relataram que a cinética de nanopartículas de ferro de fato difere dependendo da via de administração (Cho *et al.*, 2010).

Além disso, comparando-se a biodistribuição de ambos os fluidos em função da via de administração (Figura 29), pode-se observar que, tanto para o FM como para o FMCEA, enquanto a injeção iv levou a um acúmulo significativamente maior no fígado, a injeção ip levou a um acúmulo significativamente maior na carcaça. Isso é facilmente explicado quando se considera o fluxo dos fluidos após cada via de administração. Na administração ip de agentes quimioterápicos, por exemplo, a droga é capturada da cavidade peritoneal e atinge a corrente sanguínea principalmente pela circulação na veia porta (Markman, 2003). De fato, Tsai *et al.* (2009) observaram que o paclitaxel, um agente quimioterápico, administrado via ip foi absorvido diretamente pelo intestino, levando a um acúmulo da droga nesse órgão, e posteriormente no fígado, pela veia porta, em oposição à administração iv, que levou a um acúmulo inicialmente no fígado. Da mesma forma, no presente estudo, as NPMs administradas via ip podem ter acumulado no intestino. Como este foi coletado juntamente com a carcaça, isso explicaria o acúmulo significativamente maior dos fluidos na carcaça após administração ip, em comparação à administração iv (Figura 29).

Além da avaliação da biodistribuição dos fluidos, os experimentos de SPECT e contagem da radioatividade em órgãos coletados também permitiram avaliar o acúmulo dos fluidos FM e FMCEA no tumor, após as diferentes vias de administração. Quando se considera a radioatividade total detectada no tumor, o acúmulo de FMCEA no tumor foi igual ao do FM após injeção iv (Figura 24) e significativamente maior do que o observado para o FM após administração ip (Figura 25). No entanto, quando se considera a radioatividade detectada por grama de tumor, observou-se um menor acúmulo do FMCEA no tumor do que do FM, tanto na via iv (Figura 27) como na via ip (Figura 28). Isso ocorreu devido à grande diferença dos tamanhos dos tumores (evidenciada pelos pesos dos tumores) entre os grupos que receberam FM em relação aos que receberam FMCEA (Tabela 10). Apesar de essa diferença ter sido significativa apenas para a administração ip, na administração iv também se observou um peso médio dos tumores de 12 vezes maior no grupo do FMCEA em comparação ao grupo do FM, o que não foi significativo devido ao grande desvio padrão. Essa diferença dificultou bastante a comparação entre os fluidos no que concerne ao acúmulo no tumor, pois, o acúmulo de uma droga no tumor depende, além das características físico-químicas da droga, das propriedades físico-químicas e fisiológicas do próprio tumor, como

composição, estrutura, pressão e vascularização, que é bastante heterogênea nos tumores (Brigger *et al.*, 2002). Sabe-se que existe uma relação direta entre crescimento tumoral e angiogênese (Arap *et al.*, 2004), porém, devido à rápida proliferação do tumor, as células endoteliais acompanham esse crescimento acelerado criando uma vasculatura tumoral desorganizada (Maeda *et al.*, 2003; López-Dávila *et al.*, 2012). No entanto, o crescimento dos tumores supera a capacidade de formação de vasos, mesmo dos anormais, resultando em um tecido tumoral heterogêneo, com algumas áreas vascularizadas e outras hemorrágicas ou ainda necróticas, sendo, estas últimas, desprovidas de vasos e de suprimento de sangue (Lunt *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2008). A menor vascularização de parte do tumor resulta em uma menor permeabilidade vascular, o que dificulta o acúmulo de drogas nesse tecido (Abuqayyas & Balthasar, 2012).

A presença desses vasos sanguíneos anormais, juntamente com a anormalidade do próprio interstício tumoral, que é composto por uma densa rede de fibras de colágenos, fibroblastos, macrófagos e outras células do sistema imune, causam uma elevada pressão intersticial, que também é proporcional à densidade celular do tumor (Lunt *et al.*, 2008). Segundo os autores, essa elevada pressão intersticial dificulta a captura de drogas pelo tumor.

Considerando que tumores maiores apresentam, em comparação a tumores menores, maiores áreas necróticas, maior quantidade de vasos anormais e elevada densidade celular, pode-se supor que nos grupos de animais tratados com FMCEA, os tumores tenham apresentado uma elevada pressão intersticial e maiores áreas desprovidas de fluxo sanguíneo, em comparação aos tumores menores dos grupos tratados com FM. Tais características podem ter prejudicado o acúmulo do FMCEA no tumor.

No entanto, apesar desse fato e de que nanopartículas menores acumulam mais intensamente no tumor (Fang *et al.*, 2006), a diferença efetiva entre os grupos tratados com os dois fluidos deve ser considerada a partir da comparação entre a radioatividade detectada por grama de tumor com a de um tecido que, teoricamente, não acumularia os fluidos, como por exemplo o músculo (Figura 30). A razão tumor/músculo é um parâmetro bastante utilizado para a avaliação da eficiência de determinada substância – inclusive de nanopartículas – de se acumular no tumor após alguma via de administração sistêmica (Amirkhanov *et al.*, 2010; Faintuch *et al.*, 2011; Engle *et al.*, 2012).

Neste estudo, para a via iv, a diferença de acúmulo entre tumor e músculo foi significativa apenas para o FM (Figura 30a). Isso provavelmente ocorreu devido ao grande desvio padrão observado nas radioatividades detectadas nos tumores dos animais do grupo FMCEA cujo tratamento foi iv ($0,92 \pm 0,70$). No entanto, a razão tumor/músculo para o FMCEA foi 3,09, o que é estatisticamente igual à razão tumor/músculo para o FM (4,02). Isso significa que não houve diferença entre o acúmulo, no tumor, dos dois fluidos injetados via iv. Da mesma forma, na administração ip, também não houve diferença significativa entre as razões tumor/músculo obtidas para o FM (2,65) e para o FMCEA (2,46). O acúmulo de ambos os fluidos administrados via ip foi significativamente maior no tumor do que no músculo (Figura 30b).

Esses resultados indicam que apesar de o FMCEA ter se mostrado promissor por ser específico para células positivas para o CEA em estudos *in vitro*, a conjugação do anti-CEA às nanopartículas não levou a um direcionamento maior do fluido ao tumor após administração sistêmica.

Isso também foi verificado nos experimentos de ressonância magnética (RM). Camundongos portadores de tumor induzidos por células LS174T foram tratados via iv com os fluidos FM e FMCEA em quantidades correspondentes a 500 μg de ferro por animal e, após 5 h, submetidos ao exame de RM. O objetivo era avaliar se a quantidade dos fluidos acumulada no tumor permitiria que esses fossem utilizados como bons agentes de contraste.

Em relação à quantidade de ferro injetada para o exame de RM, autores relatam a utilização desde 10 μg (Liu *et al.*, 2011) ou 100 μg (Kou *et al.*, 2008) até 400 μg (Tomanek *et al.*, 2011) ou mesmo cerca de 700 μg (Cho *et al.*, 2010) para cada animal. Considerando que Tomanek *et al.* (2011) e Cho *et al.* (2010) utilizaram as nanopartículas conjugada a anticorpos específicos para os tumores que estavam sendo avaliados e obtiveram sucesso na visualização do tumor por RM após injeção iv, decidiu-se utilizar, neste estudo, uma concentração intermediária de 500 μg de ferro por animal. Para o exame de RM também se decidiu por um tempo menor (5 h) do que o utilizado na contagem da radioatividade nos órgãos coletados (24 h) também com base nos resultados de Tomanek *et al.* (2011) e Cho *et al.* (2010). Esses autores observaram que após 20 h, o acúmulo das nanopartículas no tumor já não era tão evidente como nos tempos menores, mesmo com os anticorpos conjugados.

Neste estudo, um controle positivo foi testado ao administrar-se o fluido FM via intratumoral (Figura 31). A injeção it do FM provocou redução significativa do sinal (Tabela 11), o que era o esperado, uma vez que suas nanopartículas de ferro são magnéticas. Uma redução significativa do sinal também foi observada no grupo tratado com o FM via iv (Tabela 11), indicando que o fluido utilizado neste estudo pode ser utilizado como agente de contraste de tumores, mesmo sem estar associado a anticorpos específicos e após administração iv. O acúmulo passivo do FM no tumor foi possível porque, provavelmente, o fluido apresentou um tempo de circulação prolongado permitindo o efeito da retenção e permeabilidade aumentada (efeito EPR). O efeito EPR ocorre porque, devido à rápida proliferação do tumor, as células endoteliais acompanham esse crescimento acelerado, criando uma rede vascular desorganizada, com espaços de até algumas centenas de nanômetros entre as células endoteliais, o que facilita a difusão de nanopartículas no tumor. Além disso, o sistema alterado e reduzido de drenagem linfática nos tumores contribui para essa retenção (Maeda *et al.*, 2003; López-Dávila *et al.*, 2012).

No entanto, não foi observada redução do sinal após a injeção iv do FMCEA. Nos experimentos de RM não houve o problema da variação de fluido injetado, nem de peso dos tumores entre os grupos FM e FMCEA, observados nos experimentos de SPECT e contagem da radioatividade nos órgãos. Portanto, acredita-se que, além da variação no tamanho das nanopartículas dos dois fluidos, cujos efeitos no acúmulo no tumor já foram discutidos, outro fator deve ainda ser considerado: os altos níveis plasmáticos de CEA nos pacientes com câncer colorretal positivo para esse biomarcador (Thomson *et al.*, 1969; Chan *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2012). O CEA difusamente expresso e ancorado na membrana das células cancerosas pode ser clivado e alcançar a circulação sanguínea diretamente ou via linfa (revisto por Conaghan *et al.*, 2008), desempenhando, inclusive, um papel importante no processo de formação de metástases no fígado (Gangopadhyay *et al.*, 1998; Kathib *et al.*, 2005; Tobi *et al.*, 2011).

Apesar de vários resultados promissores no tratamento direcionado ao câncer com quimio e radioterápicos associados ao anti-CEA (Shish *et al.*, 1990; Behr *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2006), Conaghan *et al.* (2008) discutem que o fato desse antígeno estar presente não apenas no tumor mas também na circulação seria uma desvantagem. Segundo os autores, o CEA circulante pode se ligar aos anticorpos ou imunoconjugados terapêuticos e impedir que eles atinjam o seu alvo (tumor), atenuando as respostas

clínicas. De fato, essa é uma possibilidade que não pode ser descartada no presente estudo.

Apesar de o anti-CEA conjugado às nanopartículas não ter propiciado o aumento do acúmulo das nanopartículas no tumor, conforme foi verificado nos experimentos de SPECT, contagem da radioatividade dos órgãos e RM, resultados bastante promissores foram obtidos no modelo de câncer de mama murino 4T1.

Após verificar-se que o FMCEA não era tóxico às células 4T1 (Figura 32), os fluidos foram utilizados na administração ip em camundongos portadores de tumor de mama para a avaliação de seu acúmulo no tumor após diferentes tempos de tratamento.

