



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Marta de Souza Albernaz

**Desenvolvimento de nanorradiofármaco à base de magnetita e processo de
decoreção com anticorpo monoclonal para determinação de alvo
intracelular**

Rio de Janeiro

2017

Marta de Souza Albernaz

**Desenvolvimento de nanorradiofármaco à base de magnetita e processo de decoração
com anticorpo monoclonal para determinação de alvo intracelular**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências, da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

A331	<p>Albernaz, Marta de Souza. Desenvolvimento de nanorradiofármaco à base de magnetita e processo de decoração com anticorpo monoclonal para determinação de alvo intracelular / Marta de Souza Albernaz – 2017. 113 f.</p> <p>Orientador: Ralph Santos-Oliveira. Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.</p> <p>1. Trastuzumab - Teses. 2. Nanopartículas - Teses. 3. Radiofármacos – Teses. 4. Mamas - Câncer - Teses. I. Santos-Oliveira, Ralph. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 577.27:618.19-006</p>
------	--

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marta de Souza Albernaz

**Desenvolvimento de nanorradiofármaco à base de magnetita e processo de decoração
com anticorpo monoclonal para determinação de alvo intracelular**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2017.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira
Instituto de Engenharia Nuclear

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Eduardo Ricci Junior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Maria Angélica Vergara Wasserman
Instituto de Engenharia Nuclear

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, meus pais, Jandyra de Souza Carvalho Albernaz e Antonio Pereira Albernaz; em especial à minha mãe e meu orientador e amigo, Ralph Santos-Oliveira, pois perante as minhas dúvidas me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e sempre colocar em minha vida pessoas especiais e que permitam também que eu possa fazer a diferença em algum momento de suas vidas.

Aos meus pais, Jandyra de Souza Carvalho Albernaz e Antonio Pereira Albernaz, pela paciência infinita, incentivo, compreensão ao meu isolamento e por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador e amigo querido, Prof. Ralph Santos-Oliveira, que revolucionou minha vida desde que nos conhecemos, acreditando em mim e não me deixando desistir, caminhando ao meu lado do início ao fim deste projeto. Agradeço pela sua paciência e todo esforço empregado na realização deste doutorado, se não fosse pela sua fé em mim e sua recusa em aceitar minhas dúvidas, desculpas e inseguranças, talvez esse sonho não seria concretizado. Agradeço a Deus por tê-lo colocado em meu caminho, por ser este amigo e pessoa maravilhosa que tanto admiro.

À Prof.^a Thereza Christina Barja-Fidalgo, pela oportunidade e confiança em nosso grupo.

Ao Prof. André Mencialha pelas sugestões e revisões desta tese.

À amiga Thaís Ligiéro Braga, pelas palavras de incentivo e apoio constante ao longo desta jornada.

Aos amigos do HUCFF-Fundão, Thiago Barboza, pela ajuda na adaptação das figuras, Monica Araujo Pinheiro e Damares Souza de Freitas, por estarem ao meu lado, me incentivando, no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Nanorradiofármacos, Suyene Rocha Pinto, Sara Rhaissa Rezende dos Reis, Luiz Filipi Cavalcanti e Thamires de Oliveira Vieira, pela ajuda nos experimentos com animais.

À amiga Vanessa Viana de Souza, por todo apoio, paciência, incentivo e ajuda na formatação e revisão desta tese.

A Fagner Santos do Carmo, afinal esta foi uma jornada que iniciamos juntos, nos apoiando mutuamente.

Aos Profs. Emerson Soares Bernardes, Sergio Hiroshi Toma e Koiti Araki, pela parceria no desenvolvimento de projetos. Vocês demonstraram que quando há

comprometimento, seriedade e respeito, podemos sonhar grande independente das adversidades.

Às instituições de fomento à pesquisa científica: CNPq, CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

ALBERNAZ, Marta de Souza. **Desenvolvimento de nanorradiofármaco à base de magnetita e processo de decoração com anticorpo monoclonal para determinação de alvo intracelular**. 2017. 113f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O advento do desenvolvimento de radiofármacos em escala nanométrica, propicia um novo paradigma para a medicina nuclear e desponta como alternativa viável ao tratamento e diagnóstico de tumores. A liberação controlada, específica e direcionada ao alvo correto, garante maior eficiência e diminui os efeitos colaterais e tóxicos. As nanopartículas de última geração possuem ligantes de superfície de reconhecimento específicos, como anticorpos (monoclonais), permitindo o aumento do reconhecimento do tecido tumoral. As nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) como magnetita apresentam alta reatividade química superficial, favorecendo a ligação de biomoléculas; apresentam difusão através de tecidos e baixa toxicidade. Nesse contexto, e interligando tecnologias de ponta, tais como a nuclear e nanotecnologia, este trabalho teve como objetivo a produção, caracterização e estudo da biodistribuição de nanopartículas magnéticas decoradas com Trastuzumabe marcadas com o radionuclídeo Tecnécio-99m para detecção precoce e precisa de tumores de mama. As nanopartículas magnéticas foram preparadas pelo método de termodecomposição e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM), evidenciando sua forma esférica e seu diâmetro de 7 nm. A conjugação do anticorpo monoclonal à superfície da nanopartícula de magnetita foi realizada por meio de uma reação de carbodiimida. A marcação com Tecnécio-99m foi realizada pelo método indireto e seu rendimento determinado pela cromatografia em papel *Whatman* nº 1. O resultado demonstrou um rendimento de marcação maior que 97%. A imagem SPECT mostra a captação correspondente à lesão, que tem sua localização confirmada com a respectiva imagem de bioluminescência. No estudo de biodistribuição foram utilizados camundongos Balb/c nude sadios e induzidos com xenoenxerto de tumor de mama humano de linhagem MCF-7, que foram sacrificados duas horas após a administração do nanorradiofármaco e dissecados para contagem dos órgãos no contador gama. O tumor xenoenxertado teve grande captação (> 10% da dose total injetada), corroborando o uso do nanorradiofármaco. A biodistribuição demonstrou que o nanorradiofármaco possui um *clearance* renal excelente, e pouco reconhecimento pelo sistema macrofágico assim como não foi capaz de permear a barreira hematoencefálica, consubstanciando sua segurança de uso. Por fim, o nanorradiofármaco apresentou grande afinidade às proteínas plasmáticas e baixa acumulação no tecido estriado cardíaco, reduzindo assim seu efeito cardiotóxico. O conjunto dos dados estabelece um perfil de uso como agente de imagem para fins diagnóstico em câncer de mama.

Palavras-chave: Trastuzumabe. Nanopartículas. Radiofármacos. Câncer de mama.

ABSTRACT

ALBERNAZ, Marta de Souza. **Development of nanoradiopharmaceutical based on magnetite and decoration process with monoclonal antibody for intracellular targeting.** 2017. 113f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The advent of developing of radiopharmaceuticals at nanoscale, provides a new paradigm for Nuclear Medicine and emerges as a viable alternative to the treatment and diagnosis of tumors. The targeting and controlling release of these nanoradiopharmaceuticals ensures greater efficiency and decreases side effects and toxicity. Cutting-edge nanoparticles have specific recognition surface ligands, such as (monoclonal) antibodies, allowing increased recognition of tumor tissue. The nanoparticles of iron oxide (Fe_3O_4) as magnetite present high surface chemical reactivity, favoring the biomolecules binding as diffusion through tissues and lower toxicity. In this context, and interconnecting last generation technologies such as nuclear and nanotechnology, this work had the objective of producing, characterizing and studying the biodistribution of magnetic nanoparticles decorated with trastuzumab and labeled with technetium-99m radionuclide for the early and accurate detection of breast cancer. The magnetic nanoparticles were prepared by the thermodecomposition method and characterized by transmission electron microscopy (TEM) and high resolution transmission electron microscopy (HRTEM), showing its spherical shape and its diameter of 7 nm. The conjugation of the monoclonal antibody to the surface of the magnetite nanoparticle was performed by means of a carbodiimide reaction. Labeling with technetium-99m was performed by the indirect method and its yield determined by Whatman 1 paper chromatography. The result showed a labeling yield greater than 97%. The SPECT image shows the uptake corresponding to the lesion, which has its location confirmed with the respective bioluminescence image. In the biodistribution study, healthy and induced human breast tumor xenograft-induced MCF-7 Balb/c micewere sacrificed two hours after the administration of the nanoradiopharmaceutical and dissected for counting the organs in the gamma counter. The xenoenxerted tumor had a large caption ($> 10\%$ of the total injected dose), corroborating the use of the nanoradiopharmaceutical. The biodistribution demonstrated that the nanoradiopharmaceutical has an excellent renal clearance, and little recognition by the macrophagic system as well as it was not able to permeate the blood-brain barrier, consubstantiating its safety of use. Finally, the nanoradiopharmaceutical showed high affinity to plasma proteins and low accumulation in the cardiac striatum, thus reducing its cardiotoxic effect. The data set establishes a profile of use as image agent for diagnostic purposes in breast cancer.

Keywords: Trastuzumab. Radiopharmaceuticals. Nanoparticles. Breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária	21
Figura 1 – Estágios da carcinogênese	22
Figura 2 – Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto pele não melanoma	24
Figura 3 – Comparação das diversas tecnologias de imagem disponíveis atualmente no mundo e em uso em medicina	35
Figura 4 – Estrutura do anticorpo IgG	39
Figura 5 – Estrutura esquemática do Trastuzumabe	44
Figura 6 – Bloqueio das vias de transdução de sinal pelo Trastuzumabe	45
Figura 7 – Via proposta de toxicidade cardíaca induzida pelo Trastuzumabe	49
Figura 8 – Representação esquemática do efeito de permeabilidade e retenção aumentada das nanopartículas medicinais e fármaco livre nos tecidos	52
Figura 9 – Tipos de nanopartículas	55
Figura 10 – Princípios básicos do gerador	61
Figura 11 – Métodos de eluição do gerador	62
Quadro 2 – Radionuclídeos para terapia	63
Quadro 3 – Radionuclídeos para diagnóstico	63
Figura 12 – Decaimento do ^{99}Mo -99 para $^{99\text{m}}\text{Tc}$	64
Figura 13 – Equipamento SPECT	65
Figura 14 – Equipamento PET/CT	66
Quadro 4 – PET e suas aplicações	66
Figura 15 – Esquema funcionalização das NPM com fosfoetanolamina	72
Figura 16 – Estrutura do DTPA	73
Figura 17 – Estrutura do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA	73
Figura 18 – Esquema da reação para obtenção de nanopartículas superparamagnéticas bifuncionalizadas com DTPA e TZB	74
Figura 19 – Esquema de marcação da NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m	78
Figura 20 – Cromatografia da NPM-DTPA-TZB- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	79

Figura 21 –	Imagens TEM (A) e HRTEM (B) de NPM funcionalizadas mostrando sua forma quase esférica e alto grau de cristalinidade.....	81
Figura 22 –	Imagem DLS da NPM, mostrando o tamanho ultra-pequeno de 7nm	82
Figura 23 –	Imagem por bioluminescência de câncer de mama	83
Quadro 5 –	Contagem dos pedaços da fita no Contador gama com as respectivas porcentagens em cada pedaço	84
Quadro 6 –	Estabilidade da marcação da NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m até 8 horas	85
Gráfico 1 –	Biodistribuição de NPM-DTPA-TZB- ^{99m} Tc duas horas após administração em camundongos Balb/c nude sadios (órgão x %dose/órgão)	86
Gráfico 2 –	Biodistribuição de NPM-DTPA-TZB- ^{99m} Tc duas horas após administração em camundongos Balb/c nude com xenoenxerto de tumor de mama no flanco direito	88
Figura 24 –	Imagens SPECT comparadas a imagem por biofluorescência com xenoenxerto de tumor de mama	90
Figura 25 –	Imagem SPECT comparada a imagem biofluorescência da lesão excisada (xenoenxerto de tumor de mama)	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
CDC	Citólise Dependente de Complemento
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CK	Citoqueratinas
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTPA	<i>Diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
EDS	Energia Dispersiva
EMEA	<i>European Medicines Evaluation Agency</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> – Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ErbB	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
ErbB2	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal Humano 2
Fab	<i>Fragment Antigen Binding</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fc	Fração Cristalizável
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Administração de Alimentos e Medicamentos
FEA	Fosfoetanolamina
FEA@NPM	NPM funcionalizada com fosfoetanolamina
GA	Glutaraldeído
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HRTEM	<i>High-Resolution Transmission Electron Microscopy</i>
IEA	Instituto de Energia Atômica
Ig	Imunoglobulina
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>

IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IQ	Instituto de Química
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
Kip	<i>Kinase Inhibitor Protein</i>
LIEC	Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica
LQSN	Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia
MoAb	<i>Monoclonal Antibodies</i>
MS	Ministério da Saúde
NP	Nanopartícula
NPM	Nanopartícula de Magnetita
NPM-DTPA-TZB	Nanopartículas de magnetita com o quelante ácido dietileno triamino pentaacético com anticorpo monoclonal Trastuzumabe
NPM-DTPA-TZB- ^{99m} Tc	Nanopartículas de magnetita com o quelante ácido dietileno triamino pentaacético com anticorpo monoclonal Trastuzumabe marcada com Tecnécio-99m
NPM-TZB	Nanopartículas de magnetita com o anticorpo monoclonal Trastuzumabe
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	<i>Poly ADP-ribose polymerase</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PGA	Poli (ácido glutâmico)
PLA	Poli (ácido láctico)
QDs	<i>Quantum Dots</i>
SMF	Sistema Mononuclear Fagocítico
SPECT	<i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>
SPION	<i>Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i>
SRE	Sistema Retículo-Endotelial
TC	Tomografia Computadorizada
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TZB	Trastuzumabe
US	Ultrassonografia

UFSCar

Universidade Federal de São Carlos

USP

Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

Fe_3O_4	Molécula de óxido de ferro (Magnetita)
^{18}F -FDG	Flúor-deoxiglicose marcada com Flúor-18
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI	Sestamibi marcado com Tecnécio-99m
MIBI	Sestamibi
^{131}I	Iodo-131
^{123}I	Iodo-123
kDa	Quilo Dalton
g/mol	Grama/mol
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio-99 Metaestável
keV	Quilo elétron volt
$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	Molibdênio-99/Tecnécio-99 metaestável
pH	Potencial Hidrogeniônico
γ	Gama
$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	Pertecnetato de Sódio
nm	Nanometro
γ - Fe_2O_3	Molécula de óxido de ferro (Maghemita)
°C	Grau Celsius
μCi	Microcurie
MBq	Megabecquerel
cm	Centímetro
com	Contagem por minuto
CdSe	Seleneto de cádmio
ZnS	Sulfeto de zinco
CaS	Sulfeto de cádmio
SH	Tiol
NaBH_4	Sódio boro hidreto
AuCl_4	Cloreto de ouro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Câncer	20
1.2	Carcinogênese	21
1.3	Câncer de mama	24
1.3.1	<u>Classificação histológica dos tumores de mama</u>	25
1.3.1.1	Carcinoma ductal invasivo	25
1.3.1.2	Carcinoma lobular	26
1.3.1.3	Carcinoma tubular	26
1.3.1.4	Carcinoma mucinoso	26
1.3.1.5	Carcinoma medular	27
1.3.1.6	Carcinoma micropapilar	27
1.3.1.7	Carcinoma papilar	27
1.3.1.8	Carcinoma metaplásico	27
1.3.2	<u>Classificação molecular dos tumores de mama</u>	28
1.3.2.1	Luminal A	29
1.3.2.2	Luminal B	29
1.3.2.3	Superexpressor de HER-2	29
1.3.2.4	Basal-like	30
1.3.2.5	Normal-like	31
1.3.2.6	Claudin-low	31
1.3.3	<u>Diagnóstico</u>	32
1.3.3.1	Mamografia	33
1.3.3.2	Ultrassonografia	33
1.3.3.3	Ressonância magnética	34
1.3.3.4	Medicina nuclear	34
1.3.4	<u>Tratamento</u>	36
1.4	Anticorpos Monoclonais	37
1.4.1	<u>Anticorpos</u>	37
1.4.2	<u>Estrutura</u>	38