Os tumores foram coletados 1, 4, 15 e 24 h após a injeção ip de cada um dos fluidos para a detecção de ferro após coloração de Perls, que marca o ferro em azul. Dois parâmetros foram considerados: a frequência de cortes histológicos que apresentavam ferro em qualquer intensidade (Figura 33a) e a quantidade de ferro (Figura 33b) em cada grupo.

Em relação à frequência de cortes com ferro, observou-se que em 1 h, existem mais cortes com FM do que com FMCEA. No entanto, essa frequência se iguala em 4 h e a partir desse ponto, há uma diminuição na frequência de cortes com FM enquanto que esta se mantém constante para os cortes com FMCEA (Figura 33a). Da mesma forma, embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os fluidos, a quantidade de ferro detectada nos tumores dos grupos tratados com FM tende a diminuir ao longo do tempo, enquanto que a detectada nos tumores do grupo tratado com FMCEA permaneceu a mesma após 24 h. Considerando os dois parâmetros, os dados mostram que nos animais do grupo tratado com FM, as nanopartículas chegam mais rápido e em maior quantidade aos tumores do que no grupo tratado com FMCEA, mas também saem e se perdem ao longo do tempo, enquanto que nos animais tratados com FMCEA, as nanopartículas que chegam ao tumor, apesar da menor quantidade, permanecem nele por mais tempo.

O acúmulo das nanopartículas não conjugadas no tumor de mama, assim como o observado para o tumor induzido por células LS174T, ocorreu pelo efeito EPR conforme anteriormente discutido. Quando nanopartículas chegam ao tumor, muitas podem ser interiorizadas por endocitose dependente de clatrina. No entanto, elas também são facilmente expelidas por exocitose (Chithrani & Chan, 2007). A conjugação de moléculas direcionadoras e ligantes a biomarcadores tumorais pode favorecer a interiorização das nanopartículas pelas células-alvo, conforme verificado no

presente estudo nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão (Tabela 8). Além disso, pode evitar, ou pelo menos retardar, o processo de eliminação das nanopartículas pelo tumor. Esses fenômenos foram discutidos por Farokhzad *et al.* (2006) em um estudo com nanopartículas poliméricas contendo o quimioterápico docetaxel encapsulado e funcionalizadas com aptâmeros reconhecedores de PSMA, um biomarcador de câncer de próstata. Os autores observaram que, após injeção it dessas nanopartículas em um modelo murino de câncer de próstata, o tumor teve uma redução significativamente maior do que o observado quando nanopartículas não funcionalizadas com aptâmeros foram injetadas pela mesma via e relacionam esses dados com maior interiorização e maior permanência das nanopartículas conjugadas no tumor.

Neste estudo, os resultados do modelo *in vivo* de câncer de mama murino também sugerem que as nanopartículas do FMCEA permanecem mais tempo no tumor do que as do FM, mesmo após injeção ip. Isso é bastante promissor para um sistema de entrega de drogas e revela que o FMCEA pode ser um importante carreador de drogas quimioterápicas. No entanto, esses resultados também mostraram que o FMCEA se acumula no tumor em menor quantidade do que o FM. Isso pode ter ocorrido devido a alguns fatores, conforme discutido anteriormente, como o tamanho das nanopartículas desse fluido e a presença de CEA circulante.

Mais estudos podem ser desenvolvidos para a superação dessas limitações e obtenção de um fluido altamente específico para câncer de intestino e de mama, que pode ser utilizado como um potente teragnóstico, uma vez que o FMCEA associa dois tipos possíveis de direcionamento: o magnético e o biológico. Além de apresentar potencial como carreador de drogas e agente de magnetohipertermia, este trabalho mostrou o seu potencial também como agente de contraste na tomografia computadorizada (Figura 16) e na ressonância magnética (Figura 31 e Tabela 11), além de poder ser conjugado a um elemento radioativo para diagnóstico por imagem (Figuras 20-23).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1. As células LS174T e 4T1 expressam o CEA e podem ser utilizadas como interessantes modelos tumorais na avaliação de nanomateriais com especificidade para esse antígeno;
2. A amostra de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita cobertas com DMSA (FMs) utilizada neste estudo pode ser considerada biocompatível;
3. A eficácia da conjugação do anticorpo anti-CEA às nanopartículas magnéticas foi confirmada por espectroscopia Raman, que evidenciou a ligação amida entre o grupo carboxil do DMSA e o grupo amina do anticorpo;
4. As nanopartículas do FMsCEA apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 500 nm e potencial zeta de -38 mV;
5. O fluido com nanopartículas conjugadas ao anti-CEA (FMsCEA) desenvolvido neste estudo mostrou, *in vitro*, especificidade às células-alvo;
6. O FMCEA não foi citotóxico para as células LS174T e 4T1;
7. O fígado, os rins e o baço são os principais órgãos onde as nanopartículas conjugadas ou não ao anti-CEA se acumulam após a injeção intravenosa. Entretanto, após injeção intraperitoneal, os rins são os principais órgãos de acúmulo dessas nanopartículas;
8. A conjugação do anti-CEA às nanopartículas não possibilitou maior acúmulo das mesmas nos tumores induzidos por células LS174T ou 4T1 após injeção intravenosa ou intraperitoneal. No entanto, possibilitou a permanência das nanopartículas por maior período de tempo no tumor induzido por células 4T1;
9. O fluido magnético utilizado neste estudo se mostrou adequado para metodologias de imagem, pois promoveu contraste nas técnicas de tomografia computadorizada e ressonância magnética, além de se mostrar adequado para tomografia computadorizada por emissão de foto único, após conjugação com elemento radioativo.

PERSPECTIVAS

Tendo-se comprovado que o fluido magnético com nanopartículas conjugadas com anti-CEA (FMCEA) desenvolvida neste estudo é específico para células-alvo em experimentos *in vitro*, permanece no tumor por mais tempo do que o fluido com nanopartículas sem anticorpo (FM) e apresenta potencial para ser utilizada em técnicas de diagnóstico por imagem, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de (i) elucidar os fatores que impossibilitaram que o FMCEA chegasse ao tumor de forma mais eficaz do que o FM, visando ao aumento do acúmulo do FMCEA no tumor e (ii) avaliar a utilização do FMCEA em diferentes tipos de terapias contra o câncer.

Nesse sentido, pretende-se dar continuidade a esta linha de pesquisa de modo a:

1. desenvolver uma nova amostra de fluido magnético cujas nanopartículas sejam conjugadas a um anticorpo anti-CEA monoclonal murino;
2. avaliar a interferência do tamanho das nanopartículas e do nível de CEA sérico no acúmulo do FMCEA no tumor;
3. avaliar o uso do FMCEA na detecção de tumores, por meio de tomografia computadorizada;
4. avaliar a utilização do FMCEA como sistema de entrega de drogas e na magnetohipertermia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUQAYYAS, L.; BALTHASAR, J. P. Pharmacokinetic mAb–mAb Interaction: Anti-VEGF mab decreases the distribution of anti-CEA mAb into colorectal tumor xenografts. *AAPS J* (2012). *In press*.
- ACHARYA, S.; DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials* 30: 5737-5750, 2009.
- AKBARZADEH, A.; MIKAEILI, H.; ZARGHAMI, N.; MOHAMMAD, R.; BARKHORDARI, A.; DAVARAN, S. Preparation and *in vitro* evaluation of doxorubicin-loaded Fe₃O₄ magnetic nanoparticles modified with biocompatible copolymers. *Int J Nanomedicine* 7: 511-26, 2012.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the cell*. 5 ed. Nova York, EUA: Garland Science, 2008. 1268 p.
- ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol Pharm* 5(4): 505-515, 2008.
- AMIRKHANOV, N. V.; ZHANG, K.; ARUVA, M. R.; THAKUR, M. L.; WICKSTROM, E. Imaging Human Pancreatic Cancer Xenografts by Targeting Mutant KRAS2 mRNA with [111 In]DOTAn-Poly(diamidopropanoyl)m-KRAS2 PNA-D(Cys-Ser-Lys-Cys) Nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 21: 731-740, 2010.
- ANKAMWAR, B.; LAI, T. C.; HUANG, J.H.; LIU, R. S.; HSIAO, M.; CHEN, C. H.; HWU, Y. K. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. *Nanotechnology* 21: 075102, 2010.
- ARAF, M. A.; WALY, M. L.; JRIESAT, S.; ALKHAFAJEI, A.; SALLAM, S. Dietary and lifestyle Characteristics of colorectal cancer in Jordan: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2 (8):1931-1936, 2011.
- ARAP, M. A.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Mecanismos de metástase e angiogênese. In *Oncologia Molecular*. Ferreira, C. G.; ROCHA, J. C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 97-103, 2004.
- ARSALANI, N.; FATTAHI, H.; LAURENT, S.; BURTEA, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Polyglycerol-grafted superparamagnetic iron oxide nanoparticles: highly efficient MRI contrast agent for liver and kidney imaging and potential scaffold for cellular and molecular imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 7(2): 185-94, 2012.
- AKUSHEVICH, I.; KRAVCHENKO, J.; AKUSHEVICH, L.; UKRAINTSEVA, S.; ARBEEV, K.; YASHIN, A. Cancer Risk and Behavioral Factors, Comorbidities, and Functional Status in the US Elderly Population. *ISRN Oncol* 415790, 2011.

- ATCC. Cell lines and hybridomas. Disponível em <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CL-188&Template=cellBiology>. Acesso em março de 2012.
- BABINCOVÁ, M.; ALTANEROVA, V.; ALTANER, C.; BERGEMANN, C.; BABINEC, P. In Vitro Analysis of Cisplatin Functionalized Magnetic Nanoparticles in Combined Cancer Chemotherapy and Electromagnetic Hyperthermia. *Ieee Transactions on Nanobioscience*. 7(1): 15-19, 2008.
- BAHADUR, D.; GIRI, J. Biomaterials and magnetism. *Sādhanā*. 28 (partes 3 e 4): 639-656, 2003.
- BAJENOVA, O. V.; ZIMMER, R.; STOLPER, E.; SALISBURY-ROWSWELL, J.; NANJI, A.; THOMAS, P. Heterogeneous RNA-binding protein M4 is a receptor for carcinoembryonic antigen in kupffer cells. *J Biol Chem* 276(33): 31067-31073, 2001.
- BALIVADA, S.; RACHAKATLA, R. S.; WANG, H.; SAMARAKOON, T. N.; DANI, R. K.; PYLE, M.; KROH, F. O.; WALKER, B.; LEAYM, X.; KOPER, O. B.; TAMURA, M.; CHIKAN, V.; BOSSMANN, S. H.; TROYER, D. L. A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. *BMC Cancer* 10: 119, 2010.
- BARNETT, G. C.; WEST, C. M. L.; DUNNING, A. M.; ELLIOTT, R. M.; COLES, C. E.; PHAROAH, P. D. P.; BURNET, N. G. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 9: 134-142, 2009.
- BARNETT, T.; GOEBEL, J.; NOTHDURFT, M. A.; ELTING, J. J. Carcinoembryonic Antigen Family: Characterization of cDNAs Coding for NCA and CEA and Suggestion of Nonrandom Sequence Variation in Their Conserved Loop-Domains. *Genomics* 3: 59-66, 1988.
- BASKAR, R.; R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K. W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci* 9: 193-199, 2012.
- BAUMGARTEN, S. C.; FRASOR, J. Minireview: Inflammation: An Instigator of More Aggressive Estrogen Receptor (ER) Positive Breast Cancers. *Mol Endocrinol* 26(3): 360-371, 2012.
- BAYÓN, L. G.; IZQUIERDO, M. A.; SIROVICH, I.; ROOIJEN, N. V.; BEELEN, R. H. J.; MEIJER, S. Role of Kupffer Cells in Arresting Circulating Tumor Cells and Controlling Metastatic Growth in the Liver. *Hepatology* 23(5): 1224-1231, 1996.
- BEAUCHEMIN, N.; BENCHIMOL, S.; COURNOYER, D.; FUKS, A.; STANNERS, C. P. Isolation and Characterization of Full-Length Functional cDNA Clones for Human Carcinoembryonic Antigen. *Mol Cell Biol* 7(9): 3221-3230, 1987.

- BEAUCHEMIN, N.; DRABER, P.; DVEKSLER, G.; GOLD, P.; GRAY-OWEN, S.; GRUNERT, F.; HAMMARSTRÖM, S.; HOLMES, K. V.; KARLSSON, A.; KUROKI, M.; LIN, S. H.; LUCKA, L.; NAJJAR, S. M.; NEUMAIER, M.; OBRINK, B.; SHIVELY, J. E.; SKUBITZ, K. M.; STANNERS, C. P.; THOMAS, P.; THOMPSON, J. A.; VIRJI, M.; VON KLEIST, S.; WAGENER, C.; WATT, S.; ZIMMERMANN, W. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* 252: 243-249, 1999.
- BEHR, T. M.; LIERSCH, T.; GREINER-BECHERT, L.; GRIESINGER, F.; BÉHÉ, M.; MARKUS, P. M.; GRATZ, S.; ANGERSTEIN, C.; BRITTINGER, G.; BECKER, H.; GOLDENBERG, D. M.; BECKER, W. Radioimmunotherapy of small-volume disease of metastatic colorectal cancer. *Cancer* 94(4): 1373-1381, 2002.
- BENCHIMOL, S.; FUKS, A.; JOTHY, S.; BEAUCHEMIN, N.; SHIROTA, K.; STANNERS, C. P. Carcinoembryonic Antigen, a Human Tumor Marker, Functions as an Intercellular Adhesion Molecule. *Cell* 57: 327-334, 1989.
- BERG, J. M.; HO, S.; HWANG, W.; ZEBDA, R.; CUMMINS, K.; SORIAGA, M. P.; TAYLOR, R.; GUO, B.; SAYES, C. M. Internalization of carbon black and maghemite iron oxide nanoparticle mixtures leads to oxidant production. *Chem Res Toxicol* 23(12):1874-1882, 2010.
- BERG, M.; SØREIDE, K. Genetic and Epigenetic Traits as Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 12: 9426-9439, 2011.
- BLANCO, E.; HSIAO, A.; RUIZ-ESPARZA, G. U.; LANDRY, M. G.; MERIC BERNSTAMB, F.; FERRARI, M. Molecular-targeted nanotherapies in cancer: Enabling treatment specificity. *Mol Oncol* 5: 492-503, 2011.
- BLASZCZYK, M.; VAN PAK, K.; HERLYN, M.; LINDGREN, J.; FESSANE, S.; STEPLEWSKI, Z.; KOPROWSKI, H. Characterization of Gastrointestinal Tumor-associated Carcinoembryonic Antigen-related Antigens Defined by Monoclonal Antibodies. *Cancer Res* 44: 245-253, 1984.
- BOUÉE, S.; GROSCLAUDE, P.; ALFONSI, A.; FLORENTIN, V.; CLAVEL-CHAPELON, F.; FAGNANI, F. Projection de l'incidence du cancer du sein en 2018 en France. *Bull Cancer* 97(3): 293-299, 2010.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Atlas de mortalidade por câncer. Disponível em <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em fevereiro de 2012a.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Acesso: fevereiro de 2012b.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Câncer no Brasil – registros de base populacional. Disponível em

- http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/docs/Comentarios/Parte464_registro_de_base_populacional_completo.pdf. Acesso em março de 2012c.
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. Tratamento do câncer. Quimioterapia – Perguntas e respostas. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>. Acesso em março de 2012d.
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. Como prevenir e detectar vários tipos de câncer. Disponível em http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=472. Acesso em abril de 2012e.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 631-651, 2002.
- BÜNGER, S.; HAUG, U.; KELLY, F. M.; KLEMP-GIESSING, K.; CARTWRIGHT, A.; POSORSKI, N.; DIBBELT, L.; FITZGERALD, S. P.; BRUNCH, H. P.; ROBLICK, U. J.; EGGELING, F.; BRENNERE, H.; HABERMANN, J. K. Toward standardized high-throughput serum diagnostics: multiplex-protein array identifies IL-8 and VEGF as serum markers for colon cancer. *J Biomol screening* 16(9): 1018-1026, 2011.
- BYSTRZEJEWSKI, M.; CUDZIŁO, S.; HUCZKO, A.; LANGE, H.; SOUCY, G.; COTA-SANCHEZ, G.; KASZUWARA, W. Carbon encapsulated magnetic nanoparticles for biomedical applications: Thermal stability studies. *Biomol Eng* 24: 555-558, 2007.
- CAMPBELL, R. B. Battling tumours with magnetic nanotherapeutics and hyperthermia: turning up the heat. *Nanomedicine* 2(5): 649-652, 2007.
- CANCER RESEARCH UK, Breast cancer-survival statistics. Disponível em <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/breast/survival/>. Acesso em abril de 2012.
- CAPUTO, S.; BENBOUDJEMA, L.; SINILNIKOVA, O.; ROULEAU, E.; BÉROUD, C.; LIDEREAU, R. Description and analysis of genetic variants in French hereditary breast and ovarian cancer families recorded in the UMD-BRCA1/BRCA2 databases. *Nucleic Acids Res* 40 (Database issue): D992-1002, 2012.
- CARAVAN, P.; ELLISON, J. J.; MCMURRY, T. J.; LAUFFER, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem Rev* 99: 2293-2352, 1999.
- CARNEIRO, M. L. B. Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos *in vitro* e *in vivo*. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em biologia molecular para a obtenção do grau de doutor, 2011.

- CARNEIRO, M. L. B.; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. C. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; LOURENÇO, L. H. M.; DA SILVA, I. C. R.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVAL, Z. G. M.; BÁO, S. N. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. *J Nanobiotechnology*. 9(1):11, 2011.
- CARRIQUIRY, L. A.; PIÑEYRO, A. Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 42(7): 929-929, 1999.
- CENTER, M. M.; JEMAL, A.; SMITH, R. A.; WARD, E. Worldwide variations in colorectal cancer. *J Clin* 59: 366-378, 2009.
- CHAN, C. C.; FAN, C. F.; KUO, Y. B.; CHEN, Y. H.; CHENG, P. Y.; CHEN, K. T.; HUNG, R. P. CHAN, E. C. Multiple serological biomarkers for colorectal cancer detection. *Int J Cancer* 126: 1683-1690, 2010.
- CHEN, D. J.; TAN, Z.; CHEN, F.; DU, T. Construction of humanized carcinoembryonic antigen specific single chain variable fragment and mitomycin conjugate. *World J Gastroenterol* 13(43): 5765-5770, 2007.
- CHEN, H. Y.; YU, S. L.; LI, K. C.; YANG, P. C. Biomarkers and transcriptome profiling of lung cancer. *Respirology* 17(4): 620-626, 2012.
- CHEN, W.; YI, P.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; DENG, Z.; ZHANG, Z. Composites of Aminodextran-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles and Graphene Oxide for Cellular Magnetic Resonance Imaging. *ACS Appl Mater Interfaces* 3(10): 4085-4091, 2011.
- CHENG, L.; YANG, K.; LI, Y.; ZENG, X.; SHAO, M.; LEE, S.T.; LIU, Z. Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy. *Biomaterials* 33: 2215-2222, 2012.
- CHITHRANI, B. D.; CHAN, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett*. 7(6): 1542-1550, 2007.
- CHO, Y. S.; YOON, T. J.; JANG, E. S.; HONG, K. S.; LEE, S. Y.; KIM, O. R.; PARK, C.; KIM, Y. J.; YI, G. C.; CHANG, K. Cetuximab-conjugated magneto-fluorescent silica nanoparticles for in vivo colon cancer targeting and imaging. *Cancer Lett* 299: 63-71, 2010.
- CHU, X. Y.; ZHU, Z. M.; CHEN, L. B.; WANG, J. H.; SU, Q. S.; YANG, J. R.; LIN, Y.; XUE, L. J.; LIU, X. B.; MO, X. B. FOXM1 expression correlates with tumor invasion and a poor prognosis of colorectal cancer. *Acta Histochem* 2012. *In press*.
- CIRSTOIU-HAPCA, A.; BUCHEGGER, F.; LANGE, N.; BOSSY, L.; GURNY, R.; DELIE, F. Benefit of anti-HER2-coated paclitaxel-loaded immuno-nanoparticles

- in the treatment of disseminated ovarian cancer: Therapeutic efficacy and biodistribution in mice. *J Control Release* 144: 324-331, 2010.
- COLIGAN, J. E.; SLAYTER, H. S. PHYSICAL, Chemical and immunological characterization of saline-extracted, concanavalin a-purified carcinoembryonic antigens. *Mol Immunol* 16: 129-135, 1979.
- CONAGHAN, P. J.; ASHRAF, S. Q.; TYTHERLEIGH, M. G.; WILDING, J. L.; TCHILIAN, E.; BICKNELL, D.; MORTENSEN, J. M.; BODMER, W. F. Targeted killing of colorectal cancer cell lines by a humanized IgG1 monoclonal antibody that binds to membrane-bound carcinoembryonic antigen. *Br J Cancer* 98(7): 1217-1225, 2008.
- CONWAY, J. Lung imaging — Two dimensional gamma scintigraphy, SPECT, CT and PET. *Adv Drug DelivRev* 64(4): 357-368, 2012.
- DELANEY, G.; JACOB, S.; FEATHERSTONE, C.; BARTON, M. The Role of Radiotherapy in Cancer Treatment Estimating Optimal Utilization from a Review of Evidence-Based Clinical Guidelines. *Cancer* 104(6): 1129-1137, 2005.
- DE MATTOS-ARRUDA, L.; DIENSTMANN, R.; TABERNERO, J. Development of Molecular Biomarkers in Individualized Treatment of Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 10(4): 279-289, 2011.
- DENARDO, S. J.; DENARDO, G. L ; MIERS, L. A.; NATARAJAN, A.; FOREMAN, A. R.; GRUETTNER, C.; ADAMSON, G. .; IVKOV, R. Development of Tumor Targeting Bioprobes (¹¹¹In-Chimeric L6 Monoclonal Antibody Nanoparticles) for Alternating Magnetic Field Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 11(19 suppl.): 7087s-7092s, 2005.
- DENK, H.; TAPPEINER, G.; ECKERSTORFER, R.; HOLZNER, J. H. carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and extragastrointestinal tumors and its relationship to tumor-cell differentiation. *Int J Cancer* 10(2): 262-272, 1972.
- DING, K.; SUNAMURA, M.; KODAMA, T.; YAMAUCHI, J.; DUDA, D G.; SHINAMURA, H.; SHIBUYA, K.; TAKEDA, K.; MATSUNO, S. In vivo evaluation of the early events associated with liver metastasis of circulating cancer cells. *Br J Cancer* 85(3): 431-438, 2001.
- DRISKELL, J. D.; JONES, C. A.; TOMPKINS, S. M.; TRIPP, R. A. One-step assay for detecting influenza virus using dynamic light scattering and gold nanoparticles. *Analyst* 136(15): 3083-3090, 2011.
- DI GIOIA, D.; HEINEMANN, V.; NAGEL, D.; UNTCH, M.; KAHLERT, S.; BAUERFEIND, I.; KOEHNKE, T.; STIEBER, P. Kinetics of CEA and CA15-3 correlate with treatment response in patients undergoing chemotherapy for metastatic breast cancer (MBC). *Tumor Biol* 32: 777-785, 2011.