1.4.3	<u>Anticorpos monoclonais para uso terapêutico</u>	39
1.5	Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER2)	41
1.6	Trastuzumabe	43
1.6.1	<u>Mecanismo de ação do Trastuzumabe</u>	43
1.6.2	<u>Mecanismo de resistência ao Trastuzumabe</u>	46
1.6.2.1	Ativação de vias alternativas	46
1.6.2.2	Perda do PTEN	47
1.6.2.3	Sinalização mediada por outros receptores da família EGFR	47
1.6.2.4	Bloqueio da interação receptor/anticorpo	48
1.6.2.5	Truncamento do receptor HER2	48
1.6.3	<u>Toxicidade do Trastuzumabe</u>	48
1.7	Nanotecnologia	50
1.7.1	<u>Desenvolvimento de nanocarreadores</u>	54
1.7.2	<u>Nanopartículas magnéticas</u>	55
1.7.3	<u>Nanopartículas aplicadas a imagem molecular</u>	57
1.7.4	<u>Nanotoxicologia</u>	58
1.8	Radiofármacos e Nanorradiofármacos	59
1.8.1	<u>Radiofármacos</u>	59
1.8.1.1	Radiofármacos SPECT	64
1.8.1.2	Radiofármacos PET	65
1.8.2	<u>Nanorradiofármacos</u>	67
2	OBJETIVOS	68
2.1	Objetivo Geral	68
2.2	Objetivos Específicos	68
3	MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1	Materiais	69
3.2	Equipamentos	70
3.3	Métodos	70
3.3.1	<u>Obtenção das nanopartículas de magnetita e processo de decoração bifuncional com fosfoetanolamina e DTPA</u>	70
3.3.2	<u>Caracterização morfológica e dimensional das nanopartículas de magnetita</u>	74
3.3.2.1	Microscopia eletrônica de transmissão e Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução	74

3.3.2.2	Espalhamento dinâmico de luz	75
3.3.3	<u>Modelo de xenoenxerto de tumor</u>	76
3.3.4	<u>Bioluminescência do xenoenxerto nos animais induzidos</u>	77
3.3.5	<u>Marcação da NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)</u>	77
3.3.5.1	Controle de qualidade do processo de marcação das NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m (^{99m} Tc)	78
3.3.5.2	Estudo da estabilidade da marcação das NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m (^{99m} Tc).....	79
3.3.6	<u>Imagem SPECT</u>	79
3.3.7	<u>Estudo de biodistribuição</u>	80
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1	Caracterização Morfológica e Dimensional das Nanopartículas de Magnetita	81
4.2	Análise por Bioluminescência do Modelo de Xenoenxerto	83
4.3	Marcação das NPM-DTPA-TZB com o Tecnécio-99m (^{99m}Tc)	84
4.3.1	<u>Controle de Qualidade do Processo de Marcação das NPM-DTPA-TZB com o Tecnécio-99m (^{99m}Tc)</u>	84
4.3.2	<u>Estabilidade de Marcação da NPM-DTPA-TZB com o Tecnécio-99m (^{99m}Tc)</u>	85
4.4	Estudo de Biodistribuição	86
4.5	Imagem SPECT	89
	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética no uso dos animais CEUA-UFPE	111
	ANEXO B - Artigos submetidos e publicados	112

INTRODUÇÃO

Conhecido há centenas de anos, o câncer sempre foi considerado uma doença dos países desenvolvidos. Contudo, nas últimas quatro décadas, esse cenário vem mudando, como é possível observar pelo documento intitulado: *World Cancer Report*, em 2014, da *International Agency for Research on Cancer* (IARC, em português, Agência Internacional para Pesquisa em Câncer), da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MCGUIRE, 2016). Segundo o relatório, nos últimos 30 anos, o câncer passou a ser considerado um problema de saúde pública mundial, com especial atenção aos países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (INCA, 2015a; DI SIBIO et al., 2016).

Corroborando esses dados, em documento prévio ao relatório da IARC, a OMS estimou que, no ano 2030, serão esperados 27 milhões de casos novos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer, em uma situação denominada de crônica (INCA, 2015a; GHONCHEH; MIRZAEI; SALEHINIYA, 2015).

Dentre os diversos tipos de câncer, o câncer de mama é o mais prevalente entre mulheres no Brasil, excluindo o câncer de pele não melanoma. A estimativa prevista para os anos de 2014-2015 era de 57.120 novos casos de câncer de mama com risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011; PALMERO et al., 2016).

Diversas estratégias vêm sendo implantadas no Brasil nas últimas décadas, visando, principalmente, a detecção precoce que consiste em ações de diagnóstico precoce e rastreamento. Em países de média e baixa renda, o câncer de mama é diagnosticado em estágio avançado comprometendo significativamente o tratamento e a qualidade de vida do paciente. Portanto, todo conjunto de medidas elaboradas para determinação precoce do câncer de mama são cruciais na alteração do prognóstico e na atenuação do cenário atual (INCA, 2015b).

Entre as medidas, podem-se destacar novas estratégias, em particular no diagnóstico e tratamento do câncer, destacando-se o uso de anticorpos monoclonais, os quais se ligam seletivamente ao antígeno (LIGIÉRO et al., 2013). Nessa direção, o Trastuzumabe (Herceptin®) foi o primeiro anticorpo monoclonal aprovado clinicamente no tratamento de câncer de mama metastático, que possui número aumentado de *Human Epidermal Growth*

Factor Receptor 2 (HER2, em português, Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2) (LOI et al., 2011; NAHTA; ESTEVA, 2006).

Embora apresente benefícios clínicos significativos, estudos demonstram que o uso do Trastuzumabe pode acarretar lesão miocárdica, reduzindo a contratilidade do ventrículo esquerdo e podendo, em casos severos, levar ao óbito do paciente (NAHTA; ESTEVA, 2003).

Com o objetivo de minimizar estes efeitos adversos, assim como aumentar a seletividade e a eficácia do uso dos anticorpos monoclonais, diversos sistemas de distribuição de fármacos têm sido desenvolvidos com destaque para os que se utilizam da nanotecnologia (CHO et al., 2008; SÁ et al., 2013; SANTOS-OLIVEIRA, 2011). O desenvolvimento de micro e nano carreadores representam grande avanço para o controle da distribuição dos anticorpos monoclonais nos tecidos e células tumorais. Dentre esses sistemas as nanopartículas magnéticas se destacam por sua forma, tamanho e precisão (SANTOS-OLIVEIRA, 2011).

As nanopartículas magnéticas despertam um interesse singular devido à alta reatividade química de sua superfície, favorecendo a ligação de biomoléculas, além de apresentarem um comportamento superparamagnético a temperatura ambiente (ARAKI, 2007; TOMA et al., 2015; UCHIYAMA, 2015; UCHIYAMA et al., 2015). Nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4), como magnetita, têm sido estudadas, pois, além das propriedades citadas, apresentam boa difusão através de tecidos e baixa toxicidade (LIU; KIM, 2009; ZHANG et al., 2002).

A utilização de radiofármacos para processos de imagem em Medicina Nuclear permite o mapeamento da função fisiológica e a atividade metabólica, gerando assim, informações mais específicas sobre a função do órgão e possíveis disfunções. O mapeamento da distribuição do radiofármaco *in vivo* fornece imagens da morfologia funcional do órgão de uma maneira não invasiva, apresentando um papel importante no diagnóstico de diversas doenças associadas ao mau funcionamento do órgão, como é o caso de doenças oncológicas, neurológicas e principalmente, cardíacas (VALLABHAJOSULA, 2010).

O desenvolvimento de radiofármacos de liberação controlada no alvo correto, garante maior eficiência e diminui os efeitos colaterais e tóxicos (HAMOUDEH et al., 2008). Portanto, a decoração de nanopartículas de magnetita com Trastuzumabe marcada com Tecnécio-99m permite o diagnóstico precoce, o estadiamento do tumor e o reconhecimento do tecido tumoral de forma específica e seletiva (HAMOUDEH et al., 2008; TOMA et al., 2015; UCHIYAMA, 2015; UCHIYAMA et al., 2015).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Se a propagação não for controlada, pode resultar em morte. Ocorre como resultado de modificações nos genes que controlam o crescimento celular provocando mudanças progressivas no metabolismo e processos de vida básicos das células, como alterações na multiplicação, diferenciação e interação das células com o meio extracelular (INCA, 2015a; TING et al., 2010; YU et al., 2017).

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, formando tumores (acúmulo de células cancerosas). Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2015a; NARAYANAN; DALTON, 2016).

Mais de 240.000 de mulheres desenvolverão câncer de mama e ~ 40.000 morrerão da doença nos Estados Unidos em 2016. Globalmente, cerca de 1,7 milhões de mulheres foram diagnosticadas em 2012, enfatizando a necessidade urgente de abordagens terapêuticas eficazes e seguras. Apesar da maioria dos cânceres de mama ser de crescimento lento ou indolente, um subgrupo adquire um fenótipo agressivo devido a diversos motivos. Estudos moleculares, genotípicos e fenotípicos evidenciam claramente a heterogeneidade do câncer de mama com múltiplos subtipos e classificações (LV et al., 2016; NARAYANAN; DALTON, 2016).

O perfil epidemiológico demonstra que os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (Quadro 1) (INCA, 2015a).

Quadro 1 – Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Cólo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

Fonte: Adaptação de INCA, 2015a.

1.2 Carcinogênese

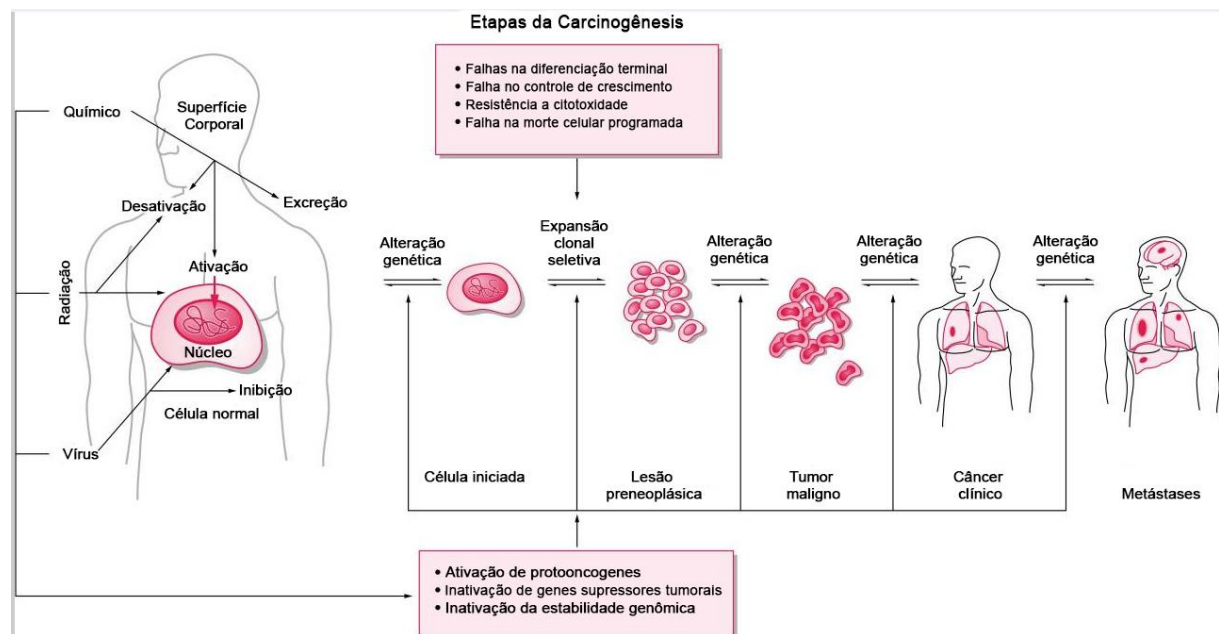
O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese e ocorre lentamente podendo levar anos para a formação do tumor de forma visível (INCA, 2015a; DELPU et al., 2013; QIAN et al., 2016).

O controle do crescimento celular é complexo e depende da expressão de diversos genes. Os protooncogenes são responsáveis pelo crescimento e diferenciação celular e controlam a divisão mitótica ordenada das células. É possível que, por meio de uma mutação genética ou alguma outra ativação anormal de genes, estes sejam transformados em oncogenes, que, por sua vez, aumentam a produção de proteínas que estimulam a divisão e

inibem a diferenciação e a morte celular, originando as células cancerosas (BARCELLOS-HOFF; LYDEN; WANG, 2013; LO; WOLFSON; ZHOU, 2016).

Os diversos estágios químicos da carcinogênese podem ser conceitualmente divididos em quatro etapas: iniciação do tumor, promoção do tumor, conversão maligna e progressão tumoral. A ativação da oncogênese e proto inativação de genes supressores de tumores são eventos mutacionais que resultam de danos ao DNA causados por exposição a produtos químicos. A acumulação de mutações, e não necessariamente a ordem na qual eles ocorrem, consiste na carcinogênese multicelular (Figura 1) (INCA, 2015a; DELPU et al., 2013; WILLIS, 2016).

Figura 1 – Estágios da carcinogênese



Fonte: WESTON; HARRIS, 2003.

A iniciação do tumor é o primeiro estágio em que as modificações iniciais são a lesão genética irreversível causada por agentes cancerígenos ou carcinógenos. Um carcinógeno químico provoca um erro genético, modificando a estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA) que podem conduzir a uma mutação durante a síntese de DNA, resultando na modificação de alguns de seus genes e na formação de clones celulares atípicos (BARCELLOS-HOFF; LYDEN; WANG, 2013; FELLER; KHAMMISSA; LEMMER, 2017).

A promoção do tumor envolve a expansão clonal seletiva de células geneticamente modificadas. Estas células são não mutagênicas, necessitando de um ativador metabólico (oncopromotores) para mediar seus efeitos biológicos (BARCELLOS-HOFF; LYDEN; WANG, 2013; MERTZ; HARCY; ROBERTS, 2017).