- ELDH, T.; HEINZELMANN, F.; VELALAKAN, A.; BUDACH, W.; BELKA, C.; JENDROSSEK, V. Radiation-induced changes in breathing frequency and lung histology of C57BL/6J mice are time- and dose-dependent. *Strahlenther Onkol* 2012. *In press*.
- ENGLE, J. W.; HONG, H.; ZHANG, Y.; VALDOVINOS, H. F.; MYKLEJORD, D. V.; BARNHART, T. E.; THEUER, C. P.; NICKLES, R. J.; CAI, W. Positron Emission Tomography Imaging of Tumor Angiogenesis with a ⁶⁶Ga-Labeled Monoclonal Antibody. *Mol Pharm* 2012. *In press*.
- ESTEVANATO, L. L. C.; LACAVALHO, L. M.; CARVALHO, L. C. F.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BÁO, S. N.; MORAIS, P. C.; LACAVALHO, Z. G. M. Long-Term Biodistribution and Biocompatibility Investigation of Dextran-Coated Magnetite Nanoparticle Using Mice as the Animal Model. *J Biomed Nanotechnol* 8: 1-8, 2011.
- FAHLGREN, A.; BARANOV, V.; FRANGSMYR, L.; ZOUBIR, M.; HAMMARSTRO, L.; HAMMARSTRO, S. Interferon-gamma Tempers the Expression of Carcinoembryonic Antigen Family Molecules in Human Colon Cells: a Possible Role in Innate Mucosal Defence. *Scandinavian J Immunol* 58: 628-641, 2003.
- FAINTUCH, B. L.; NUÑEZ, G. E. F.; TEODORO, R.; MORO, A. M.; MENGATTI, J. Radiolabeled nano-peptides show specificity for an animal model of human PC3 prostate cancer cells. *Clinics* 66(2): 327-336, 2011.
- FANG, C.; SHI, B.; PEI, Y. Y.; HONG, M. H.; WU, J.; CHEN, H. Z. In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: Effect of MePEG molecular weight and particle size. *Eur J Pharm Sci* 27: 27-36, 2006.
- FAROKHZAD, O. C.; CHENG, J.; TEPLY, B. A.; SHERIFI, I.; JON, S.; KANTOFF, P. W.; RICHIE, J. P.; LANGER, R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *PNAS* 103(16): 6315-6320, 2006.
- FOLGUEIRA, M. A. A. K.; BRENTANI, M. M. Câncer de mama. In *Oncologia Molecular*. Ferreira, C. G.; ROCHA, J. C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 135-144, 2004.
- FOROUZANFAR, M. H.; FOREMAN, K. J.; DELOSSANTOS, A. M.; LOZANO, R.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; NAGHAVI, M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 378: 1461-1484, 2011.
- FORTINA, P.; KRICKA, L. J.; GRAVES, D. J.; PARK, J.; HYSLOP, T.; TAM, F.; HALAS, N.; SURREY, S.; WALDMAN, S. A. Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer. *TRENDS Biotechnol* 25(4): 145-152, 2007.

- FOY, S. P.; LABHASETWAR, V. On the irony: Iron as a cancer cause or cure? *Biomaterials* 32(35): 9155-9158, 2011.
- FRANCKENA, M.; STALPERS, L. J. A.; KOPER, P. C. M.; WIGGENRAAD, R. G. J.; HOOGENRAAD, W. J.; DUK, J. D. P.; WÁRLÁN-RODENHUIS, C. C.; JOBSEN, J. J.; RHOON, G. C.; ZEE, J. Long-term improvement in treatment outcome after radiotherapy and hyperthermia in locoregionally advanced cervix cancer: an update of the dutch deep hyperthermia trial. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 70(4): 1176-1182, 2007.
- FRANGIONI, J. V. *New Technologies for Human Cancer Imaging*. *J Clin Oncol* 26(24): 4012-4021, 2008.
- GABANO, E.; COLANGELO, D.; GHEZZI, A. R.; OSELLA, D. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *J Inorganic Biochem* 102(4): 629-635, 2007.
- GADZICKI, D.; EVANS, D. G.; HARRIS, H.; JULIEN-REYNIER, C.; NIPPERT, I.; SCHIMIDTKE, J.; TIBBEN, A.; ASPEREN, C.; SCHLEGELBERGER, B. Genetic testing for familial/hereditary breast cancer—comparison of guidelines and recommendations from the UK, France, the Netherlands and Germany. *J Community Genet* 2: 53-69, 2011.
- GALANZHA, E.I.; SHASHKOV, K. T.; KIM, J. W.; YANG, L.; ZHAROV, V. P. In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. *Nat Nanotechnol* 4(12):855-60, 2009.
- GANGOPADHYAY, A.; BAJENOVA, O.; KELLY, T. M.; THOMAS, P. Carcinoembryonic Antigen Induces Cytokine Expression in Kupifer Cells: Implications for Hepatic Metastasis from Colorectal Cancer. *Cancer Res* 56: 4805-4810, 1996.
- GANGOPADHYAY, A.; LAZURE, D. A.; THOMAS, P. Carcinoembryonic antigen induces signal transduction in Kupffer cells. *Cancer Lett* 118: 1-6, 1997.
- GANGOPADHYAY, A.; LAZURE, D. A.; THOMAS, P. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. *Clin Exp Metastasis* 16: 703-712, 1998.
- GERVASONI, A.; MUÑOZ, R. M. M.; WENGLER, G. S.; RIZZI, A.; ZANIBONI, A.; PAROLINI, O. Molecular signature detection of circulating tumor cells using a panel of selected genes. *Cancer Let* 263(2): 267-279, 2008.
- GIRARD, O. M.; DU, J.; AGEMY, L.; SUGAHARA, K. N.; KOTAMRAJU, V. R.; RUOSLAHTI, E.; BYDDER, G. M.; MATTREY, R. F. Optimization of iron oxide nanoparticle detection using ultrashort echo time pulse sequences: comparison of T1, T2*, and synergistic T1- T2* contrast mechanisms *Magn Reson Med* 65(6):1649-60, 2011.

- GOLD P.; FREEDMAN S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 122: 467-481, 1965.
- GOLD *et al.*, 1970 *apud* KRUPEY, J.; WILSON, T.; FREEDMAN, S. O.; GOLD, P. The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochem* 9: 617-622, 1972.
- GONZALEZ, S. A.; KEEFFE, E. B. Risk assessment for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: scores and surveillance *Int J Clin Pract.* 66(1): 7-10, 2012.
- GORI, J.; CASTAÑO, R.; TOZIANO, M.; HABICH, D.; STARINGER, J.; QUIRÓS, D. G. B.; FELCI, N. Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy in ovarian câncer. *Int J Gynecol Cancer* 15: 233-239, 2005.
- GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26: 3995-4021, 2005.
- GYLLENSTEN, U.; GUSTAVSSON, I.; LINDELL, M.; WILANDER, E. Primary high-risk HPV screening for cervical cancer in post-menopausal women. *Gynecol Oncol* 152(2): 343-345, 2012.
- HAPCA-CIRSTOIU, A.; BUCHEGGER, F.; BOSSY, L.; KOSINSKI, M.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanomedicines for active targeting: Physico-chemical characterization of paclitaxel-loaded anti-HER2 immunonanoparticles and *in vitro* functional studies on target cells. *Europ J Pharm Sci* 38: 230-237, 2009.
- HARDEN, R. M.; ALEXANDER, W. D.; SHIMMINS, J.; CHISHOLM, D. A comparison between the gastric and salivary concentration of iodide, pertechnetate, and bromide in man. *Gut* 10: 928-930, 1969.
- HARRIS, L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R.; NORTON, L.; RAVDIN, P.; TAUBE, S.; SOMERFIELD, M. R.; HAYES, D. F.; BAST, R. C. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncology* 25(33): 5287-5312, 2007.
- HILL, R.; DAUNTER, B.; KHOO, S. K.; MACKAY, E. V. Nature of Carcinoembryonic Antigen Purified From Malignant Ascitic Fluid of Serous Cystadenocarcinoma of The Ovary. *Molecular Immunology* 18(1): 647-653, 1981.
- HOFF, P. M.; KATZ, A.; ZOGBI, Y. A. N. Drogas com alvo molecular específico. In *Oncologia Molecular*. Ferreira, C. G.; ROCHA, J. C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 407-414, 2004.
- HUH, J. W.; KIM, C. H.; KIM, H. R.; KIM, Y. J. Factors Predicting Oncologic Outcomes in Patients With Fewer Than 12 Lymph Nodes Retrieved After Curative Resection for Colon Cancer. *J Surg Oncol* 105: 125-129, 2012.

- HWANG, W. Y. K.; FOOTE, J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 36: 3-10, 2005.
- ISAACS, I. D.; CLARK, M. R.; GREENWOOD, S. E.; WALDMANN, H. Therapy with monoclonal antibodies – Asan in vivo model for the assessment of therapeutic potential. *J Immunol* 148: 3062-3071, 1992.
- ISLAM, T.; MATSUO, K.; HOSONO, S.; WATANABE, M.; IWATA, H.; TAJIMA, K.; TANAKA, H. Reproductive and hormonal risk factors for luminal, HER2-overexpressing, and triple-negative breast cancer in Japanese women. *Ann Oncol* 2012. *In press*.
- JAIN, K. K. Advances in the field of nanooncology. *BMC Med* 8: 83, 2012.
- JAIN, T. K.; REDDY, M. K.; MORALES, M. A.; LESLIE-PELECKY, D. L.; LABHASETWAR, V. Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. *Mol Pharm*. 5(2): 316-327, 2008.
- JANS, H.; LIU, X.; AUSTIN, L.; MAES, G.; HUO, Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Anal Chem* 81(22): 9425-9432, 2009.
- JASPERSON, K. W.; TUOHY, T. M.; NEKLASON, D. W.; BURT, R. W. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterol* 138: 2044-2058, 2010.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90, 2011.
- JESSUP, J. M.; PETRICK, A. T.; TOTH, C. A.; FORD, R.; METERISSIAN, S.; O'HARA, C. J.; STEELE JR, G.; THOMAS, P. Carcinoembryonic antigen: enhancement of liver colonisation through retention of human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* 67: 464-47, 1993.
- JESSUP, J. M.; SAMARA, R.; BATTLE, P.; LAGUINGE, L. M. Carcinoembryonic antigen promotes tumor cell survival in liver through an IL-10-dependent pathway. *Clin Exp Metastasis* 21: 709-717, 2004.
- JJ, Z.; LIN, G.; LU, Q.; MENG, L.; SHEN, X.; DONG, L.; FU, C.; ZHANG, X. Targeted therapy of SMMC-7721 liver cancer in vitro and in vivo with carbon nanotubes based drug delivery system. *J Colloid and Interface Sci* 365: 143-149, 2012.
- JOHANNSEN, M.; GNEVECKOW, U.; THIESEN, B.; TAYMOORIAN, K.; CHO, C.H.; WALDÖFNER, N.; SCHOLZ, R.; JORDAN, A.; LOENING, S. A.; WUST, P. Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. *Eur Urol* 52(6):1653-61, 2007.
- JOSHI, P. A.; JACKSON, H. W.; BERISTAIN, A. G.; DI GRAPPA, M. A.; MOTE, P. A.; CLARKE, C. L.; STINGL, J.; WATERHOUSE, P. D.; KHOKHA, R.

- Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nat* 465(7299): 803-807, 2010.
- JUNG, H. S.; LEE, S. W. Ribozyme-mediated selective killing of cancer cells expressing carcinoembryonic antigen RNA by targeted *trans*-splicing. *Biochem Biophys Res Comm* 349: 556-563, 2006.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.
- KASHOFER, K.; TSCHERNATSCH, M. M.; MISCHINGER, H. J.; IBERER, F.; ZATLOUKAL, K. The disease relevance of human hepatocellular xenograft models: Molecular characterization and review of the literature. *Cancer Lett* 286: 121-128, 2009.
- KELLAND, L. R.; “Of mice and men”: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40: 827-836, 2004.
- KENDALL, C.; DAY, J.; HUTCHINGS, J.; SMITH, B. SHEPHERD, N.; BARR, H.; STONE, N. Evaluation of Raman probe for oesophageal cancer diagnostics. *Analyst* 135: 3038-3041, 2010.
- KHATIB, A. M.; AUGUSTE, P.; FALLAVOLLTA, L.; WANG, N.; SAMANI, A.; KONTOGIANNEA, M.; METERISSIAN, S.; BRODT, P. Characterization of the Host Proinflammatory Response to Tumor Cells during the Initial Stages of Liver Metastasis. *Am J Pathol* 167(3):749-759, 2005.
- KHOO, S. K.; MACKAY, I. R. Carcinoembryonic antigen in serum in diseases of the liver and pancreas. *J Clin Path* 26: 470-475, 1973.
- KIM, D. H.; OH, S. J.; OH, C. A.; CHOI, M. G.; NOH, J. H.; SOHN, T. S.; BAE, J.M.; KIM, S. The Relationships Between Perioperative CEA, CA 19-9, and CA 72-4 and Recurrence in Gastric Cancer Patients After Curative Radical Gastrectomy. *J Surg Oncol* 104:585-591, 2011.
- KIM BH, LEE N, KIM H, AN K, PARK YI, CHOI Y, SHIN K, LEE Y, KWON SG, NA HB, PARK JG, AHN TY, KIM YW, MOON WK, CHOI SH, HYEON T. Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T1 magnetic resonance imaging contrast agents. *J Am Chem Soc* 133(32): 12624-12631, 2011.
- KIM, H. W.; AHN, B. C.; LEE, S. W.; LEE, J. Effect of Parotid Gland Massage on Parotid Gland Tc-99m Pertechnetate Uptake. *Thyroid* 2012. *In press*.
- KIM, S. J.; PARK, Y.; HONG, H. J. Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. *Mol Cells* 20(1): 17-29, 2005.
- KOKKONEN, N.; ULIBARRI, I. F.; KAUPPILA, A.; LUOSUJARVI, H.; RIVINOJA, A.; POSPIECH, H.; KELLOKUMPU, I.; KELLOKUMPU, S. Hypoxia

- upregulates carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. *Int J Cancer* 121: 2443-2450, 2007.
- KOU, G.; WANG, S.; CHENG, C.; GAO, J.; LI, B.; WANG, H.; QIAN, W.; HOU, S.; ZHANG, D.; DAI, J.; GU, H.; GUO, Y. Development of SM5-1-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for hepatoma detection. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 192-197, 2008.
- KRYZA, D.; TALEB, J.; JANIER, M.; MARMUSE, L.; MILADI, I.; BONAZZA, P.; LOUIS, C.; PERRIAT, P.; ROUX, S.; TILLEMENT, O.; BILLOTEY, C. Biodistribution Study of Nanometric Hybrid Gadolinium Oxide Particles as a Multimodal SPECT/MR/Optical Imaging and Theragnostic Agent. *Bioconjugate Chem* 22: 1145-1152, 2011.
- KRUPEY, J.; WILSON, T.; FREEDMAN, S. O.; GOLD, P. The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochemistry* 9: 617-622, 1972.
- KRUSKAL, J. B.; THOMAS, P.; KANE, R. A.; GOLDBERG, S. N. Hepatic Perfusion Changes in Mice Livers with Developing Colorectal Cancer Metastases. *Radiology* 231(2): 482-490, 2004.
- KUMAR, P.; SINGH, B.; SHARMA, S.; GHAI, A.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A. K.; DHAWAN, D.; MITTAL, B. R. Preclinical Evaluation of [99m]Tc-Labeled Doxorubicin as a Potential Scintigraphic Probe for Tumor Imaging. *Cancer Biother Radiopharm* 27(3): 221-225, 2012.
- KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHERR, T.; KRUG, H.; SCHEYNIUS, A.; FADEEL, B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta* 1810: 361-373, 2011.
- LAGUINGE, L.; BAJENOVA, O.; BOWDEN, E.; SAYYAH, J.; THOMAS, P.; JUHL, H. Surface Expression and CEA Binding of hnRNP M4 Protein in HT29 Colon Cancer Cells. *Anticancer Res* 25: 23-32, 2005.
- LAI, J. N.; WU, C. T.; CHEN, P. C.; HUANG, C. S.; CHOW, S. N.; WANG, J. D. Increased Risk for Invasive Breast Cancer Associated with Hormonal Therapy: A Nation-Wide Random Sample of 65,723 Women Followed from 1997 to 2008. *Plos one* 6(10): e25183, 2011.
- LAMMERS, T.; KIESSLING, F.; HENNINK, W. E.; STORM, G. Nanotheranostics and Image-Guided Drug Delivery: Current Concepts and Future Directions. *Molec Pharm* 7(6): 1899-1912, 2010.
- LECOUVET, F. E.; MOUEDDEN, J. E.; COLLETTE, L.; COCHE, E.; DANSE, E.; JAMAR, F.; MACHIELS, J. P.; BERG, B. V.; OMOUNMI, P.; TOMBAL, B. Can Whole-body Magnetic Resonance Imaging with Diffusion-weighted Imaging Replace Tc 99m Bone Scanning and Computed Tomography for

- Single-step Detection of Metastases in Patients with High-risk Prostate Cancer? Eur Urol 2012. *In press*.
- LEE, D.S.; KIM, Y. S.; JUNG, S. L.; LEE, K. Y.; KANG, J. H.; PARK, S.; KIM, Y. K.; YOO, I. R.; CHOI, B. O.; JANG, H. S.; YOON, S. C. The relevance of serum carcinoembryonic antigen as an indicator of brain metastasis detection in advanced non-small cell lung cancer. Tumour Biol 2012. *In press*.
- LEE, H. S.; HERCEG, Z. The epigenome and cancer prevention: A complex story of dietary supplementation. Cancer Lett 2012. *In press*.
- LEE, Y. C.; CHEN, Y. J.; WU, C. C.; LO, S.; HOU, M. F.; YUAN, S. S. F. Resistin expression in breast cancer tissue as a marker of prognosis and hormone 2 therapy stratification. Gynecol Oncol 2012. *In press*.
- LEUSCH, H. G.; DRZENIEK, Z.; HEFTA, S. A.; MARKOS-PUSZTAI, Z.; WAGENER, C. The putative role of members of the CEA-gene family (CEA, NCA and BGP) as ligands for the bacterial colonization of different human epithelial tissues. Zentralbl Bakteriol 275(1): 118-122, 1991.
- LEUSCH, H. G.; HEFTA, S. A.; DRZENIEK, Z.; HUMMEL, K.; MARKOS-PUSZTAI, Z.; WAGENER, C. Escherichia coli of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA). FEBS 261(2): 405-409, 1990.
- LIANG, H.; ZHAN, H. J.; WANG, B. G.; PAN, Y. ; HAO, X. S. Change in expression of apoptosis genes after hyperthermia, chemotherapy and radiotherapy in human colon cancer transplanted into nude mice. World J Gastroenterol 13(32): 4365-4371, 2007.
- LI, M.; KIM, H.S.; TIAN, L.; YU, M.K.; JON, S.; MOON, W.K. Comparison of Two Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides on Cytotoxicity and MR Imaging of Tumors. Theranostics 2(1):76-85, 2012.
- LIM, S.W.; KIM, H.W.; JUN, H.Y.; PARK, S.H.; YOON, K.H.; KIM, H.S.; JON, S.; YU, M.K.; JUHNG, S.K. TCL-SPION-enhanced MRI for the Detection of Lymph Node Metastasis in Murine Experimental Model. Acad Radiol 18: 504-511, 2011a.
- LIM, E.K.; KIM, H.O.; JANG, E.; PARK, J.; LEE, K.; SUH, J.S.; HUH, Y.M.; HAAM, S. Hyaluronan-modified magnetic nanoclusters for detection of CD44-overexpressing breast cancer by MR imaging. Biomaterials 32: 7941-7950, 2011b.
- LIN, J. K.; LIN, C. C.; YANG, S. H.; WANG, H. S.; JIANG, J. K.; LAN, Y. T.; LIN, T. C.; LI, A. F. Y.; CHEN, W. S.; CHANG, S. C. Early postoperative CEA level is a better prognostic indicator than is preoperative CEA level in predicting prognosis of patients with curable colorectal cancer. Int J Colorectal Dis 26: 1135-1141, 2011.