A conversão maligna é a transformação da célula pré-neoplásica em uma que expressa fenótipo maligno. A promoção do tumor contribui para o processo de carcinogênese, pela expansão de uma população de células iniciadas, que convergem para a malignidade. A conversão de uma fração destas células à malignidade será acelerada em proporção com a taxa de divisão celular e a quantidade de células em divisão no tumor benigno ou lesão pré-neoplásica. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas. O gene p53 localizado no cromossoma 17p13.1 é o alvo mais comum das alterações genéticas em tumores humanos, estando alterado em pouco mais de 50% dos casos. A perda homocigótica deste gene é notável porque pode ocorrer virtualmente em todos os tipos de câncer, parte explicada por suas atividades funcionais, que envolvem a parada do ciclo celular e o início da apoptose em resposta à lesão do DNA (FELLER; KHAMMISSA; LEMMER, 2017; WILLIS, 2016; YANG; WANG, 2016).

A progressão do tumor compreende a expressão do fenótipo maligno e a tendência de células malignas a adquirir características mais agressivas ao longo do tempo. Além disso, a metástase pode envolver a capacidade de células tumorais para segregar proteases que permitem invasão para além do local do tumor primário imediato. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (FALCO et al., 2016; MERTZ; HARCY; ROBERTS, 2017; QIAN et al., 2016; TONG et al., 2017).

Durante este processo, outras alterações genéticas podem ocorrer, incluindo a ativação de oncogênese e a perda funcional de genes supressores de tumores. Frequentemente, protooncogenes são ativados por dois mecanismos principais: no caso da família do gene ras, mutações pontuais são encontradas em regiões altamente específicas do gene e os genes myc, raf, HER2 e jun podem ser superexpressos, por vezes envolvendo amplificação de segmentos cromossômicos contendo estes genes. A perda da função de genes supressores de tumores normalmente ocorre de uma forma bimodal, e com maior frequência envolve mutações pontuais em um alelo e perda do segundo alelo por uma deleção, evento de recombinação, ou não disjunção cromossômica (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010; ZHOU; HICK, 2013).

Com a multiplicação celular descontrolada, são formados novos vasos sanguíneos (angiogênese) para o fornecimento adequado de nutrientes para as células. Essas, por sua vez, podem se desprender do tumor e migrar, invadindo inicialmente tecidos vizinhos e, em seguida, penetrar vênulas de paredes finas, como os canais linfáticos, que oferecem baixa resistência, atingindo, assim a grande circulação. Por meio dos vasos linfáticos e sanguíneos, as células tumorais podem, então, atingir órgãos distantes do local do tumor primário. A proliferação dentro do parênquima desses órgãos conclui o processo de metástase (MACIEJCZYK, 2013; QIAN et al., 2016; WESTON; CURTIS, 2003; ZHOU; HICK, 2013).

1.3 Câncer de mama

Conforme publicação realizada pelo Ministério da Saúde (INCA, 2015a), em 2016 eram esperados para o Brasil 57.960 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2015a.

O câncer de mama é o tipo que possui a maior incidência e a maior mortalidade na população feminina em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Em 2012, cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia em todo o mundo foram detectados, representando aproximadamente 25% de todos os tipos de câncer

diagnosticados nas mulheres mundialmente. Ainda em 2012, 522 mil óbitos por câncer de mama em mulheres em todo mundo foram registrados. Essas mortes correspondem a 15% de todos os óbitos por câncer em mulheres. É a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos (198 mil óbitos), ficando atrás apenas do câncer de pulmão (INCA, 2015a; DE SANTIS et al., 2014; FERLAY et al., 2015; WCRF, 2012).

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil (14 óbitos a cada 100 mil mulheres em 2013) (INCA, 2015a).

1.3.1 Classificação histológica dos tumores de mama

1.3.1.1 Carcinoma ductal invasivo

A maioria dos tumores de mama origina-se no epitélio ductal (cerca de 80%) e são conhecidos como carcinoma ductal invasivo. Ele se inicia num ducto lácteo, rompe a parede desse ducto e cresce no tecido adiposo da mama, podendo se espalhar (metástase) para outras partes do corpo através do sistema linfático e da circulação sanguínea. Seu diagnóstico é por exclusão, feito quando a lesão não preenche os critérios diagnósticos para os tipos especiais de carcinoma mamário, sendo classificado como carcinoma ductal invasivo sem outra especificação. Apresenta comportamento agressivo, com sobrevida de cinco anos em 60% das mulheres (MALHOTRA et al., 2010; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010).

Histologicamente, o tumor é formado pela proliferação de elementos epiteliais com atipias citológicas relativamente acentuadas, com uma tendência diversa a formar estruturas pseudoglandulares ou semelhantes aos ductos, e com atividade mitótica variável (CADOO et al., 2012; MALHOTRA et al., 2010).

As características citológicas variam muito, podendo ser encontradas desde células pequenas com núcleos homogêneos até células grandes com núcleos irregulares e hipercromáticos. Nas margens da massa tumoral as células neoplásicas infiltram-se para dentro do estroma e do tecido fibroadiposo, há uma invasão dos espaços perivasculars e perineurais, e dos vasos sanguíneos e linfáticos (FU et al., 2017; SABATIER et al., 2016).

1.3.1.2 Carcinoma lobular

Origina-se nos lóbulos da glândula mamária, propagando-se através da parede dos lóbulos, produz metástases em 10% dos casos. Representa bom prognóstico, com sobrevida de 10 anos em 80-90% das mulheres, tendência à bilateralidade e taxa elevada de recidiva sistêmica tardia. São frequentemente distinguidos pela sua fisiologia molecular, uma vez que frequentemente apresentam perda de E-caderina e são tipicamente receptores de estrogênio e progesterona positivos. Adicionalmente, foram observadas em tumores lobulares várias alterações genômicas distintivas, incluindo ganho em 1q e perda do cromossomo 16q20. Um grande estudo de características lobulares também categorizou várias mutações nos genes PTEN, TBX3 e FOXA1 que tipificam lobular carcinomas (FU et al., 2017; VIALE, 2012).

1.3.1.3 Carcinoma tubular

Os carcinomas tubulares são neoplasias benignas raras, representando 0,13-1,7% de lesões mamárias benignas. Os adenomas tubulares são lesões circunscritas, não encapsuladas, de crescimento lento, firmes, móveis e de pequeno a médio porte de mama feminina, constituídas por túbulos redondos regulares densamente embalados. As mulheres jovens em idade reprodutiva (15-49 anos) são comumente afetadas. O quadrante superior e externo da mama é o local mais preferido. Recorrência ou aumento do risco de câncer não é relatado a partir de casos de adenoma tubular (SENGUPTA et al., 2015).

1.3.1.4 Carcinoma mucinoso

Representa 1-4% dos casos de cânceres de mama. Normalmente se manifesta em mulheres após a menopausa, apresenta bom prognóstico, com sobrevida de 10 anos em 80% a 90% dos casos, frequentemente associado a mutações no gene BRCA1 (NAQOS et al., 2016).

1.3.1.5 Carcinoma medular

Representa menos de 5% de todos os cânceres de mama invasivos. É mais frequente em mulheres jovens e está associado a anormalidades no gen BRCA1. Apresenta um prognóstico melhor do que os carcinomas ductais (WANG et al., 2016).

1.3.1.6 Carcinoma micropapilar

É uma forma distinta de carcinoma mamário caracterizado pela proliferação de células malignas em arranjos micropapilares no interior de espaços císticos no estroma da mama, sem revestimento epitelial ou endotelial, sendo frequentes achados de metástases axilares na fase de diagnóstico (YANG et al., 2016).

1.3.1.7 Carcinoma papilar

É considerado um tumor de mama maligno raro, com incidência variando de 1,1% a 1,7% de todos os tumores malignos da mama. As características histopatológicas incluem atipia celular de baixo grau, deposição de mucina intracelular ou extracelular e padrão de crescimento papilar sólido, bem como diferenciação neuroendócrina (OKUBO et al., 2016).

1.3.1.8 Carcinoma metaplásico

Devido à grande heterogeneidade e ao diferente perfil evolutivo, este grupo foi subclassificado. O subtipo fibromatose-simile apresenta diagnóstico diferencial com lesões e tumores fusocelulares benignos, principalmente em biópsias por agulha com amostra limitada ou quando estes ocorrem associados a lesões esclerosantes, cicatrizes radiais ou papilomas. Estudo imuno-histoquímico para citoqueratinas (CK), especialmente as de alto peso molecular

(34 β E-12, CK-5 ou CK-5/6), e p63 auxilia no diagnóstico diferencial e cora positivamente as células fusiformes tumorais. Os diagnósticos diferenciais incluem lesões fusocelulares benignas (fibromatose, fasciite nodular, miofibroblastoma e nódulos reativos pós-biopsia por agulha) e sarcomas fusocelulares de baixo grau (BIAN et al., 2016; SINN; KREIPE, 2013).

A disseminação dos carcinomas mamários é por invasão local (pele, mamilo, músculo ou parede torácica), linfática ou hematogênica. Em 30% a 50% dos casos há comprometimento dos linfonodos axilares no momento do diagnóstico, sendo que as metástases regionais indicam o potencial metastático a distância e sistêmico. Mulheres com 1-3 linfonodos comprometidos têm 60% de sobrevida em 10 anos, esta taxa reduz para 20% nas mulheres que tiveram de 3-4 ou mais linfonodos com metástases na ocasião do diagnóstico. As metástases sistêmicas ocorrem em geral nos pulmões, ossos, fígado, suprarrenal, ovários e sistema nervoso central. Cerca de 30% das mulheres sem metástases axilares desenvolvem metástases sistêmicas posteriormente, o que indica que grande parte dos carcinomas da mama já são doenças sistêmicas no momento do diagnóstico (VIALE, 2012).

1.3.2 Classificação molecular dos tumores de mama

Apesar de todos os avanços da biologia, aplicação de exames imuno-histoquímicos e morfológicos indicativos de ritmo da divisão e agressividade tumoral, somente no início do século XXI com a técnica de microarranjos de DNA na avaliação da composição genética dos tumores, foi possível uma classificação tumoral mais precisa, baseada em perfis de expressão gênica. Métodos moleculares permitem agrupar os tumores em função de suas semelhanças genéticas, estabelecendo acurados parâmetros prognósticos e de orientação terapêutica (PRAT; PEROU, 2011; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

Com o uso dessa técnica os tumores de mama foram classificados em 6 subtipos intrínsecos conforme seu padrão de expressão gênica: luminal A, luminal B, tumores com superexpressão de HER-2, basal-like, normal-like e claudin-low. Os subtipos luminais têm denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais (LO; WOLFSON; ZHOU, 2016; LV et al., 2016; NARAYANAN; DALTON, 2016).

1.3.2.1 Luminal A

É forma tumoral com origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ducto-lobulares, apresentam alta expressão de receptores de estrogênio e progesterona, e genes que são ativados pela ligação hormonal, tais como o gene BCL2, que regula negativamente a apoptose, e o fator de transcrição GATA-3, e ausência de HER2. Corresponde a cerca de 30 a 40% dos casos. A avaliação de Ki67 evidencia baixa taxa de proliferação (< 14%). São tumores de melhor prognóstico, bastante sensíveis a hormonioterapia (LV et al., 2016; NARAYANAN; DALTON, 2016).

1.3.2.2 Luminal B

Também se originam em células epiteliais luminais ricas em receptores de estrogênio. Os receptores de progesterona, por seu lado, podem estar presentes tanto em alta como em baixa proporção de células. A proteína do oncogene HER2 pode ser detectada e o ritmo de proliferação avaliado pelo Ki67 é mais elevado (>14%). Seu maior índice de proliferação celular traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A. Este tumor também é sensível à hormonioterapia, embora em menor grau, e o Trastuzumabe (TZB) pode ser empregado com sucesso se for HER2 positivo. O subtipo luminal B corresponde a cerca de 20 a 30% dos carcinomas de mama (LV et al., 2016; NARAYANAN; DALTON, 2016).

1.3.2.3 Superexpressor de HER2

Em média, são deste subtipo de 25 a 30% dos casos. O oncogene HER2 está superexpresso por amplificação gênica. Em sua evolução natural são altamente agressivos sendo associados ao segundo pior prognóstico em relação aos demais, panorama que foi mudado com a introdução da terapia-alvo anti-HER2, pelo TZB combinado com quimioterapia. Na maioria, estes tumores são receptores de estrogênio negativos (LV et al., 2016; NARAYANAN; DALTON, 2016).

1.3.2.4 Basal-like

O subtipo basal-like é altamente agressivo e, portanto, de particular relevância clínica. Os cânceres de mama basal-like são mais prováveis de ocorrer em mulheres mais jovens, e estão associados a mutações no gene da susceptibilidade ao câncer de mama (BRCA). Eles são caracterizados por alta taxa de proliferação, frequência de recorrência e a presença de mutações p53. Morfologicamente, é caracterizado por alto grau histológico, por elevado índice mitótico, pela presença de áreas de necrose central e pelo destacado infiltrado linfocitário (LO; WOLFSON; ZHOU, 2016).

Estima-se, que de 15 a 20% dos carcinomas de mama sejam basal-like. São lesões pouco diferenciadas ou indiferenciadas com alta taxa de proliferação. Na maior parte (70-80%), são tumores triplo-negativos por reação imuno-histoquímica, com negatividade de RE, RP e HER2; entretanto, os termos basal-like e triplo-negativo não são sinônimos: o primeiro é definido por expressão gênica em microarranjos de DNA, e o segundo, por critério imuno-histoquímico. O painel de marcadores proposto para a classificação do tipo basal-like seria a ausência de expressão de RE, RP e HER2, expressão de citoqueratinas de alto peso molecular/basais, CK5/6, 14 ou 17, e expressão de EGFR (HER1). Os tumores basal-like, apesar de exibirem maior agressividade, são mais responsivos à quimioterapia neoadjuvante (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010; LO; WOLFSON; ZHOU, 2016).

O subtipo de tipo basal-like é altamente agressivo e, portanto, de particular relevância clínica. Os cânceres de mama basal-like são mais prováveis de ocorrer em mulheres mais jovens, e estão associados a mutações no gene da susceptibilidade ao câncer de mama (BRCA). Eles são caracterizados por alta taxa de tumor, taxa de proliferação, frequência de recorrência e a presença de mutações p53. A disfunção de BRCA1, ao que tudo indica, representa um mecanismo gerador de tumores basal-like e triplo-negativos; sendo assim, pode-se inferir que pelo menos uma parte desses seja incompetente no mecanismo de reparo de DNA envolvido na via de recombinação homóloga; isso torna essas células mais dependentes das vias de reparo pelas enzimas da *poly ADP-ribose polymerase* (PARP, em português, poli(ADP)ribose polimerase) (LV et al., 2016; NARAYANAN; DALTON, 2016).

1.3.2.5 Normal-like

A existência do subtipo normal-like é controversa. O termo foi utilizado porque os genes nele expressos são normalmente compartilhados com o tecido epitelial normal; todavia, não está claro se existe mesmo este subtipo, ou se simplesmente a sua determinação deveu-se à contaminação com amostras de tecido normal (PRAT; PEROU, 2011; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

1.3.2.6 Claudin-low

Reconhecidos em 2007, são tumores também triplo-negativos, com baixa expressão de genes das claudinas 3, 4 e 7, e perda de E-caderina. Sua frequência é estimada em 5% de todos os carcinomas de mama e sua origem está vinculada a células muito próximas hierarquicamente às primitivas células tronco-mamárias (PRAT et al., 2010; PRAT; PEROU, 2011).

Claudinas são proteínas transmembrana (família de 24 membros) envolvidas na adesão entre as células, sendo que a regulação de algumas delas está associada ao câncer de mama, ao que parece, por silenciamento epigenético, facilitando a migração celular e a invasão tecidual (PRAT et al., 2010; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

Nos carcinomas claudin-low estão ausentes marcadores de diferenciação luminal; ao contrário, estas formas são ricas em marcadores de células-tronco, de células iniciadoras de câncer, de transição epitélio-mesênquima e de genes associados à resposta imune. É o tumor cujas células mais se assemelham às células-tronco (PRAT; PEROU, 2011; LEHMAN; PIETENPOL, 2014).

Histologicamente, costumam ser do tipo invasivo sem outra especificação, mas também podem ser medulares e/ou metaplásicos, e sobrevir em portadoras de mutação de BRCA1. Têm alto grau histológico, pouca diferenciação e mostram acentuado infiltrado linfocitário (LEHMAN; PIETENPOL, 2014).

A classificação por perfis de expressão de genes pode ser útil, inclusive, para a predição do sítio de metastatização. O foco mais comum de metástase à distância é ósseo para luminais A e B ($\pm 80\%$) e superexpressores de HER2 ($\pm 65\%$), e pulmonar para basal-like e

claudin-low ($\pm 50\%$). De outra parte, as metástases cerebrais são mais frequentes nos tumores não luminais, e as hepáticas, nos superexpressores de HER2 (HARRELL et al., 2012).

1.3.3 Diagnóstico

O estágio inicial do câncer em diversos casos é assintomático e, muitas vezes, quando detectado apresenta grandes dimensões e metástases, atingindo outros órgãos. Sabe-se que de 5 a 10% das pacientes com câncer de mama são inicialmente diagnosticadas já com metástase (REN et al., 2014). Na maioria dos casos a sobrevivência do paciente está vinculada a detecção precoce do tumor (BADAN et al., 2014; CHOI; KWAK; PARK, 2010; INCA, 2015b).

A detecção precoce visa a identificação do câncer em estágios iniciais, momento em que a doença pode ter melhor prognóstico. Os métodos existentes para a detecção precoce do câncer de mama não reduzem a incidência, mas podem reduzir a mortalidade pela doença (DE ABREU; WELLS; TSONGALIS, 2013; INCA, 2015b; MISTRY; FRENCH, 2016; WESOŁA; JELEŃ, 2013).

O objetivo geral das ações de diagnóstico precoce é diminuir as barreiras de acesso e qualificar a demanda e a oferta de serviços, de forma a possibilitar a confirmação diagnóstica do câncer de mama o mais precocemente possível, bem como garantir a integralidade e a continuidade do cuidado na rede de serviços (DE ABREU; WELLS; TSONGALIS, 2013; INCA, 2015b; MISTRY; FRENCH, 2016; PU; YE; WU, 2014).

Entretanto, os métodos de diagnóstico tradicionais não possuem sensibilidade suficiente para a detecção da doença em estágios muito iniciais (CHOI; KWAK; PARK, 2010).

Para resolver esta questão, diferentes tecnologias de imagem não-invasiva são pesquisadas tanto para o diagnóstico precoce, como para monitorar o aparecimento de metástase. Essas técnicas incluem, *Positron Emission Tomography* (PET, em português, Tomografia por Emissão de Pósitron) ou *Single-Photon Emission Computed Tomography* (SPECT, em português, Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único) ou imagem por ressonância magnética (IRM), ultrassonografia (US), tomografia computadorizada (TC) e imagiologia óptica (bioluminescência e/ou imagem de fluorescência)

(CHOI; KWAK; PARK, 2010; DE ABREU; WELLS; TSONGALIS, 2013; MOLLARD et al., 2016; VERCHER-CONEJERO et al., 2015).

1.3.3.1 Mamografia

A mamografia é considerada o método padrão de detecção precoce do câncer de mama e diagnóstico, mas tem limitações, como baixa sensibilidade em mamas densas. O câncer de mama é uma doença heterogênea, com variação de comportamento biológico, diferentes taxas de crescimento e distinto potencial metastático (INCA, 2015b; DE ABREU; WELLS; TSONGALIS, 2013).

Os tumores de crescimento lento são mais facilmente detectados no rastreamento, mas pode não haver benefício em sua detecção precoce. Em cânceres mais agressivos, a detecção precoce com mamografia, além de mais difícil, pode não ser efetiva, em função da rápida taxa de crescimento e do potencial de gerar metástases em pouco tempo, mesmo quando os tumores primários são identificados ainda pequenos (CHOI; KWAK; PARK, 2010; INCA, 2015b; VERCHER-CONEJERO et al., 2015).

1.3.3.2 Ultrassonografia

A ultrassonografia é, ao lado da mamografia, o mais importante método de imagem na investigação diagnóstica de alterações mamárias suspeitas, e os dois métodos são vistos como complementares na abordagem de diferentes situações clínicas. A ultrassonografia é utilizada para detectar, caracterizar e guiar a biópsia de lesões mamárias. Apresenta duas importantes vantagens sobre a mamografia: a ausência do uso de radiação ionizante e o fato de sua acuidade diagnóstica não depender da densidade mamária (INCA, 2015b; FLOBBE et al., 2002; HOUSSAMI; LORD; CIATTO, 2009; NOTHACKER et al., 2009).

A US possui conhecidas limitações que comprometem seu potencial como método de rastreamento para o câncer de mama. Entre essas limitações, estão a grande dependência da presença e da experiência do médico operador, a maior dificuldade de padronização de

técnicas de exame e de critérios de interpretação e a dificuldade na detecção de microcalcificações (ELMORE et al., 2005).

Aspectos como padronização, reprodutibilidade, proporção de casos falso-positivos e garantia da qualidade no rastreamento com ultrassonografia mamária ainda precisam ser mais bem estudados (ELMORE; KRAMER, 2014; HEYWANG-KÖBRUNNER et al., 2008; NOTHACKER et al., 2009).

1.3.3.3 Ressonância magnética

A ressonância magnética é eficaz para o rastreio de mamas densas e identificação de lesões ocultas adicionais na região ipsilateral ou contralateral da mama; pode, também, ajudar a determinar se a lumpectomia ou mastectomia (unilateral ou bilateral) é o melhor tratamento. Embora a RM tenha alta sensibilidade (94% a 100%), a especificidade é baixa (37% a 97%). Sugere-se que a combinação de RM e mamografia para rastreio poderia melhorar as chances de detecção precoce de câncer de mama. Entretanto, a ressonância magnética não é utilizada rotineiramente na triagem (DE ABREU; WELLS; TSONGALIS, 2013; HEYWANG-KÖBRUNNER et al., 2008; VERCHER-CONEJERO et al., 2015).

1.3.3.4 Medicina nuclear

A Medicina Nuclear tem sido utilizada na imagiologia oncológica em diagnóstico, tomada de decisão referente ao tratamento ou monitorização da resposta ao tratamento nos últimos 40 anos. Imagens com radiofármacos possuem a capacidade de avaliar a fisiologia do órgão, distinguindo tecido normal e neoplásico (DE ABREU; WELLS; TSONGALIS, 2013; LEI; WANG; CHEN, 2016; VERCHER-CONEJERO et al., 2015).

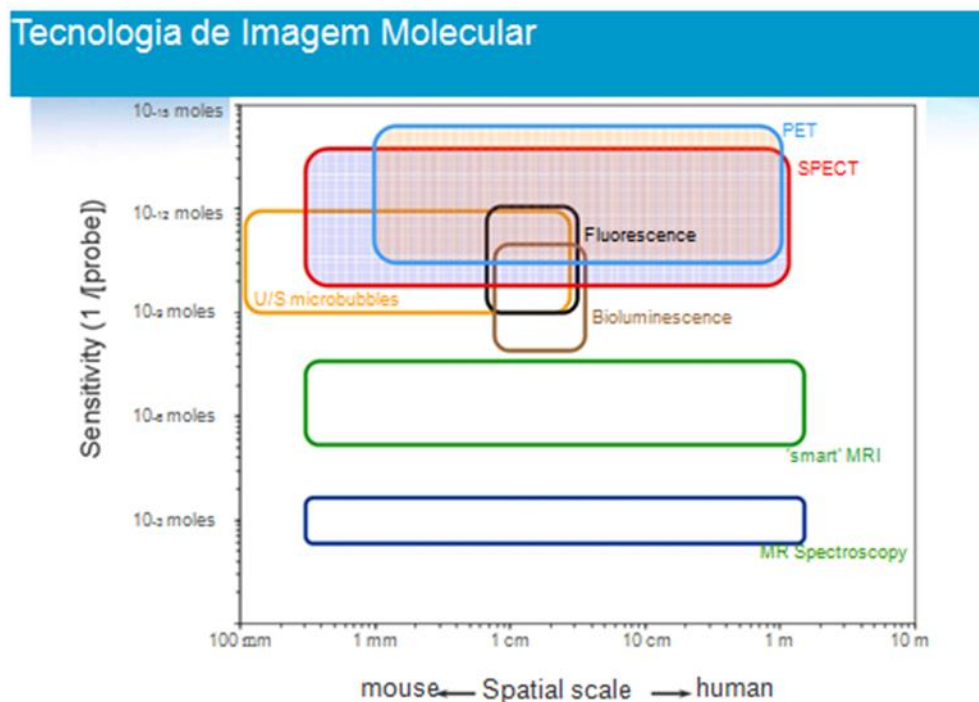
O radiofármaco mais comumente usado na imagem SPECT para imagens de mama é ^{99m}Tc -sestamibi (^{99m}Tc -MIBI). Este radiofármaco é utilizado em Medicina Nuclear para imagens cardíacas. O MIBI entra na célula por difusão passiva do compartimento extracelular para o citoplasma e acumula-se na mitocôndria. A maioria das células malignas tem maior concentração intracelular mitocondrial e, portanto, o MIBI se concentrará no tecido em

proporção àquela atividade (AKTOLUN; BAYHAN; KIR, 1992; CAMPEAU; KRONEMER; SUTHERLAND, 1992; DEL VECCHIO; SALVATORE, 2004; VERCHER-CONEJERO et al., 2015).

Estudos sobre a sensibilidade e a especificidade do MIBI para a detecção de câncer de mama demonstraram uma sensibilidade de 96% na detecção, mas mostraram uma especificidade moderada de 59% (BREM et al., 2008; VERCHER-CONEJERO et al., 2015).

Os métodos que utilizam radiofármacos apresentam uma sensibilidade de detecção na escala de 10^{-15} moles (Figura 3). De forma geral, significa que ao ser aplicado, somente 10^{-15} moles de um radiofármaco, já é possível a obtenção de uma imagem precisa, ou seja, apresenta alta especificidade. Um outro fator importante é seu escalonamento espacial; por ser um método altamente específico a possibilidade de translacionamento¹ é a maior de todas as técnicas disponíveis.

Figura 3 - Comparação das diversas tecnologias de imagem disponíveis atualmente no mundo e em uso em medicina



Fonte: SANTOS-OLIVEIRA, 2016.

¹ N.A: Translacionar: que visa agilizar a transferência de resultados de pesquisa básica para pesquisas clínicas, a fim de produzir benefícios para a comunidade como um todo.

Mister se faz ressaltar, que quando essa figura é projetada para nanorradiofármacos a escala de sensibilidade pode alcançar valores de referência na escala de 10^{-19} a 10^{-22} , devido a permeabilidade, biodirecionamento e efetividade dos radiofármacos em escala nano. Colocando esses medicamentos em um patamar de superioridade inalcançável por qualquer outra técnica disponível no mundo atualmente.

Portanto, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de uma tecnologia específica, sensível e confiável que permita a realização do diagnóstico precoce e preciso.

Nos últimos anos o desenvolvimento de novas abordagens, tanto terapêuticas como diagnósticas, tem se intensificado com o objetivo de um diagnóstico precoce e um tratamento mais específico às células cancerígenas e menores danos às células normais. Neste perfil, encontram-se anticorpos monoclonais e a nanotecnologia como uma ferramenta significativa no arsenal terapêutico no combate ao câncer (CHOI; KWAK; PARK, 2010; CORDEIRO et al., 2014).

1.3.4 Tratamento

As estratégias na abordagem do tratamento do câncer devem considerar a histologia, estadiamento, localização anatômica do tumor e as condições gerais do paciente, podendo ser realizado a remoção cirúrgica do tumor, a quimioterapia, a radioterapia, terapia hormonal, terapia imune e terapia alvo (drogas que interferem especificamente com o crescimento de células cancerígenas). A maior acuidade na caracterização histológica e molecular do câncer de mama, com a utilização sistemática de marcadores moleculares com valor preditivo de resposta ao tratamento, tem permitido maior adequação e individualização terapêutica. Atualmente, é obrigatória a caracterização dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2 no câncer de mama para direcionamento da terapêutica (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; BARTELINK, 2016; BUSTAMANTE et al., 2009; INOUE; FRY, 2016; MACMILLAN; MCCULLEY, 2016; NAHAS et al., 2015; SELLI; DIXON; SIMS, 2016).

Embora ainda tenham um papel significativo no tratamento do câncer, a quimioterapia e radioterapia têm baixo índice de especificidade, além de provocar extensa destruição celular comprometendo as células normais e provocando uma série de efeitos colaterais, afetando negativamente o paciente (BUSTAMANTE et al., 2009; CORDEIRO et al., 2014; SCHÖNECKER et al., 2016; SHI et al., 2016).

O crescimento tumoral é acompanhado de ativa vascularização, porém, o fornecimento de sangue para os tumores é desorganizado e ineficiente, dificultando a eficácia do tratamento, devido à dificuldade de acesso dos agentes terapêuticos ao alvo, o que implica em aumento da dose administrada, provocando níveis tóxicos para o paciente (BUSTAMANTE et al., 2009; DI LEO et al., 2015; PIRANDA; FREITAS-ALVES; VIANNA-JORGE, 2013).

A hormonioterapia raramente pode ser utilizada como método isolado de tratamento, e na maioria das vezes ela é associada com outras modalidades terapêuticas. Em relação ao câncer de mama, modalidades terapêuticas clássicas compreendem a cirúrgica e a radioterapia para o tratamento loco regional, e a hormonioterapia e a quimioterapia para o tratamento sistêmico. A hormonioterapia tradicionalmente é recomendada para pacientes com receptores hormonais positivos (estrógeno, progesterona ou ambos), sendo indicado o uso regular por 2 ou 5 anos para todas as pacientes na pré ou pós menopausa com receptor hormonal positivo, com ou sem radioterapia associada (MACMILLAN; MCCULLEY, 2016; NAHAS et al., 2015).