- LING, Y.; WEI, K.; LUO, Y.; GAO, X.; ZHONG, S. Dual docetaxel/superparamagnetic iron oxide loaded nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials* 32(29): 7139-7150, 2011.
- LIU, Z.; BROOKS, R. S.; CIAPPIO, E. D.; KIM, S. J.; CROTT, J. W.; BENNETT, G.; GREENBERG, A. S.; MASON, J. B. Diet-induced obesity elevates colonic TNF- α in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *J Nutr Biochem* 2012. *In press*.
- LIU, Z.; LAMMERS, T.; EHLING, J.; FOKONG, S.; BORNEMANN, J.; KIESSLING, F.; GÄTJENS, J. Iron oxide nanoparticle-containing microbubble composites as contrast agents for MR and ultrasound dual-modality imaging. *Biomaterials* 32: 6155-6163, 2011.
- LOCKER, G. Y.; HAMILTON, S.; HARRIS, J.; JESSUP, J. M.; KEMENY, N.; MACDONALD, J. S.; SOMETFIELD, M. R.; HAYES, D. F.; BAST, R. C. ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *J Clin Oncol* 24(33): 5313-5327, 2006.
- LÓPEZ-DÁVILA, V.; SEIFALIAN, A. M.; LOIZIDOU, M. Organic nanocarriers for cancer drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 12: 1-6, 2012.
- LORENZ *et al.*, 2000 *apud* MAZZOLINI, G.; MURILLO, O.; ATORRASAGASTI, C.; DUBROT, J.; TIRAPU, I.; RIZZO, M.; ARINA, A.; ALFARO, C.; AZPILICUETA, A.; BERASAIN, C.; PEREZ-GARCIA, J. L.; GONZALES, A.; MELERO, I. Immunotherapy and immunoescape in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 13(44): 5822-5831, 2007.
- LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew Chem Int Ed* 46: 1222-244, 2007.
- LUNOV, O.; SYROVETS, T.; RÖCKER, C.; TRON, K.; NIENHAUS, G. U.; RASCHE, V.; MAILÄNDER, V.; LANDFESTER, K.; SIMMET, T. Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes. *Biomaterials* 31: 9015-9022, 2010.
- LUNT, S. J.; KALLIOMAKI, T. M. K.; BROWN, A.; YANG, V. X.; MILOSEVIC, M.; HILL, R. P. Interstitial fluid pressure, vascularity and metastasis in ectopic, orthotopic and spontaneous tumours. *BMC Cancer* 8: 2, 2008.
- MA, H.; HENDERSON, K. D.; SULLIVAN-HALLEY, J.; DUAN, L.; MARSHALL, S. F.; URSIN, G.; HORN-ROSS, P. L.; LARGENT, J.; DEAPEN, D. M.; LACEY, J. V.; BERNSTEIN, L. Pregnancy-related factors and the risk of breast carcinoma in situ and invasive breast cancer among postmenopausal women in the California Teachers Study cohort. *Breast Cancer Res* 12: R35, 2010.

- MADRU, R.; KJELLMAN, P.; OLSSON, F.; WINGÅRDH, K.; INGVAR, C.; STÅHLBERG, F.; OLSRUD, J.; LÄTT, J.; FREDRIKSSON, S.; KNUTSSON, L.; STRAND, S. E. 99mTc-Labeled Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodality SPECT/MRI of Sentinel Lymph Nodes. *J Nucl Med* 53(3): 459-63, 2012.
- MAEDA, H.; FANG, J.; INUTSUKA, T.; KITAMOTO, Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *International Immunopharmacol* 3: 319-328, 2003.
- MARKMAN, M. Intraperitoneal antineoplastic drug delivery: rationale and results. *Lancet Oncol* 4: 277-283, 2003.
- MARTIN, E. W. Jr.; KIBBEY, W. E.; DIVECCHIA, L.; ANDERSON, G.; CATALANO, P.; MINTON, J. P. Carcinoembryonic antigen: clinical and historical aspects. *Cancer* 37(1): 62-81, 1976.
- MASSOUD, T. F.; GAMBHIR, S. S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 17: 545-580, 2003.
- MATSUMINE, A.; KUSUZAKI, K.; MATSUBARA, T.; SHINTANI, K.; SATONAKA, H.; WAKABAYASHI, T.; MIYAZAKI, S. MORITA, K.; TAKEGAMI, K.; UCHIDA, A. Novel hyperthermia for metastatic bone tumors with magnetic materials by generating an alternating electromagnetic field. *Clin Exp Metastasis* 24: 191-200, 2007.
- MATSUO, K.; MIZOUE, T.; TANAKA, K.; TSUJI, I.; SUGAWARA, Y.; SASAZUKI, S.; NAGATA, C.; TAMAKOSHI, A.; WAKAI, K.; INOUE, M.; TSUGANE, S. Association between body mass index and the colorectal cancer risk in Japan: pooled analysis of population based cohort studies in Japan. *Ann Oncol* 23: 479-490, 2012.
- MEENACH, S. A.; OUT, C. G.; ANDERSON, K. W.; HILT, J. Z. Controlled synergistic delivery of paclitaxel and heat from poly(β -amino ester)/iron oxide-based hydrogel nanocomposites. *Int J Pharmac* 427: 177-184, 2012.
- MERVIEL, P.; JOUVANCE, O.; NAEPELS, P.; FAUVET, R.; CABRY-GOUBET, R.; GAGNEUR, O.; GONDRY, J. Existe-t-il encore des facteurs de risque de survenue d'un cancer du sein? *Gynecol Obstet Fertil* 39: 486-490, 2011.
- MIGLIORI, L.; MIGHELI, F.; SPISNI, R.; COPPEDÈ, F. Genetics, Cytogenetics, and Epigenetics of Colorectal Cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011, Article ID 792362, 2011.
- MISRI, R.; MEIER, D.; YUNG, A. C.; KOZLOWSKI, P.; HÄFELI, U. O. Development and evaluation of a dual-modality (MRI/SPECT) molecular imaging bioprobe *Nanomedicine* 2011. *In press*.
- MONGE-FUENTES, V.; GARCIA, M. P.; TAVARES, M. C. H.; VALOIS, C. R. A.; LIMA, E. C. D.; TEIXEIRA, D. S.; MORAIS, P. C.; TOMAZ, C.; AZEVEDO,

- R. B. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus* spp.). *Nanomedicine* 6(9): 1529-1544, 2011.
- MOOK, O. R. F.; MARLE, J. V.; VREELING-SINDELÁROVÁ, H.; JONGES, R.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. F. Visualization of Early Events in Tumor Formation of eGFP-Transfected Rat Colon Cancer Cells in Liver. *Hepatology* 38(2): 295-304, 2003.
- MÜLLER, K.; SKEPPER, J. N.; POSFAI, M.; TRIVEDI, R.; HOWARTH, S.; COROT, C.; LANCELOT, E.; THOMPSON, P. W.; BROWN, A. P.; GILARD, J. H. Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. *Biomaterials* 28(9): 1629-1642, 2007.
- NAITO, Y.; OKABE, Y.; NAGAYAMA, M.; NISHINAKAGAWA, T.; TAIRA, T.; KAWARA, A.; HATTORI, S.; MACHIDA, K.; ISHIDA, Y.; KAJI, R.; MIKAGI, K.; KINOSHITA, H.; YASUMOTO, M.; AKIBA, J.; KAGE, M.; NAKASHIMA, M.; OHSHIMA, K.; YANO, H. Accuracy of differential diagnosis for pancreatic cancer is improved in the combination of RCAS1 and CEA measurements and cytology in pancreatic juice. *Med Mol Morphol* 44: 86-92, 2011.
- NANJO, S.; ASADA, K.; YAMASHITA, S.; NAKAJIMA, T.; NAKAZAWA, K.; MAEKITA, T.; ICHINOSE, M.; SUGIYAMA, T.; USHIJIMA, T. Identification of gastric cancer risk markers that are informative in individuals with past *H. pylori* infection. *Gastric Cancer* 2012. *In press*.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Dictionary of Cancer Terms. Disponível em <http://www.cancer.gov/dictionary?CdrID=45618>. Acesso em março de 2012.
- NAYAK, T. K.; GARMESTANI, K.; MILENIC, D. E.; BRECHBIEL, M. W. PET and MRI of Metastatic Peritoneal and Pulmonary Colorectal Cancer in Mice with Human Epidermal Growth Factor Receptor 1-Targeted ⁸⁹Zr-Labeled Panitumumab. *J Nucl Med* 53: 113-120, 2012.
- NG, S. L.; BURNS, W. I.; SNYDER, R. D.; NEWNHAM, G. M.; MCLACHLAN, S. A.; LIEW, D.; DOWLING, A. J. A retrospective cohort study of metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy, with an exploratory analysis of changing serum carcinoembryonic antigen levels. *Asia-Pac J Clin Oncol* 8: 172-179, 2012.
- NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng* 9: 257-288, 2007.
- NONAKA, M.; KATAOKA, D.; YAMAMOTO, S.; BITO, A.; MATSUOKA, J.; KAWADA, T.; TAKABA, T. Pre- and Post-operative Serum Carcinoembryonic Antigen in Primary Lung Adenocarcinoma. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 10(5): 281-284, 2004.

- OGURA, E.; SENZAKI, H.; YOSHIZAWA, K.; HIOKI, K.; TSUBURA, A. Immunohistochemical localization of epithelial glycoprotein EGP-2 and carcinoembryonic antigen in normal colonic mucosa and colorectal tumors. *Anticancer Res* 18(5B): 3669-3675, 1998.
- ORDOÑEZ, C.; SCREATON, R. A.; ILANTZIS, C.; STANNERS, C. P. Human Carcinoembryonic Antigen Functions as a General Inhibitor of Anoikis. *Cancer Res* 60: 3419-3424, 2000.
- PAN, T. L.; WANG, P. W.; HUANG, C. C.; YEH, C. T.; HU, T. H.; YU, J. S. Network analysis and proteomic identification of vimentin as a key regulator associated with invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cells. *J Proteomics* 2012. *In press*.
- PARKIN, D. M. Cancers attributable to consumption of alcohol in the UK in 2010. *Br J Cancer* 105 Suppl 2: 14-18, 2011.
- PARK, S. K.; KIM, Y.; KANG, D.; JUNG, E. J.; YOO, K. Y. Risk Factors and Control Strategies for the Rapidly Rising Rate of Breast Cancer in Korea. *J Breast Cancer* 14(2): 79-87, 2011.
- PARKER, F. S. Applications of infrared, raman, and resonance raman spectroscopy in biochemistry. 1st ed. New York: Springer; 1983.
- PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. O genoma humano e o câncer. In *Oncologia Molecular*. Ferreira, C. G.; ROCHA, J. C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 3-11, 2004.
- PASCHOS, K. A.; MAJEED, A. W.; BIRD, N. C. Role of Kupffer cells in the outgrowth of colorectal cancer liver metastases. *Hepatol Res* 40: 83-94, 2010.
- PASQUETTO, M. V.; VECCHIA, L.; COVINI, D.; DIGILIO, R.; SCOTTI, C. Targeted Drug Delivery Using Immunoconjugates: Principles and Applications. *J Immunother* 34(9): 611-628, 2011.
- PAVLOVIC, M.; SEPAROVIC, R.; VUKELIC-MARKOVIC, M.; PATRLJ, L.; KOLOVRAT, M.; KOPLJAR, M.; BABIC, N.; KOSUTA, D.; BABIC, Z. Isolated splenic metastasis from colorectal carcinoma in a high risk patient: a case report. *Coll Antropol* 35(4): 1307-1310, 2011.
- PAXTON, R. J.; MOOSER, G.; PANDE, H.; LEE, T. D.; SHIVELY, J. Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: Identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. *PNAS USA* 84: 920-924, 1987.
- PERICLEOUS, P.; GAZOULI, M.; LYBEROPOULOU, A.; RIZOS, S.; MIKITEAS, N.; EFSTATHOPOULOU, E. P. Quantum dots hold promise for early cancer imaging and detection. *Int J Cancer* 2012. *In press*.