O TZB tem sido recentemente utilizado como “terapia-alvo” para tumores localmente avançados juntamente com a quimioterapia neoadjuvante, bem como para o controle da doença, trata-se de um anticorpo cuja atração pelo receptor HER2 positivo provoca a involução dos tumores, prolongando a sobrevida e melhorando qualidade de vida por meio da redução dos sintomas e complicações do tratamento (NAHAS et al., 2015; SELLI; DIXON; SIMS, 2016).

1.4 Anticorpos Monoclonais

1.4.1 Anticorpos

Os anticorpos são moléculas glicoproteicas que se originam nas células B e circulam através do sangue e da linfa. Eles detectam, localizam, reconhecem, ligam-se e inativam ou iniciam o processo de eliminação de um antígeno. Cada molécula de anticorpo possui uma estrutura única, o que permite sua ligação específica ao seu antígeno correspondente. Todos apresentam a mesma estrutura geral, pertencendo à família das imunoglobulinas (Ig). As Igs

são agrupadas em cinco classes, de acordo com a estrutura das suas cadeias pesadas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (WEINER; SURANA; WANG, 2010).

A especificidade da ligação dos anticorpos aos antígenos ocorre pela diversidade nas sequências de aminoácidos da região variável das cadeias leves e das cadeias pesadas. Existem três sub-regiões denominadas de hipervariáveis em cada região variável, correspondentes às zonas da proteína que entram em contato com o antígeno, denominadas *Complementarity Determining Region* (CDR, em português, Regiões Determinantes de Complementaridade). Na estrutura tridimensional da imunoglobulina as seis regiões hipervariáveis encontram-se próximas, permitindo a formação do local de ligação do antígeno. A ligação é feita por ligações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals ou forças hidrofóbicas (WEINER; SURANA; WANG, 2010).

O processo de formação de anticorpos em resposta à presença do antígeno resulta na produção de moléculas de alta afinidade, com capacidade de distinção entre espécies de moléculas semelhantes. Geralmente o antígeno é apenas reconhecido numa pequena região, denominada de determinante antigênico ou epitopo e vai ligar-se num sítio da imunoglobulina denominado de paratopo (SCHROEDER; CAVACINI, 2010; YANG et al., 2017).

1.4.2 Estrutura

Os anticorpos são glicoproteínas formados por cadeias pesadas e leves. As cadeias pesadas formam uma estrutura em forma de “Y”, com as duas cadeias leves posicionando-se em paralelo à porção aberta das cadeias. A estrutura do anticorpo é composta por quatro cadeias de polipeptídeos, sendo duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas, unidas por pontes dissulfeto (Figura 4). Nos seres humanos, existem dois tipos de cadeias leves (κ e λ) e cinco tipos de cadeias pesadas de Ig (α , δ , ϵ , γ , e μ).

As cadeias leves possuem um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL), enquanto as cadeias pesadas possuem um domínio variável (VH) e 3 domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). As regiões associadas com a ligação ao antígeno, Fragment Antigen Binding (Fab, em português, Fragmentos Ligadores de Antígeno), incluem os domínios VL, CL, VH e CH1, enquanto a porção Fc (fração cristalizável) do anticorpo inclui os domínios CH2 e CH3 (SCHROEDER; CAVACINI, 2010; WANG, W.; WANG, E.; BALTHASAR, 2008).

uma aplicação ubiqüitária na clínica médica (GHAEMIMANESH et al., 2015; KATZUNG, 2005; KIM et al., 2016).

Após 30 anos de desenvolvimento, a terapia com MoAbs começa a ser tornar uma realidade. O uso de MoAb é mais difundido no campo da oncologia, onde metade dos agentes aprovados para uso clínico de rotina são utilizados, e um grande número de moléculas encontra-se atualmente em ensaios clínicos, tais como: tositumomabe, bevacizumabe, cetuximabe, alemtuzumabe e gemtuzumabe-ozogamicin (LIGIÉRO et al., 2013; STERN; HERRMANN, 2005).

São utilizados no diagnóstico de algumas patologias devido a sua característica de reconhecimento do processo fisiopatológico, evitando com isso, procedimentos invasivos, iniciando-se uma conduta terapêutica adequada a cada indivíduo e monitoramento da terapia (CORDEIRO et al., 2014; LIGIÉRO et al., 2016; NORTH et al., 2017).

Os MoAbs apresentam características terapêuticas como: a) maior tolerância ao tratamento; b) longa meia-vida plasmática; iii) elevada especificidade; c) limitados efeitos adversos (FEKETE et al., 2013). Podem ser aplicados intactos ou acoplados a outra molécula, por exemplo, um elemento radioativo, como o ^{131}I (Iodo-131), este com o objetivo de destruir células alvo (LIGIÉRO et al., 2013, 2016; SARCINELLI et al., 2016; THAKUR; WOZNIK, 2017).

Os MoAbs têm a capacidade de se ligar, especificamente, e com grande afinidade às células tumorais primárias e metastáticas e criar um efeito antitumoral pelo efeito CDC (Citólise Dependente de Complemento). Além disso, pode também aumentar a citotoxicidade que seja pela ligação do anticorpo a toxinas celulares, quer seja pelo acoplamento a elementos radioativos (radionuclídeos como Iodo-131, Iodo-123 entre outros) (BASS et al., 2017; CHIAVENNA; JAWORSKI; VENDRELL, 2017).

Devido à possibilidade de manipulação dos genes das imunoglobulinas (Ig) foram desenvolvidos uma variedade grande de MoAbs humanizados e quiméricos, como alvos terapêuticos (LIGIÉRO et al., 2016). Nesse contexto, foi aprovado pelas agências regulatórias cerca de 34 MoAbs, sendo destes, 13 aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, em português, Administração de Alimentos e Medicamentos), nos EUA, e pela *European Medicines Evaluation Agency* (EMEA, em português, Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos), Europa (LIGIÉRO et al., 2016).

Embora possam ser utilizados como agentes únicos, os MoAbs produzem resultados melhores quando associados à quimioterapia devido ao sinergismo independente do fármaco.

Além disso, eles são efetivos tanto no tratamento da doença avançada quanto na adjuvância e sua ação depende da intensidade da expressão do antígeno (LIGIÉRO et al., 2016).

A origem e a finalidade do MoAb são identificadas pelo seu nome. Assim o sufixo – mabe é utilizado para a identificação de anticorpos monoclonais e seus fragmentos. A fonte animal a partir do qual o anticorpo foi produzido é reconhecida pelos infixos colocados previamente ao – mabe, conforme descrito:

- u = humano;
- o = camundongo;
- a = rato;
- zu = humanizado;
- e = *hamster*;
- i = primata;
- xi = quimérico;
- axo = rato/camundongo;
- xizu = combinação de humanizado e quimérico.

Além disso, pode-se identificar a doença ou alvo do anticorpo, por exemplo, -vir = viral; -bac = bacteriano; -lim ou -li = imunomodulador; -les = lesões infecciosas; -cir = cardiovascular e -tu = tumor (LIGIÉRO et al., 2013; SWAMINATHAN; RIMINTON, 2006).

Nos casos com conjugação com toxinas, o infixo tox, pode ser adicionado ao nome do anticorpo e quando conjugado com substâncias radioativas, o símbolo do elemento conjugado e o número do isótopo são acrescentados ao nome do anticorpo, como nos exemplos: “^{99m}Tc-biciromabe”. Portanto, o Rituximabe, por exemplo, significa anticorpo monoclonal (Rituximabe) quimérico (Rituximabe) direcionado ao tratamento de tumores (Rituximabe) (LIGIÉRO et al., 2013; SWAMINATHAN; RIMINTON, 2006).

1.5 Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER2)

O primeiro grande avanço em busca da terapia individualizada do câncer de mama foi a possibilidade de identificação de receptor de estrógeno (RE) e de receptor de progesterona (RP). Os tumores positivos para RE (RE+), cujo crescimento depende de estímulo hormonal, são eficazmente tratados com terapia antiestrogênio, seja pelo uso de antagonistas do RE, como o tamoxifeno, ou pela inibição da síntese endógena, com inibidores da aromatase, tais

como: anastrozol e letrozol. Outro marcador tumoral bem caracterizado é o receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER2). O HER2 foi identificado como um marcador de pior prognóstico e de maior agressividade do câncer (FISZMAN; JASNIS, 2011; VU; CLARET, 2012).

O gene HER2/neu (receptor de fator de crescimento epidérmico humano, também conhecido como ErbB2) está localizado no cromossoma 17 (17q21) e codifica uma glicoproteína transmembrana de 185 kDa com atividade tirosina quinase que tem funções de receptor de fator de crescimento, estando envolvido na diferenciação, adesão e mobilidade celulares (GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007).

O receptor celular ErbB2 é membro da família de *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR, em português, Receptor de Fator de Crescimento Epidermal) ou ErbB. Esta família de proteínas consiste de quatro grupos de receptores: HER1/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 e HER4/ErbB4. Esta família de receptores localiza-se na membrana plasmática celular e cada um deles está composto por um domínio extracelular (rico em cisteína) e um domínio intracelular catalítico que constitui o segmento carboxiterminal com atividade tirosina quinase (exceto HER3), susceptível de ser fosforilado por degradação do ATP e de transmitir um sinal até o interior da célula através de cascatas de sinalização (GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007).

Os receptores ErbB são expressos em diversos tecidos de origem epitelial, mesenquimal e neuronal. Esta estrutura permite que os sinais sejam transmitidos através da membrana plasmática, onde induzirão a expressão gênica, gerando respostas celulares, tais como a proliferação (DOKMANOVIC; WU, 2014; GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007; KAZEMI et al., 2011; LOI et al., 2011; NAHTA; ESTEVA, 2006; WYMANT et al., 2016).

O gene HER2/neu está amplificado a baixos níveis em muitos tecidos normais, incluindo o tecido mamário, e acredita-se que regula o crescimento, a diferenciação e a morte celular (GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007; WYMANT et al., 2016).

Este gene é amplificado e/ou superexpresso entre 25% e 30% dos casos de câncer de mama feminino, os quais, geralmente, são severos, possuem um mau prognóstico e baixa taxa de sobrevivência das pacientes. A superexpressão de HER2 também foi demonstrada no câncer colo retal, ovário, adenocarcinoma do pâncreas e cânceres gástricos e salivares (ADAMCZYK; GRELA-WOJEWODA; DOMAGAŁA-HADUCH, 2017; GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007; KAZEMI et al., 2011; LOI et al., 2011; NAHTA; ESTEVA, 2006).

Estima-se que as células epiteliais normais têm entre 20.000 e 50.000 receptores HER2/neu de membrana, enquanto que as células tumorais em câncer de mama que

superexpressam o HER2/neu podem chegar a ter até 2 milhões de receptores em sua membrana (GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007).

1.6 Trastuzumabe

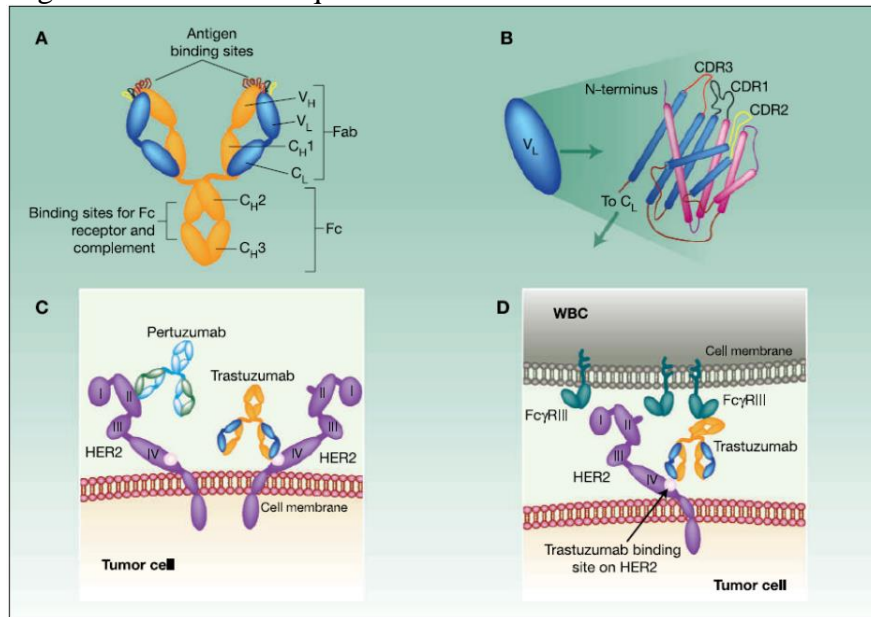
O Trastuzumabe (Herceptin®) foi o primeiro MoAb, clinicamente aprovado, em 1998 para o tratamento de câncer de mama positivo para superexpressão de HER2/neu (GENENTECH, 2016).

O TZB é constituído de um anticorpo monoclonal humanizado derivado da tecnologia do DNA recombinante que atinge seletivamente o domínio extracelular da proteína do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2); tem uma vida média de até 12 dias (POHLMANN; MAYER; MERNAUGH, 2009; WONG; HURVITZ, 2014).

1.6.1 Mecanismo de ação do Trastuzumabe

O TZB se liga com elevada afinidade e especificidade ao subdomínio IV, uma região justamembranar do domínio extracelular do HER2/neu. Após sua ligação o TZB origina a internalização do receptor, e facilita sua degradação endocítica. Adicionalmente, é um mediador potente da citotoxicidade mediada por anticorpos. Ele apresenta uma ação de supressão da angiogênese dada pela inibição da formação de heterodímeros HER2/HER3 e HER2/HER4, ao reprimir as vias de sinalização pró-angiogênicas Ras-Raf-MAK-MAPK e PI3K/AKT. O bloqueio destas vias resulta numa acumulação de p27Kip1, um inibidor de quinases dependente de ciclina, que interrompe o ciclo celular na fase G1/S, induzindo a apoptose (Figura 5, a seguir) (ADAMCZYK; GRELA-WOJEWODA; DOMAGAŁA-HADUCH, 2017; GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007; HUBALEK et al., 2010; LOI et al., 2011; NAHTA; ESTEVA, 2006; POHLMANN; MAYER; MERNAUGH, 2009).

Figura 5 - Estrutura esquemática do Trastuzumabe



Legenda: Estrutura esquemática do TZB. A: Esquema de TZB. As porções Fab e Fc de IgG1. CH1 a CH3 indicam os domínios constantes da cadeia pesada 1 a 3, enquanto que CL indica o domínio constante da cadeia leve. VH e VL indicam cadeia pesada variável e cadeia leve variável, respectivamente. B: Modelo estrutural de IgG1 humano, região VL. As regiões 1 a 3 de determinação da complementaridade representadas em preto, amarelo e vermelho são também conhecidas como regiões hipervariáveis. As regiões determinantes de complementaridade a partir de cadeia pesada variável e de cadeias leves variáveis estão alinhadas e formam uma superfície que complementa a estrutura do antígeno tridimensional. Os dois conjuntos de seis loops de região determinantes de complementaridade nos locais de ligação ao antígeno são os únicos componentes murinos de um anticorpo humanizado tal como TZB. C: A função relacionada com Fab do TZB resulta da sua ligação ao domínio IV de HER2. HER2 indica o EGFR humano 2 (em púrpura). O pertuzumabe, outro anticorpo monoclonal anti-HER2 humanizado, liga-se a um epítipo presente no domínio II de HER2. D: As funções relacionadas com a região Fc do TZB resultam da ligação da sua porção Fc a outras células que expressam receptores Fc, tais como células imunes, hepatócitos e células endoteliais. A região Fc do TZB pode ligar-se ao receptor Fc γ III (RIII) presente na superfície das células efectoras do sistema imunitário e desencadear a morte das células tumorais via *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC, em português, Citotoxicidade Celular Dependente do Anticorpo) (BAROK et al., 2007). WBC indica glóbulos brancos.