- PETERSEN, A. L.; BINDERUP, T.; JOLCK, R. I.; RASMUSSEN, P.; HENRIKSEN, J. R.; PFEIFER, A. K.; KJAER, A.; ANDRESEN, T. L. Positron emission tomography evaluation of somatostatin receptor targeted ⁶⁴ Cu-TATE-liposomes in a human neuroendocrine carcinoma mouse model. *J Control Release* 2012. *In press*.
- PHIPPS, A. I.; MALONE, K. E.; PORTER, P. L.; DALING, J. R.; LI, C. I. Reproductive and hormonal risk factors for postmenopausal luminal, HER2-overexpressing, and triple-negative breast cancer. *Cancer* 113(7): 1521-1526, 2008.
- PHULPIN, B.; TRAN, N.; LEROUX, A.; POUSSIER, S.; MARIE, P. Y.; PINEL, S.; HUGER, S.; HENROT, P.; GALLET, P.; BLAISE, C.; BRAVETTI, P.; GRAFF, P.; MERLIN, J. L.; DOLIVET, G. Experimental Model of Naturally Occurring Post-radiation Sarcoma: Interest of Positron Emission Tomography (PET) for Early Detection. *J Radiat Res* 53: 101-109, 2012.
- POHLMANN, P. R.; SCHWARTSMANN, G. Novas Combinações Terapêuticas. In *Oncologia Molecular*. Ferreira, C. G.; ROCHA, J. C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 415-427, 2004.
- PORTILHO, F. A. O uso de nanoesferas de albumina na terapia fotodinâmica e na magnetohipertermia do tumor de ehrlich. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em patologia molecular para a obtenção do grau de doutor, 2011.
- PORTILHO FA, ESTEVANATO LLC, MIRANDA-VILELA AL, ET AL. Investigation of a magnetohyperthermia system efficacy. *J App Phys* 109(7): B307-B309, 2010.
- PROTANI, M.; PAGE, A.; TAYLOR, R.; GLZEBROOK, R.; LAHMANN, P. H.; BRANCH, E.; MULLER, J. Breast cancer risk factors in Queensland women attending population-based mammography screening. *Maturitas* 71: 279-286, 2012.
- PUHALLA, S.; BHATTACHARYA, S.; DAVIDSON, N. E. Hormonal therapy in breast cancer: A model disease for the personalization of cancer care. *Mol Oncol* 2012. *In press*.
- PURUSHOTHAM, A. D.; LEWISON, G.; SULLIVAN, R. The State of Research and Development in Global Cancer Surgery. *Ann Surg* 255(3): 427-432, 2012.
- PUSZTASZERI, G.; MACH, J. P. Carcinoembryonic antigen (CEA) in non digestive cancerous and normal tissues. *Immunochemistry* 10: 197-204, 1973.
- QUAN, G.; DU, X.; HUO, T.; LI, X.; WEI, Z.; CUI, H.; CHANG, X.; CHENG, Y.; YE, X.; CHENG, H. Targeted Molecular Imaging of Antigen OC183B2 in Ovarian Cancers Using MR Molecular Probes. *Acad Radiol* 17:1468-1476, 2010.
- RANGANATHAN, R.; MADANMOHAN, S.; KESAVAN, A.; BASKAR, G.; KRISHNAMOO, Y. R.; SANTOSHAM, R.; PONRAJU, D.; RAYALA, S. K.;

- VENKATRAMAM, G. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *Int J Nanomedicine*. 7: 1043-1060, 2012.
- REDDY, L. H.; MURTHY, R. S. R. Pharmacokinetics and biodistribution studies of doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques. *Biomed Papers* 148(2): 161-166, 2004.
- RIBEIRO, J. T.; MACEDO, L. T.; CURIGLIANO, G.; FUMAGALLI, L.; LOCATELLI, M.; DALTON, M.; QUINTELA, A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; MANUNTAS, S.; MAZZARELLA, L.; BROLLO, J.; GOLDBIRSCHE, A. Cytotoxic drugs for patients with breast cancer in the era of targeted treatment: back to the future? *Ann Oncol* 23: 547-555, 2012.
- RUTZKY, L. P.; KAYE, C. I.; SICILIANO, M. J.; CHAO, M.; KAHAN, B. D. Longitudinal Karyotype and Genetic Signature Analysis of Cultured Human Colon Adenocarcinoma Cell Lines LS180 and LS174T1. *Cancer Res* 40: 1443-1448, 1980.
- SADAUSKAS, E.; WALLIN, H.; STOLBERG, M.; VOGEL, U.; DOERING, P.; LARSEN, A.; DANSCHER, G. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol* 4: 10, 2007.
- SAKAMOTO, K.; HAGA, Y.; YOSHIMURA, R.; EGAMI, H.; YOKOYAMA, Y.; AKAGI, M. Comparative effectiveness of the tumour diagnostics, CA 19-9, CA 125 and carcinoembryonic antigen in patients with diseases of the digestive system. *Gut* 28, 323-329, 1987.
- SARRADIN, P. M.; LE BRIS, N.; LE GALL, C.; RODIER, P. Fe analysis by the ferrozine method: adaptation to FIA towards in situ analysis in hydrothermal environmental. *Talanta* 66(5): 1131-1138, 2005.
- SATISHKUMAR, R.; VERTEGEL, A. Antibody-directed targeting of lysostaphin adsorbed onto polylactide nanoparticles increases its antimicrobial activity against *S. aureus* in vitro. *Nanotechnology* 22: 505103, 2011.
- SCHOFFELEN, R.; SHARKEY, R. M.; GOLDENBERG, D. M.; FRANSSEN, G.; MCBRIDE, W. J.; ROSSI, E. A.; CHANG, C. H.; LAVERMAN, P.; DISSELHORST, J. A.; EEK, A.; VAN DER GRAAF, W. T. A.; OYEN, W. J. G.; BOERMAN, O. C. Pretargeted Immuno-Positron Emission Tomography Imaging of Carcinoembryonic Antigen-Expressing Tumors with a Bispecific Antibody and a ⁶⁸Ga- and ¹⁸F-Labeled Hapten Peptide in Mice with Human Tumor Xenografts. *Mol Cancer Ther* 9(4): 1019-27, 2010.
- SCHIPPER, M. L.; CHENG, Z.; LEE, S. W.; BENTOLIA, L. A.; IYER, G.; RAO, J.; CHEN, J.; CHEN, X.; WU, A. M.; WEISS, S.; GAMBHIR, S. S. microPET-Based Biodistribution of Quantum Dots in Living Mice. *J Nucl Med* 48: 1511-1518, 2007.

- SCOTT, A. M.; WOLCHOK, J. D.; OLD, L. J. Antibody therapy of câncer. *Nat Rev Cancer*. 12: 278-287, 2012.
- SERWER, L. P.; NOBLE, C. O.; MICHAUD, K.; DRUMMOND, D. C.; KIRPOTIN, D. B.; OZAWA, T.; PRADOS, M. D.; PARK, J. W.; JAMES, D. Investigation of intravenous delivery of nanoliposomal topotecan for activity against orthotopic glioblastoma xenografts. *Neuro-Oncology* 13(12): 1288-1295, 2011.
- SEUÁNEZ, H. N.; MOREIRA, M. A. M.; OTAZÚ, I. B.; BRAGGIO, E.; RENAULT, I. Z. Métodos Moleculares de Diagnóstico In *Oncologia Molecular*. Ferreira, C. G.; ROCHA, J. C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 13-28, 2004.
- SHIN, D. H.; CHUN, Y. S.; LEE, D. S.; HUANG, E.; PARJ. W. Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 111(6): 3131-3136, 2008.
- SHINKAI, M.; YANASE, M.; SUZUKI, M.; HONDA, H.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J.; KOBAYASHI, T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *J. Magnetism and Magnetic Mat* 194: 176-184, 1999.
- SHISH, L. B.; SHARKEY, R. M.; GOLDENBERG, D. M. A fluorouridine-anti-CEA immunoconjugate is therapeutically effective in a human colonic cancer xenograft model. *Int J Cancer* 46(6): 1101-1106, 1990.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 62(1): 10-29, 2012.
- SIEGEL R, WARD E, BRAWLEY O, JEMAL A. Cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* 61: 212-236, 2009.
- SIGERIST, H. E. The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer. *Bull N Y Acad Med* 8(11): 642-653, 1932.
- SILVERBERG, M. J.; LAU, B.; JUSTICE, A. C.; ENGELS, E.; GILL, M. J.; GOEDERT, J. J.; KIRK, G. D.; D'SOUZA, G.; BOSCH, R. J.; BROOKS, J. T.; NAPRAVNIK, S.; HESSOL, N. A.; JACOBSON, L. P.; KITAHATA, M. M.; KLEIN, M. B.; MOORE, R. D.; RODRIGUEZ, B.; ROURKE, S. B.; SAAG, M. S.; STERLING, T. R.; GEBO, K. A.; PRESS, N.; MARTIN, J. N.; DUBROW, R. Risk of Anal Cancer in HIV-Infected and HIV-Uninfected Individuals in North America. *Clin Infect Dis* 2012. *In press*.
- SOLER, M. A. G.; LIMA, E. C. D.; NUNES, E. S.; SILVA, F. L.; OLIVEIRA, A. C.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. Spectroscopic Study of Maghemite Nanoparticles Surface-Grafted with DMSA. *J Phys Chem A*. 115(6): 1003-1008, 2011.
- SPUNGNINI, E. P.; BIROCCIO, A.; DE MORI, R.; SCARSELLA, M.; D'ANGELO, C.; BALDI, A.; LEONETTI, C. Electroporation increases antitumoral efficacy

- of the bcl-2 antisense G3139 and chemotherapy in a human melanoma xenograft. *J Transl Med* 9: 125, 2011.
- SOETH, E.; WIHTH, T.; LIST, H. J.; KUMBHANI, S.; PETERSEN, A.; NEUMAIER, M.; CZUBAYKO, F.; JUHL, H. Ribozyme Targeting Demonstrates an Antiapoptotic Effect of Carcinoembryonic Antigen in HT29 Colon Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 7: 2022-2030, 2001.
- SONODA, A.; NITTA, N.; NITTA-SEKO, A.; OHTA, S.; TAKAMATSU, S.; IKEHATA, Y.; NAGANO, I.; JO, J.; TABATA, Y.; TAKAHASHI, M.; MATSUI, O.; MURATA, K. Complex comprised of dextran magnetite and conjugated cisplatin exhibiting selective hyperthermic and controlled-release potential. *Int J Nanomedicine* 5: 499-504, 2010.
- SU, L. J.; MAHABIR, S.; ELLISON, G. L.; MCGUINN, L. A.; REID, B. C. Epigenetic contributions to the relationship between cancer and dietary intake of nutrients, bioactive food components, and environmental toxicants. *Front Genet* 2: 91, 2012.
- TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *Am J Pathol* 170(3): 793-804, 2007.
- TANEJA, P.; MAGLIC, D.; KAI, F.; ZHU, S.; KENDIG, R. D.; FRY, E. A.; INOUE, K. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol* 4:15-34, 2010.
- TAYLOR, R.M.; HUBER, D.L.; MONSON, T.C.; ALI, A.M.S.; BISOFFI, M.; SILLERUD, L.O. Multifunctional iron platinum stealth immunomicelles: targeted detection of human prostate cancer cells using both fluorescence and magnetic resonance imaging. *J Nanopart Res* 13(10): 4717-4729, 2011.
- THOMAS, P.; TOTH, C. A.; SAINI, K. S.; JESSUP, J. M.; STEELE, G. Jr. The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochim Biophys Acta*. 1032: 177-189, 1990.
- THOMAS, P.; FORSE, R. A.; BAJENOVA, O. Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin Exp Metastasis* 28: 923-932, 2011.
- THOMSON, D. M. P.; KRUPPEY, J.; FREEDMAN, S.; GOLD, P. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *PNAS USA* 64(1): 161-167, 1969.
- TOBIOKA, H.; ISOMURA, H.; KOKAI, Y.; SAWADA, N. Polarized distribution of carcinoembryonic antigen is associated with a tight junction molecule in human colorectal adenocarcinoma. *J Pathol* 198: 207-212, 2002.