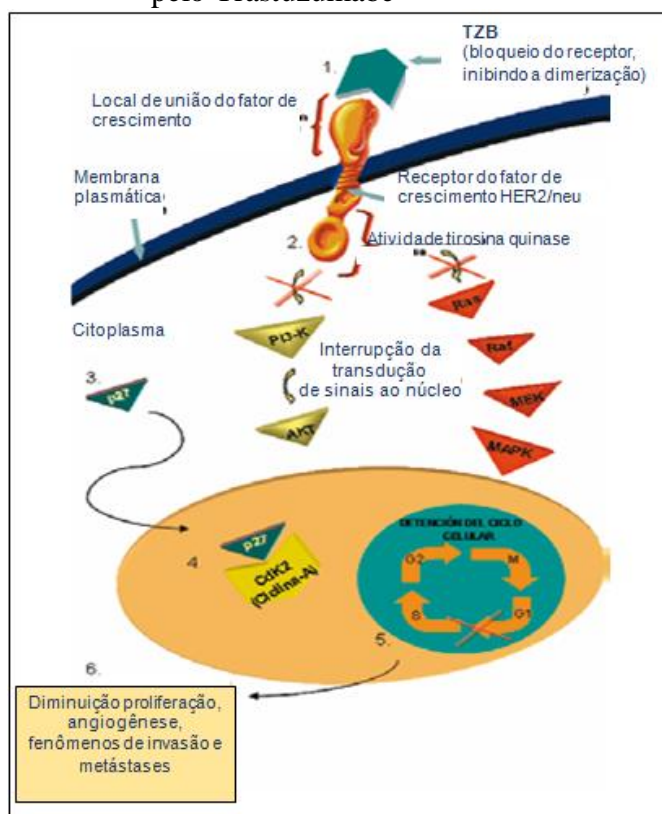
Fonte: POHLMANN; MAYER; MERNAUGH, 2009.

A supressão das vias de sinalização impede a fosforilação da Kinase Inibitor Protein (Kip, em português, Proteína Inibidora Quinase), p27Kip1, que é, então, internalizada no núcleo da célula; onde se une e inibe a atividade do complexo Cyclin-Depent Kinase (CDK, em português, Ciclina Dependente de Quinase) CDK2-Ciclina-A (controlador e protetor do ciclo celular) e forma o novo complexo p27/CDK2-Ciclina-A, que bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G1 e, portanto, a divisão celular, resultando na inibição da proliferação

de células tumorais humanas com superexpressão do HER2 (Figura 6) (ADAMCZYK; GRELA-WOJEWODA; DOMAGAŁA-HADUCH, 2017; BAILEY et al., 2011; BRIX; CLEMMENSEN; KALLUNKI, 2014; FISZMAN; JASNIS, 2011; GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007; LOI et al., 2011; VU; CLARET, 2012).

O tratamento com TZB aumenta a localização membranar e a atividade do PTEN², um supressor tumoral, reduzindo a fosforilação deste. Quando presente na membrana plasmática, o PTEN desfosforila os produtos lipídicos de PI3K, impedindo a ativação dos principais alvos de PI3K, incluindo AKT (HUBALEK et al., 2010; VU; CLARET, 2012).

Figura 6 – Bloqueio das vias de transdução de sinal pelo Trastuzumabe



Nota: 1–Bloqueio da proteína HER2/neu por ligação ao Trastuzumabe. 2–Bloqueio da atividade tirosina quinase (Interrupção da transdução de sinais ao núcleo). 3–Ausência de fosforilação da proteína p27Kip1 que se internaliza no núcleo da célula. 4–Formação do novo complexo p27/CDK2-Ciclina-A. 5–Detenção do ciclo celular na fase G1 pelo complexo p27/CDK2-Ciclina-A. 6–Diminuição dos fenômenos de invasão e metástases.

Fonte: Adaptação de GONZÁLEZ NIÑO et al., 2007.

² N.A: PTEN significa em inglês: phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 e ele funciona como um regulador negativo da sinalização de PI3K/AKT.

Adicionalmente, o TZB é um mediador potente da citotoxicidade mediada por anticorpos. *in vitro*, a ação do TZB é exercida preferencialmente nas células neoplásicas com superexpressão do HER2, quando comparado com células neoplásicas que não apresentam superexpressão do HER2. Este anticorpo induz uma resposta imune contra a proteína HER2 uma vez que após se ligar a esta proteína vai também ligar-se aos receptores das células efectoras (macrófagos, células NK, eosinófilos), que vão destruir a proteína HER2 por citotoxicidade. O TZB provoca apoptose celular em pacientes com câncer de mama e parece reduzir a angiogênese. Pode ainda proporcionar um benefício clínico adicional através do aumento da taxa de conservação da mama, reduzindo a taxa de metástases distantes, e aumentando a probabilidade de obtenção de uma resposta completa (NAHTA, 2012).

Quando há superexpressão, o receptor HER2 sofre uma clivagem proteolítica, havendo consequentemente liberação da porção extracelular deste receptor, formando-se um fragmento de HER2 truncado. O tratamento com TZB permite a inibição desta clivagem proteolítica, impedindo, desta forma, a produção de um fragmento truncado, p95HER2, que impediria a ligação do TZB ao receptor (HUBALEK et al., 2010).

1.6.2 Mecanismo de resistência ao Trastuzumabe

Um dos desafios no tratamento de pacientes com câncer de mama com TZB é a compreensão da resistência ao fármaco. Na última década, vários ensaios foram realizados para compreender o mecanismo da resistência ao TZB com ou sem fármacos suplementares (POHLMANN; MAYER; MERNAUGH, 2009).

1.6.2.1 Ativação de vias alternativas

O IGF-IR (receptor do fator de crescimento-1 insulina-like) é uma tirosina quinase transmembranar associada à proliferação celular e à capacidade de provocar metástase. O aumento da expressão do IGF-IR está relacionado com a diminuição da atividade antiproliferativa do TZB. Células mamárias cancerosas que superexpressam IGF-IR são resistentes ao TZB. Em modelo experimental observa-se a presença de heterodímeros IGF-

IR/HER2 em células resistentes ao TZB, levando à fosforilação do HER2, o que não ocorre em células sensíveis ao TZB. A inibição da atividade de tirosina de IGF-IR reduz a fosforilação do HER2 em células resistentes ao TZB. O ligante IGF tem capacidade de ativar, de maneira mais rápida, as vias de sinalização intracelular do PI3K e MAPK em células resistentes. A redução da expressão do p27kip1 foi associada à incapacidade do TZB bloquear o ciclo celular. O tratamento com inibidores da sinalização do IGF-IR ou indutores do p27kip1 foram capazes de restaurar a sensibilidade ao TZB. Estes dados sugerem que a redução da atividade do p27kip1 está associada à resistência ao TZB, possivelmente mediada pela heterodimerização do IGF-IR com o HER2. O IGF-IR pode ser visto então como importante alvo terapêutico em pacientes que apresentam resistência ao TZB (HUBALEK et al., 2010; POHLMANN; MAYER; MERNAUGH; 2009; VU; CLARET, 2012).

1.6.2.2 Perda do PTEN

A perda da função do PTEN ocorre em aproximadamente 50% de todos os cânceres de mama. A inibição da expressão de PTEN resulta em resistência ao TZB *in vitro* e *in vivo*. O PTEN é um supressor tumoral e inibe a capacidade do PI3K ativar AKT, ocorrendo apoptose. Assim, pacientes com câncer de mama que apresentam uma deficiência em PTEN têm respostas significativamente mais baixas à terapia com TZB do que aqueles que têm PTEN normal. O tratamento destas células com inibidores do PI3K foi capaz de reverter a resistência ao TZB (POHLMANN; MAYER; MERNAUGH; 2009; VU; CLARET, 2012).

1.6.2.3 Sinalização mediada por outros receptores da família EGFR

Dos quatro membros da família EGFR, o HER2 é o único sem ligante conhecido. A heterodimerização do HER2 com outros receptores pode, no entanto, ser induzida por ligantes de HER1, HER3 e HER4. Na presença de excesso destes ligantes, os heterodímeros formados conduzem à ativação da sinalização intracelular via MAPK e PI3K. O TGF α , um ligante do receptor HER1, pode ter papel importante nesta via de resistência (HUBALEK et al., 2010; POHLMANN; MAYER; MERNAUGH; 2009).

1.6.2.4 Bloqueio da interação receptor/anticorpo

Um mecanismo potencial de resistência associado a tratamentos com anticorpos é o desenvolvimento de mecanismos que interferem na ligação do agente terapêutico com o seu alvo proteico. A expressão da glicoproteína associada à membrana MUC4³, mucina capaz de mascarar proteínas transmembranares, encontra-se elevada em células resistentes ao TZB, e o seu nível relaciona-se inversamente com a capacidade de ligação do TZB a estas células. A indução da superexpressão do MUC4 leva ao bloqueio da ligação do HER2 com o anticorpo específico. Assim, é sugerido que a MUC4 contribua para a evolução do câncer, devido à sua capacidade de inibir o reconhecimento imunitário de células cancerosas, promovendo a progressão tumoral e suprimindo a apoptose (VU; CLARET, 2012).

1.6.2.5 Truncamento do receptor HER2

O receptor HER2 pode ser truncado, como resultado de uma clivagem proteolítica do domínio extracelular de HER2, podendo produzir de um fragmento truncado, p95. O fragmento p95 potencializa o crescimento de células tumorais, pois mantém a atividade quinase e relaciona-se com pior prognóstico em pacientes com câncer de mama HER2 positivo. Esta forma truncada do HER2 não permite a ligação do TZB, e a sua expressão tem sido associada à resistência do TZB (GAJRIA; CHANDARLAPATY, 2011).

1.6.3 Toxicidade do Trastuzumabe

Foi demonstrado que a utilização do TZB na adjuvância⁴ aumenta a sobrevida livre de doença em 50% dos casos, com uma redução da taxa de mortalidade em torno de 33%. Na

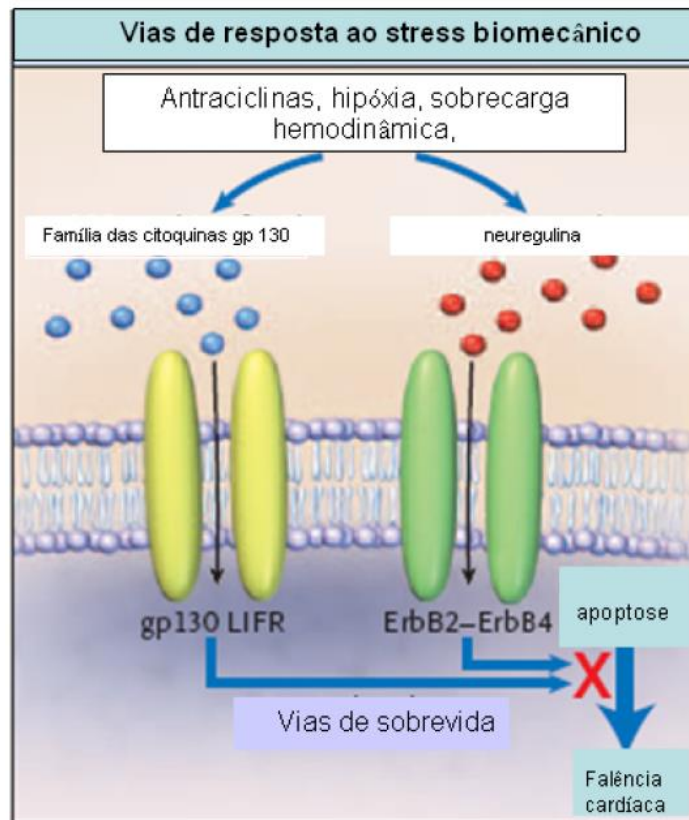
³ N.A: MUC4 é um subtipo de mucina capaz de mascarar proteínas transmembranares.

⁴ N.A: Adjuvância: tratamento realizado após a cirurgia para destruir as células cancerígenas remanescentes. O tratamento neo-adjuvante é o tratamento realizado pré-cirurgia para destruir células cancerígenas e diminuir o foco tumoral.

neoadjuvância, sua taxa de resposta completa foi de 66%, sendo claramente superior aos 25% encontrados somente quando é realizada a cirurgia (PICCART-GEBHART et al., 2005).

Apesar dos benefícios clínicos comprovados, foi observado em estudos clínicos que a administração do TZB, isolado, sequencial ou em combinação com quimioterapia, pode acarretar dano cardíaco, com redução da contratilidade do ventrículo esquerdo, habitualmente reversível com a suspensão do medicamento. Não há documentação de lesão da célula miocárdica, como por exemplo, ocorre com a ação da antraciclina no músculo cardíaco (SANCHEZ; SILVA, 2010).

Figura 7 – Via proposta de toxicidade cardíaca induzida pelo Trastuzumabe



Fonte: CHIEN, 2006.

A disfunção cardíaca induzida pelo TZB parece ser devida, principalmente, à inibição da sinalização de ErbB2 dos cardiomiócitos, associada a alterações na expressão das proteínas BCL-X, com depleção de ATP e consequente disfunção contrátil, sem, entretanto, acarretar alterações na estrutura celular. É uma situação em que a disfunção cardíaca não encontra correlação com lesões nas células miocárdicas, tendo somente repercussão funcional e não morfológica. A inibição da sinalização da via intracelular mediada por ErbB2, pela ação do

TZB, impede a resposta normal dos cardiomiócitos aos fatores de sobrecarga cardíaca, interferindo nas vias das citocinas gp130 e da neuregulina, e desregulando os mecanismos de manutenção da viabilidade miocárdica, permitindo assim a instalação da disfunção cardíaca (Figura 7) (CHIEN, 2006; SANCHES; SILVA, 2010).

Habitualmente, em resposta à injúria miocárdica determinada por fatores como uso de antraciclinas, hipóxia ou sobrecarga hemodinâmica, há ativação de vias de manutenção da sobrevivência/hipertrofia das células miocárdicas. Com a inibição de ErbB2 pelo TZB, há o bloqueio dessa via e a indução de apoptose, determinando a falência cardíaca (CHIEN, 2006).

A disfunção cardíaca determinada pelo TZB é, na maioria das vezes, atenuada ou revertida com a suspensão do agente. O tempo médio para a recuperação é de cerca de um mês e meio, independentemente do tratamento de suporte cardíaco (NAHTA; ESTEVA, 2003; SANCHES; SILVA, 2010).

O TZB apresenta ainda outros efeitos adversos, dentre esses os mais comuns, ou seja, aqueles que são relatados por mais de 10% dos pacientes, destacam-se a diarreia, náuseas e vômito (HERCEPTIN, 2016).

1.7 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma nova área de investigação que incide sobre a influência da matéria em níveis atômico e molecular. A nanomedicina tornou-se um dos principais ramos da investigação nanotecnológica, revolucionando o campo da medicina onde nanopartículas com dimensões entre 1 e 100 nm são concebidas e utilizadas com fins terapêuticos e diagnósticos, em oncologia, neurologia e cardiologia. O objetivo geral da nanomedicina é realizar o diagnóstico preciso e precoce, realizar um tratamento eficaz com o mínimo de efeitos adversos e avaliar a eficácia do tratamento de forma não invasiva. Os nanomateriais apresentam alta eficiência na destruição de células cancerosas e já estão passando por ensaios clínicos. Os resultados são tão promissores que os nanomateriais podem se tornar uma alternativa à terapia tradicional do câncer, sendo direcionadas a alvos específicos, usados tanto no diagnóstico como na terapia (ALAM et al., 2015; BOMBARDIERI et al., 2010; GAMMON; DOLD; JEWELL, 2016; GLASGOW; CHOUGULE, 2015; SURENDIRAN et al., 2009; ZDROJEWICZ et al., 2015).

Recentemente, nanopartículas tais como dendrímeros, lipossomas, nanotubos, nanoemulsões, *quantum dots* (QDs), ouro coloidal, nanomicelas poliméricas e magnetita, foram desenvolvidos como agentes de imagem para biomarcadores alvo, como anticorpos monoclonais, aptâmeros, peptídeos; devido às suas propriedades funcionais e estruturais que não estão disponíveis em qualquer molécula; utilizando os benefícios de seu direcionamento e minimizando seus efeitos adversos (AZIZ et al., 2017; POHLAND et al., 2017).

A aplicação de nanotecnologia na área de saúde engloba três principais áreas: a) diagnóstico e terapia; b) biosensores; c) ferramentas cirúrgicas. A administração ao paciente pode ser realizada por diversas vias, como, tópica, oral, parental, pulmonar, implante cirúrgico entre outras (DUNCAN; GASPAR, 2011).

A conjugação de sistemas nanoestruturados a agentes diagnósticos e terapêuticos (nanofármacos) em oncologia, permite o controle do tamanho da partícula, bem como da sua constituição química e características físicas e biológicas, de modo a conseguir um transporte eficiente e uma distribuição mais seletiva (alvo-específica) do fármaco, superando as limitações encontradas nos tratamentos convencionais. Portanto, nas preparações de nanocarreadores devem ser considerados: o diâmetro médio, propriedades intrínsecas do fármaco, carga/características da superfície do nanocarreador, biocompatibilidade, biodistribuição, toxicidade e possível indução de reações imunológicas (ALAM et al., 2015; LIGIÉRO et al., 2016; NIE, 2010; SA et al., 2012; SURENDIRAN et al., 2009; ZDROJEWICZ et al., 2015).

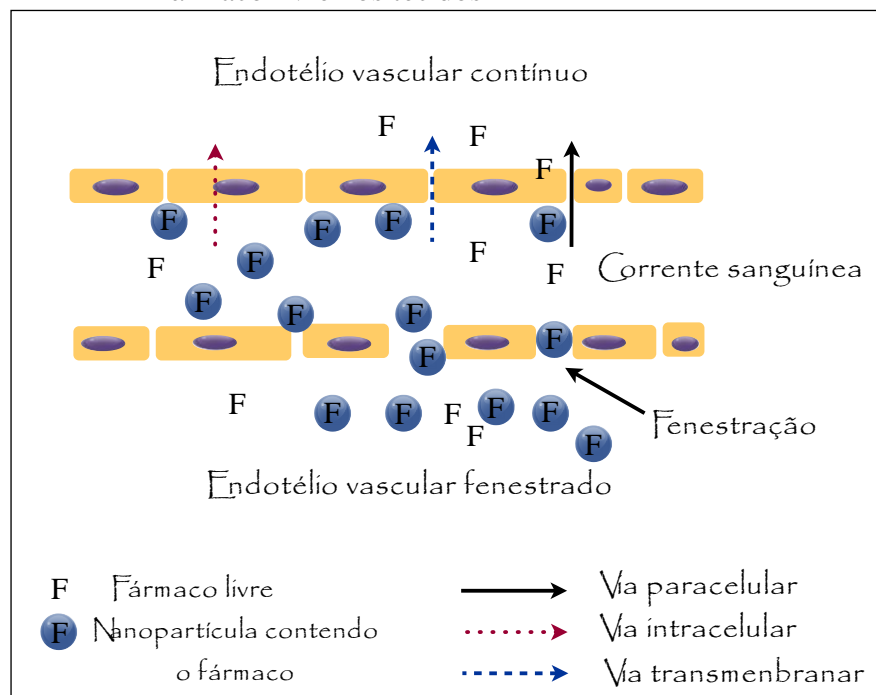
Os nanofármacos tem sua distribuição dependente da anatomia e fisiologia do organismo. Devido ao seu tamanho, ainda que diminuto, após administração, não conseguem seguir a rota paracelular, pois esse espaçamento é menor que 2nm. A rota alternativa é por dentro das células endoteliais, conhecido como transcitose. No entanto, esse processo também é dependente do tamanho, em geral, quanto maior a nanoestrutura, mais difícil é sua passagem. Entretanto, em patologias como tumores sólidos e inflamação, o endotélio está defeituoso e fenestrado, permitindo a entrada de estruturas maiores. No caso específico de tumores, a falta de vasos linfáticos funcionais e a maior fenestração (100 a 600nm) nos vasos sanguíneos permitem o acúmulo e a retenção do nanofármaco nessa região (CHO et al., 2008; DING et al., 2016).

As nanopartículas (NP) são absorvidas pelas células de forma mais eficiente que as micromoléculas maiores e, portanto, podem ser utilizadas como sistemas de transporte e entrega eficazes. Nanovetores em comparação com fármacos antitumorais convencionais apresentaram melhores resultados terapêuticos e acúmulo intratumoral aumentado. Sua

eficácia é atribuída ao seu pequeno tamanho, permitindo a penetração das membranas celulares, a estabilização e ligação às proteínas e ao escape da degradação lisossomal (NAOUM et al., 2016).

Além disso, esses nanosistemas mostram: a) acumulação passiva nos locais alvo do tumor por meio do *Enhanced Permeability and Retention* (EPR, em português, Efeito de Permeabilidade e Retenção) aumentado devido a drenagem linfática insuficiente e angiogênese tumoral; b) capacidade de administração dirigida por ligação à receptores celulares específicos quando modificada com um ligante guia, poupando assim os tecidos saudáveis e realçando o índice terapêutico; c) modificação da farmacocinética e da distribuição biológica dos fármacos; d) presença prolongada na corrente sanguínea quando a sua superfície é revestida com molécula de polietilenoglicol (PEG) que ajuda a escapar da fagocitose pelas células do sistema reticuloendotelial (Figura 8) (NAOUM et al., 2016).

Figura 8 – Representação esquemática do efeito de permeabilidade e retenção aumentada das nanopartículas medicinais e fármaco livre nos tecidos



Nota: Tecidos saudáveis são caracterizados pelo endotélio vascular contínuo, impedindo o extravasamento das nanopartículas. Já o fármaco livre (F) é capaz de atingir o compartimento vascular pelas diferentes vias representadas pelas setas. Por outro lado, em tecidos cancerígenos o endotélio vascular é fenestrado permitindo a passagem e retenção das nanopartículas.

Fonte: GAUMET et al., 2008.

No tecido tumoral a taxa de fluxo sanguíneo e a morfologia vascular (arranjo geométrico, diâmetro, comprimento e número de vasos sanguíneos) estão alterados, afetando o movimento de compostos através da vasculatura sanguínea. Os vasos sanguíneos que alimentam o tumor são altamente irregulares, no que tange à sua arquitetura, quando comparados aos dos tecidos normais. Ao contrário dos vasos saudáveis, que apresentam uma ramificação ordenada de grandes vasos para pequenos, alimentando um leito capilar espaçado de forma regular; os vasos tumorais possuem uma distribuição espacial heterogênea e tortuosa conduzindo a espaços avasculares de diversos tamanhos. Não obstante, a estrutura da parede dos vasos sanguíneos, nos tumores, é anormal, possuindo grandes junções interendoteliais, com uma membrana basal excepcionalmente grossa ou fina, um elevado número de poros e canais transendoteliais formados por vesículas, e com um diâmetro de poros na casa das centenas de nanômetros (DING et al., 2016; NIE et al., 2007).

Devido à sua estrutura irregular, as paredes dos vasos são hiperpermeáveis em algumas zonas, embora apresente zonas quase impermeáveis. Finalmente, a proliferação das células tumorais e/ou do estroma, exercem compressão contra as paredes dos vasos, o que pode levar ao seu colapso (DING et al., 2016; NIE et al., 2007).

Os nanofármacos, quando ainda na circulação sanguínea, podem ser cobertos por proteínas do soro, como anticorpos e fatores do sistema complemento, que atuam como opsoninas. Tal fato facilita a ligação dos nanofármacos às células fagocíticas, principalmente macrófagos eutrófilos. Como há grande concentração de fagócitos mononucleares nos órgãos pertencentes ao sistema retículo endotelial, principalmente fígado, baço e nódulos linfáticos, essas nanopartículas podem ser retiradas da circulação sanguínea em menos de 5 minutos. Esse processo é dependente de características físico-químicas dos nanocompostos tais como: tamanho, carga e hidrofobicidade. Nanocompostos menores que 200nm conseguem ultrapassar as fenestras entre as células de Kupffer no fígado, com isso são aprisionados nesse órgão com mais facilidade (CHO et al., 2008; DING et al., 2016; GARNETT; KALLINTERI, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Portanto, desenhar e obter estruturas que consigam sobrepujar esses efeitos é tarefa fundamental.

O uso de nanomateriais apresenta diversas aplicações: uso de biomoléculas em áreas como a biotecnologia, terapia genética, transporte de fármacos, imagiologia, biosensores e biomarcadores. Além disso, apresenta vantagens tais como: atingir áreas profundas do organismo, por meio da via endocítica celular e ultrapassando estruturas anatômicas como a barreira hematoencefálica, epitélio da pele, capilares pulmonares e tumores, devido ao EPR;

permitir o encapsulamento de diversas moléculas como proteínas, peptídeos, anticorpos monoclonais e fármacos diversos; permitir o aumento do tempo de circulação, pois não são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear aumentando sua especificidade e disponibilidade no alvo; aumentar sua solubilidade, proteger da degradação biológica intrínseca, aumentar sua biodisponibilidade, especificidade e liberação constante e controlada, entre outros (DING et al., 2016; LÖNDAHL et al., 2017; NIE, 2010; TAGAMI; OZEKI, 2017).

Atingindo o local alvo, as nanopartículas passam por uma biodistribuição, atravessando barreiras epiteliais e dispersando-se por meio do leito vascular. Dessa forma, após administração, o que se observa é: a) pequenas partículas (<20-30 nm) são eliminadas por excreção renal; b) partículas maiores podem ser rapidamente reconhecidas por células do sistema fagocitário mononuclear presentes no fígado, baço e, em menor grau, na medula óssea; c) partículas de 150-300 nm são encontradas principalmente em fígado e baço, enquanto partículas de 30-150 nm são localizadas na medula óssea, coração, rins e estômago (GAUMET et al., 2008).

Embora nanopartículas devam ser menores do que 150 nm para cruzar a barreira endotelial, a literatura relata frequentemente a penetração de partículas maiores que os limites das fenestrações. De fato, as fenestrações e a vasculatura podem sofrer modificações sob várias condições patológicas. Por exemplo, o crescimento tumoral provoca grandes fenestrações do endotélio de 200-780 nm, permitindo a passagem de nanopartículas; o que não acontece em tecidos normais, devido às suas fenestrações estreitas. Essas divergências levam à falta de consenso quanto ao tamanho de nanopartículas para tratamento do câncer (GAUMET et al., 2008; NIE, 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

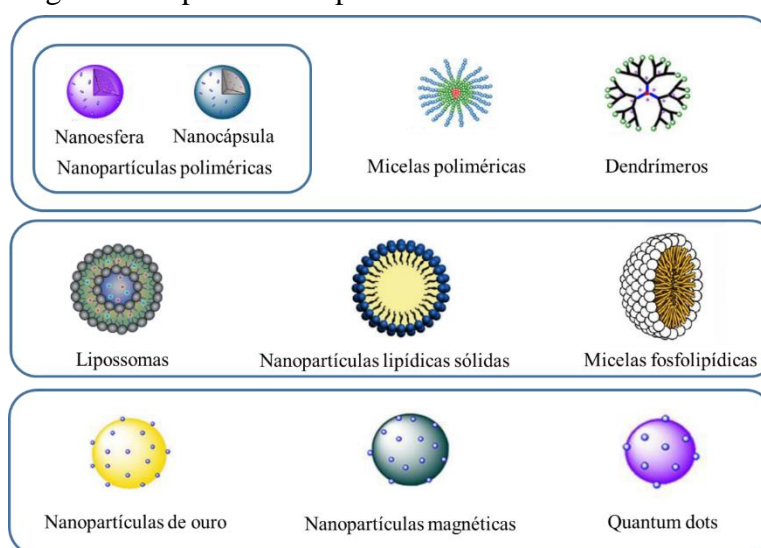
1.7.1 Desenvolvimento de nanocarreadores

De acordo com a sua aplicação diagnóstica ou terapêutica, o desenvolvimento do nanofármaco deve ser otimizado considerando a dosagem provável, a via e frequência de administração; independentemente do seu tipo e/ou aplicação. Nesta fase é primordial o conhecimento de elementos como a sua capacidade de carga, segurança, farmacocinética, destino metabólico, estabilidade e a taxa de liberação do fármaco (CONNIOT et al., 2014; ZHANG, X.; ZHANG, P., 2016).

Vários sistemas são propostos para a utilização em nanomedicina (Figura 9). Estes são designados de acordo com os seus componentes e tipos de material encapsulante (CONNIOT et al., 2014).

É necessário identificar a aplicação específica, vantagem em sua utilização e perfil de segurança. Cada uma das tecnologias deve também ser reproduzível, seus componentes devem estar devidamente validados e apresentarem uma boa relação custo/efetividade para produção em larga escala (CONNIOT et al., 2014; KHALID et al., 2016).

Figura 9 - Tipos de nanopartículas



Fonte: Adaptação de CONNIOT et al., 2014.

1.7.2 Nanopartículas magnéticas

O desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para aplicações em biomedicina vem crescendo nos últimos anos (ARAKI, 2007; TOMA et al., 2015; UCHIYAMA, 2015; UCHIYAMA et al., 2015).