- TOM, B. H.; RUTZKY, L. P.; JAKSTYS, M. M.; OYASU, R.; KAYE, C. I.; KAHAN, B. D. Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* 12(3): 180-191, 1976.
- TOMANEK, B.; IQBAL, U.; BLASIAK, B.; ABULROB, A.; ALBAGHDADI, H.; MATYAS, J. R.; PONJEVIC, D.; SUTHERLAND, G. R. Evaluation of brain tumor vessels specific contrast agents for glioblastoma imaging. *Neuro Oncol* 14(1): 53-63, 2011.
- TRAVIS, L. B.; NG, A. K.; ALLAN, J. M.; PUI, C. H.; KENNEDY, A. R.; XU, G.; PURDY, J. A.; APPLGATE, K.; YAHALOM, J.; CONSTINE, L. S.; GILBERT, E. S.; BOICE Jr, J. D. Second Malignant Neoplasms and Cardiovascular Disease Following Radiotherapy. *J Natl Cancer Inst* 104: 357-370, 2012.
- TOTH, C. A.; THOMAS, P.; BROITMAN, S. A.; ZAMCHECK, N. A new Kupffer cell receptor mediating plasma clearance of carcinoembryonic antigen by the rat. *Biochem J* 204: 377-381, 1982.
- TSAI, M.; LU, Z.; WANG, J.; YEH, T. K.; WIENTJES, M. G.; AU, J. L. S. Effects of carrier on disposition and antitumor activity of intraperitoneal paclitaxel. *Pharm Res* 24(9): 1691-1701, 2007.
- TSURUSHITA, N.; HINTON, P. R.; KUMAR, S. Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. *Methods* 36: 69-83, 2005.
- TURASHVILI, G.; MCKINNEY, S. E.; GOKTEP, O.; LEUNG, S. C.; HUNTSMAN, D. G.; GELMON, K. A.; LOS, G.; REJTO, P. A.; APARICIO, S. A. J. R. P-cadherin expression as a prognostic biomarker in a 3992 case tissue microarray series of breast cancer. *Mod Pathol* 24: 64-81, 2011.
- VALOIS, C. R. A.; BRAZ, J. M.; NUNES, E. S.; VINOLO, M. A. R.; LIMA, E. C. D.; CURTI, R.; KUEBLER, W. M.; AZEVEDO, R. B. The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a b2 integrin-dependent pathway. *Biomaterials* 31: 366-374, 2010.
- VETTORE, A. L.; CABALLERO, O. L. Câncer colorretal. In *Oncologia Molecular*. Ferreira, C. G.; ROCHA, J. C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 171-181, 2004.
- VILLANUEVA, A.; CAÑETE, M.; ROCA, A.G.; CALERO, M.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; SERNA, C.J.; MORALES, M.P.; MIRANDA, R. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnol* 20(11): 115103, 2009.
- VIRJI, M.; WATT, S. M.; BARKER, S.; MAKEPEACE, K.; DOYONNAS, R. The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 22(5): 929-939, 1996.

- WAJED, S. A. Personalized Treatment—The Promise of Molecular Genetics Diagnostics. *J Gastrointest Surg* 14 (Suppl 1): S2-S5, 2010.
- WANG, Z.; CHUI, W. K.; HO, P. C. Nanoparticulate Delivery System Targeted to Tumor Neovasculature for Combined Anticancer and Antiangiogenesis Therapy. *Pharm Res* 28(3): 585-596, 2011.
- WARD, B. B.; DUNHAM, T.; MAJOROS, I. J.; BAKER JR, J. R. Targeted Dendrimer Chemotherapy in an Animal Model for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 69(9): 2452-2459, 2011.
- WATER, W.; MARKOPOULOS, C.; VELDE, C. J. H.; SEYNAEVE, C.; HASENBURG, A.; REA, D.; PUTTER, H.; NORTIER, J. W. R.; CRAEN, A. J. M.; HILLE, E. T. M.; BASTIAANET, E.; HADJI, P.; WESTENDORP, R. G.; LIEFERS, G. J.; JONES, S. E. Association Between Age at Diagnosis and Disease-Specific Mortality Among Postmenopausal Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *JAMA* 307(6): 590-597, 2012.
- WEI, C. H.; HARARI, A. Parathyroid Carcinoma: Update and Guidelines for Management. *Curr Treat Options Oncol* 13: 11-23, 2011.
- WEISSLEDER, R. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 2: 1-8, 2002.
- WERNER, M. E.; FOOTE, M. B.; WANG, A. Z. Chemoradiotherapy of Human Tumors: Novel Approaches from Nanomedicine. *Curr Pharm Des* 2012. *In press*.
- WESTWOOD, J. H.; BESSEL, E. M.; BUKHARI, M. A.; THOMAS, P.; WALKER, J. M. Studies on the structure of the carcinoembryonic antigen. I. Some deductions on the basis of chemical degradations. *Immunochemistry* 11: 811-820, 1974.
- WEZEL, T.; MIDDELDORP, A.; WIJNEN, J. T.; MORREAU, H. A review of the genetic background and tumour profiling in familial colorectal cancer. *Mutagenesis* 27(2): 239-245, 2012.
- WINOGRAD, B.; BOVEN, E.; LOBBEZOO, M. W.; PINEDO, H. M. Human tumor xenografts in the nude mouse and their value as test models in anticancer drug development (review). *In Vivo* 1(1): 1-13, 1987.
- WIRTH, T.; SOETH, E.; CZUBAYKO, F.; JUHL, H. Inhibition of endogenous carcinoembryonic antigen (CEA) increases the apoptotic rate of coloncancer cells and inhibits metastatic tumor growth. *Clin Exp Metastasis*. 19(2): 155-160, 2002.
- WONG, J. Y. C.; CHU, D. Z.; WILLIAMNS, L. E.; LIU, A.; ZHAN, J.; YAMAUCHI, D. M.; WILCZYNSKI, S.; WU, A. M.; YAZAKI, P. J.; SHIVELY, J. E.; LEONG, L.; RAUBITSCHKEK, A. A. A Phase I Trial of 90 Y-DOTA-Anti-CEA Chimeric T84.66 (cT84.66) Radioimmunotherapy in Patients with Metastatic CEA-Producing Malignancies. *Cancer Biother Radiopharm* 21(2): 88-100, 2006.

- WOOD, F. C. Recent Cancer Therapy. *Can Med Assoc J.* 13(3): 152-159, 1923.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em março de 2012.
- WU, A. M.; SENTER, P. D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23(9): 1137-1146, 2005.
- YANASE, M.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J.; KOBAYASHI, T. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Jpn J Cancer Res* 89: 775-782, 1998.
- YANG, X.; SO, W. Y.; MA, R. C.; KONG, A. P.; XU, G.; CHAN, J. C. Diabetes and cancer: the mechanistic implications of epidemiological analyses from the HongKong Diabetes Registry. *Diabetes Metab Res Rev* 2012a. *In press*.
- YANG, D.; VAN, S.; SHU, Y.; LIU, X.; GE, Y.; JIANG, X.; JIN, Y.; YU, L. Synthesis, characterization, and in vivo efficacy evaluation of PGG–docetaxel conjugate for potential cancer chemotherapy. *Int J Nanomedicine.* 7: 581-589, 2012b.
- YERUSHALMI, R.; TYLDESLEY, S.; KENNECKE, H.; SPEERS, C.; WOODS, R.; KNIGHT, B.; GELMON, K. A. Tumor markers in metastatic breast cancer subtypes: frequency of elevation and correlation with outcome. *Ann Oncol* 23: 338-345, 2012.
- YI, H.; GHOSH, D.; HAM, M. H.; QI, J.; BARONE, P. W.; STRANO, M. S. BELCHER, A. M. M13 Phage-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes As Nanoprobes for Second Near-Infrared Window Fluorescence Imaging of Targeted Tumors. *Nano Lett* 12: 1176-1183, 2012.
- YIGIT, M.V.; MOORE, A.; MEDAROVA, Z. Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharm Res* 29(5): 1180-1188, 2012.
- YONEDA, T.; MICHIGAMI, T.; YI, B.; WILLIAMS, P. J.; NIEWOLNA, M.; HIRAGA, T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer.* 88(12 Suppl): 2979-2988, 2000.
- ZBUK, K.; ANAND, S. S. Declining incidence of breast cancer after decreased use of hormone-replacement therapy: magnitude and time lags in different countries. *J Epidemiol Community Health* 66: 1-7, 2012.
- ZHANG, L.; ZHONG, X.; WANG, L.; CHEN, H.; WANG, Y. A.; YEH, J.; YANG, L.; MAO, H. T₁-weighted ultrashort echo time method for positive contrast imaging of magnetic nanoparticles and cancer cells bound with the targeted nanoparticles *J Magn Reson Imaging* 33(1):194-202, 2011.
- ZHAO, J.; ZHU, Y.; WANG, P. P.; WEST, R.; BUEHLER, S.; SUN, Z.; SQUIRES, J.; ROEBOTHAN, B.; MCLAUGHIN, J. R.; CAMPBELL, P. T.; PARFREY, P. S. Interaction between alcohol drinking and obesity in relation to colorectal cancer

risk: a case-control study in Newfoundland and Labrador, Canada. *Ann Oncol* 23(2): 479-490, 2012.

ZHENG, C.; FENG, J.; LU, D.; WANG, P.; XING, S.; COLL, J. L.; YANG, D.; YAN, X. A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity. *Plos one* 6(6): e21146, 2011.

ZHOU, G.; CHIU, D.; QIN, D.; NIU, L.; CAI, J.; HE, L.; HUANG, W.; XU, K. The Efficacy Evaluation of Cryosurgery in Pancreatic Cancer Patients with the Expression of CD44v6, Integrin-b1, CA199, and CEA. *Mol Biotechnol* 2012. *In press*.

ZIMMERMANN, W.; ORTLIEB, B.; FRIEDRICH, R.; VON KLEIST, S. Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure. *PNAS USA* 84: 2960-2964, 1987.

ZUCKIER, L. S.; DOHAN, O.; LI, Y.; CHANG, C. J.; CARRASCO, N.; DADACHOVA, E. Kinetics of perrhenate uptake and comparative biodistribution of perrhenate, pertechnetate, and iodide by NaI symporter-expressing tissues in vivo. *J Nucl Med* 45: 500-507, 2004.