A característica mais singular dos carreadores magnéticos é sua reação a uma força magnética. São injetados na corrente sanguínea e, em seguida, os campos se focam sobre o local alvo. Além disso, estes carreadores atraem atenção devido ao seu potencial como agentes de contraste para imagens de ressonância magnética e agentes fototérmicos (hipertermia) para terapia de câncer (ARRIORTUA et al., 2016; KHODABANDEHLOO; ZAHEDNASAB; HAFEZ, 2016; SIAFAKA et al., 2016; TIETZE; ALEXIOU, 2017).

Um dos sistemas nanoparticulados mais utilizados são as nanopartículas de óxido de ferro. Pertencentes à classe de *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles* (SPIONs, em português, Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Ferro) é alvo de elevado interesse científico devido às inúmeras propriedades que decorrem da formação de domínios magnéticos. Um material é superparamagnético quando exibe magnetização apenas na presença de um campo magnético externo. Assim que este seja retirado, deixa de permanecer magnetizado, anulando qualquer tipo de magnetização residual (BROCHADO, 2013; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ; ESTELRICH; BUSQUETS, 2016).

Entre os diversos materiais ferromagnéticos, as nanopartículas magnéticas à base de óxido de ferro, como magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) destacam-se pela sua disponibilidade, baixo custo, biocompatibilidade, facilidade de preparação e estabilidade e propriedades de ligação versáteis de óxido de ferro, permitindo a ligação controlada de moléculas bioativas nas superfícies das nanopartículas (ARAKI, 2007; BROCHADO, 2013; CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014; TOMA et al., 2015; UCHIYAMA, 2015; UCHIYAMA et al., 2015).

As NPs superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) são compostas tipicamente por um núcleo de partículas magnéticas (usualmente magnetita, Fe_3O_4), revestido por um polímero, como, por exemplo, o dextrano, que lhes confere o diâmetro final de 20-150 nm. Têm normalmente a sua superfície modificada por agentes complexantes de modo a evitar a aglomeração das nanopartículas, a reduzir potencial toxicidade, promover o controle da biodistribuição e aumentar sua estabilidade impedindo que sejam rapidamente depuradas da circulação pelo sistema retículo-endotelial (SRE), propriedades de difusão adequadas através do tecido e o alto nível de acumulação no tecido ou órgão alvo. Neste tipo de nanopartículas é possível o revestimento polimérico dos SPIONs para melhorar a sua biocompatibilidade e estabilidade. As SPIONs são normalmente utilizadas para a formulação de agentes de imagiologia a utilizar em IRM, e a sua propensão para serem fagocitados resulta na visualização das imagens em negativo (BROCHADO, 2013; KHANDHAR et al., 2015; KIM et al., 2009; MAROJA et al., 2012; NALLATHAMBY et al., 2015; PANAGIOTOPOULOS et al., 2015; ZHANG, Y.; KOHLER; ZHANG, M., 2002).

Os parâmetros relacionados a seguir devem ser altamente controlados para que as nanopartículas magnéticas apresentem um bom desempenho (GOLOVINA et al., 2015; MAROJA et al., 2012; PANAGIOTOPOULOS et al., 2015; YAKOH et al., 2015):

Tamanho das partículas: o menor possível, o que produz uma boa difusão tissular, períodos longos de sedimentação e alta área de superfície ativa;

Característica da superfície: fácil encapsulamento das nanopartículas magnéticas, o que as protege de degradação e as dota de biocompatibilidade;

Boa resposta magnética: possibilidade de baixa concentração destas partículas no sangue o que diminui os efeitos colaterais.

1.7.3 Nanopartículas aplicadas a imagem molecular

Diversas técnicas de imagem são utilizadas extensivamente no diagnóstico clínico. Na bioluminescência, os fluoróforos orgânicos não são fotoestáveis e têm baixa intensidade. Da mesma forma, proteínas de fluorescência (isto é, proteína de fluorescência verde) ou bioluminescência, como, luciferina/luciferase) são limitadas, pois não podem ser otimizadas em ensaios multicolores. De modo geral o uso de nanotecnologia, com especial ênfase aos *quantum dots*, ajudam a superar essas limitações. Os *quantum dots* são resistentes ao fotobranqueamento e fotodegradação e degradação química e metabólica. Eles exibem alto rendimento quântico e permitem a identificação simultânea de marcadores múltiplos (NUNE et al., 2009; SAME et al., 2016).

A Ressonância Magnética (RM) é outro exemplo importante de uma técnica que é comumente utilizada em medicina para o exame 3D de eventos biológicos, porém, as aplicações da IRM são limitadas pela baixa sensibilidade a baixas concentrações do agente de imagem. Por estas razões, esforços de pesquisa intensivos visam desenvolver novos agentes de contraste para melhorar a imagem. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro são comprovadamente eficazes no aumento do contraste na imagem magnética (AHN, 2016; NUNE et al., 2009; UCHIYA et al., 2015).

Sondas moleculares orientadas para a visualização de eventos intracelulares a níveis molecular e celular representam um avanço significativo na medicina; não só para uma melhor compreensão dos mecanismos das doenças, mas também para o avanço da entrega orientada de fármacos para as células/tecidos designados. Para abordagens de tratamentos específicos e avaliação da eficiência da terapia, a informação exata sobre o local anatômico do tumor, o microambiente tumoral, e informações mais precisas são fundamentais para o sucesso do delineamento clínico. Nesse contexto, as NPs desempenham um papel significativo, pelas inúmeras vantagens já descritas (SAME et al., 2016; SNEIDER et al., 2017; UCHIYAMA et al., 2015).

Nanopartículas funcionalizadas com vários ligantes são desenvolvidos como carreadores para fármacos, podendo ainda, ser decoradas com agentes direcionadores tais como anticorpos, aptâmeros, peptídeos utilizados para imagens e terapia orientadas; uma abordagem chamada teranóstica.

Para melhorar a eficácia do diagnóstico e terapia orientados, modificações na superfície destas NPs com ligantes específicos e quelantes são etapas fundamentais no desenvolvimento desses nanossistemas em que essas NPs modificadas podem potencialmente exercer uma medicina personalizada. Além disso, as avaliações biológicas *in vitro* e técnicas de imagem médica são utilizadas tanto no tratamento como no diagnóstico em várias doenças. O objetivo final é curar doenças como câncer ou paliativos não invasivos sem interferências cirúrgicas com menor efeito colateral. Entre os vários tipos de agentes de imagiologia molecular com sondas moleculares baseadas em NPs, em particular NPs magnéticas e NPs de ouro, oferecem um potencial significativo para uma imagem e terapia eficazes orientadas por alvo. As propriedades físico-químicas de várias NPs, como, tamanho, morfologia, potencial de superfície e multivalência e suas propriedades óticas únicas têm sido amplamente exploradas para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos avançados para imagens e terapia de diferentes tumores (AHN, 2016; SAME et al., 2016).

1.7.4 Nanotoxicologia

Estudos têm revelado que as mesmas propriedades que tornam as NPs tão únicas, como: tamanho, grande área de superfície, composição química, solubilidade e geometria, também podem ser responsáveis pelo seu potencial risco para a saúde humana. Por exemplo, tamanho e concentração afetam a citotoxicidade dos *quantum dots*, ocorrendo uma relação inversa, quanto menor o tamanho e a concentração, são mais tóxicos. A toxicidade de nanopartículas de ouro varia dependendo da superfície da natureza do revestimento aplicado a NP (LI et al., 2016; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016).

De fato, a toxicidade associada a nanopartículas dependem mais do seu acúmulo em órgãos específicos, pois sua deposição provoca alterações intracelulares que podem afetar a integridade celular e, portanto, a função de órgão (CIAPPELLANO et al., 2016; KANNAN et al., 2014).

A tentativa de controlar e minimizar os efeitos indesejáveis de NPs utilizam abordagens químicas, tais como, a adição de grupos funcionais. Revestimentos PEG são usados para minimizar o reconhecimento não desejado de proteínas endógenas e aumentar a meia-vida de circulação. O PEG também tem sido utilizado para evitar a absorção de nanopartículas por macrófagos do sistema fagocitário mononuclear, outra barreira importante à entrega controlada do nanofármaco (OJER et al., 2015; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016).

Em qualquer caso, uma nanopartícula bio-compatível com sucesso deve exibir baixa toxicidade, uniformidade de tamanho, grande capacidade para cargas diversas, alta rastreabilidade, estabilidade coloidal, ligação e internalização específicas de células seletivas e liberação de carga desencadeada (CIAPPELLANO et al., 2016; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016).

1.8 Radiofármacos e Nanorradiorármacos

1.8.1 Radiofármacos

No final do século XIX, ocorreram algumas descobertas fundamentais nas possibilidades diagnósticas e terapêuticas na medicina e, particularmente, em oncologia. Os radiofármacos começaram a ser utilizados em 1905, após a descoberta em 8 de novembro de 1895 do Raio-X por Wilhelm Conrad Roentgen em seu laboratório, com apresentação pública de sua descoberta em 6 de janeiro de 1896. Em 1886 Henry Becquerel descreveu o fenômeno da radioatividade do urânio, e em 1898, Marie e Pierre Curie descobriram o rádio e polônio. Em 1903, o Prêmio Nobel de Física foi concedido em conjunto a Henry Becquerel e Marie e Pierre Curie pela descoberta da radioatividade. Maria Skłodowska Curie recebeu o Prêmio Nobel de Química de 1911 por sua descoberta de rádio e polônio (EARLY, 1995; KUŁAKOWSKI, 2011).

A descoberta dos raios-X por Roentgen foi fundamental para diagnóstico, permitindo uma avaliação de órgãos internos até então completamente inacessíveis para investigação. Primeiro, tornou-se possível visualizar os ossos, depois, após a introdução de vários meios de contraste (à base de bário e iodo), outros órgãos também podiam ser visualizados: o aparelho

digestivo, vias biliares e vasos sanguíneos. Mesmo agora, a radiologia é uma ferramenta essencial no diagnóstico e, por vezes, no tratamento de diversas doenças (EARLY, 1995; KUŁAKOWSKI, 2011).

O primeiro uso de radionuclídeos em humanos ocorreu em 1927, quando Blumgart e Yens mediram a circulação humana após injeção de uma solução salina exposta ao radônio (BLUMGART; YENS, 1926; LANDA, 1987; SAUBERMANN, 1914; SIMPSON, 1922; TAUSSIG, 1923). Mais tarde, em 1938, estudos como de Hertz, Roberts, Evan sobre a função da tireoide com o uso de ^{131}I (Iodo-131) marcaram o início do uso sistemático dos radionuclídeos na clínica médica (HERTZ; ROBERT; EVANS, 1938).

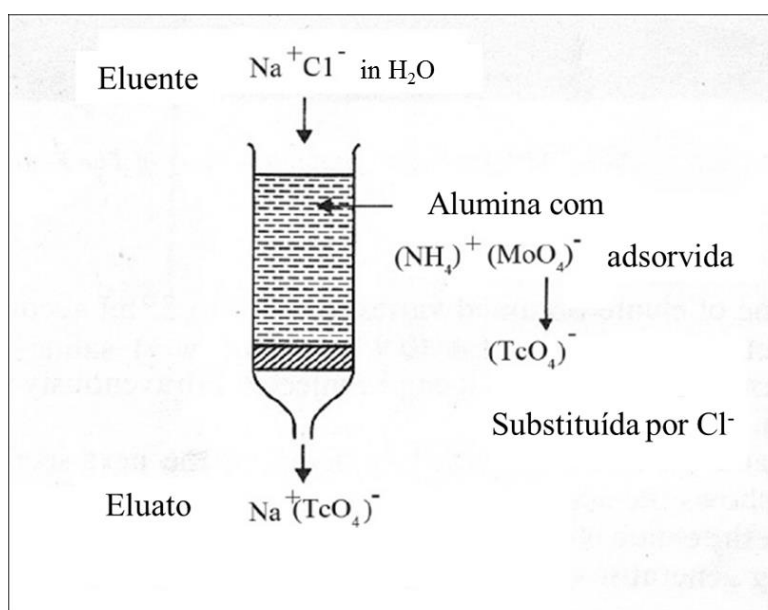
Historicamente os radiofármacos tiveram duas divisões marcantes, Fase I ou Fase Pré-Tecnécio e Fase II ou Fase Pós-Tecnécio. O fator determinante da Fase I foi a publicação na Revista Science, em 14 de junho de 1945 do artigo do Oak Ridge National Laboratories anunciando a comercialização de radionuclídeos ao setor privado. A seguir, o Brookhaven National Laboratories, disponibilizou ao setor privado os radionuclídeos por eles produzidos (OAK RIDGE NATIONAL LABORATORIES, 1945; SANTOS-OLIVEIRA; CARNEIRO-LEÃO, 2008). Neste período, não havia nenhuma garantia de esterilidade e apirogenicidade dos radionuclídeos. Somente quando a Abbott Laboratories, comprou a produção de radionuclídeos desses laboratórios e, incluiu estes parâmetros, transformando-os em radiofármacos (radionuclídeo devidamente preparado) para uso médico, sendo a primeira produtora de radiofármacos no mundo. Após cinco anos, outras empresas começaram a se interessar pelo setor, a Squibb Co. e a *Nuclear Consultants Corporation*. O primeiro radiofármaco a ser comercializado foi o Iodo-131 a partir de 1950 (EARLY, 1995).

A Fase II foi deflagrada com a descoberta do Tecnécio-99m metaestável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), um elemento químico que pertence ao grupo VII-B da tabela periódica, número atômico 43, descoberto por Segrè em 1938. Após uma visita ao Laboratório de Radiação Berkeley de Ernest O. Lawrence, Segrè foi enviado uma tira de molibdênio do defletor de ciclotron do laboratório em 1937 que estava emitindo formas anômalas de radioatividade. Após uma cuidadosa análise química e teórica, Segrè foi capaz de provar que parte da radiação estava sendo produzida por um elemento anteriormente desconhecido, chamado de Tecnécio, e foi o primeiro elemento químico artificialmente sintetizado que não ocorre na natureza, porque todos os seus isótopos têm meia-vida muito mais curta do que a idade da Terra. O Tecnécio-99m decai por transição isomérica, com uma emissão de raios gama de 140 keV, o que foi crucial para melhorar as imagens da medicina nuclear e reduzir as doses de radiação dos pacientes (GREEN, 2012; SAHA, 2010).

O Tecnécio-99m, meia-vida de 6,01 horas, é o radionuclídeo filho do Molibdênio-99, meia-vida 66,02 horas, e fez mais sentido prático para desenvolver um sistema gerador de tecnécio em que Molibdênio-99 é entregue a uma radiofarmácia hospitalar em uma base semanal e um sistema de eluição usado para produzir Tecnécio-99m numa base diária, para ser utilizado no fabrico de radiofármacos rotulados (GREEN, 2012; SANTOS-OLIVEIRA, 2010).

O potencial uso médico de ^{99m}Tc como marcador radioativo para aplicações médicas foi sugerido por Powell Richards e Walter Tucker com o desenvolvimento do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ em 1958 no *Brookhaven National Laboratories*, EUA e é o precursor da tecnologia do gerador de radionuclídeos. O método de separação consiste de molibdato de amônio adsorvido em uma coluna de alumina (Figura 10) com 3 variações observadas na Figura 11 (GREEN, 2012).

Figura 10 – Princípios básicos do gerador



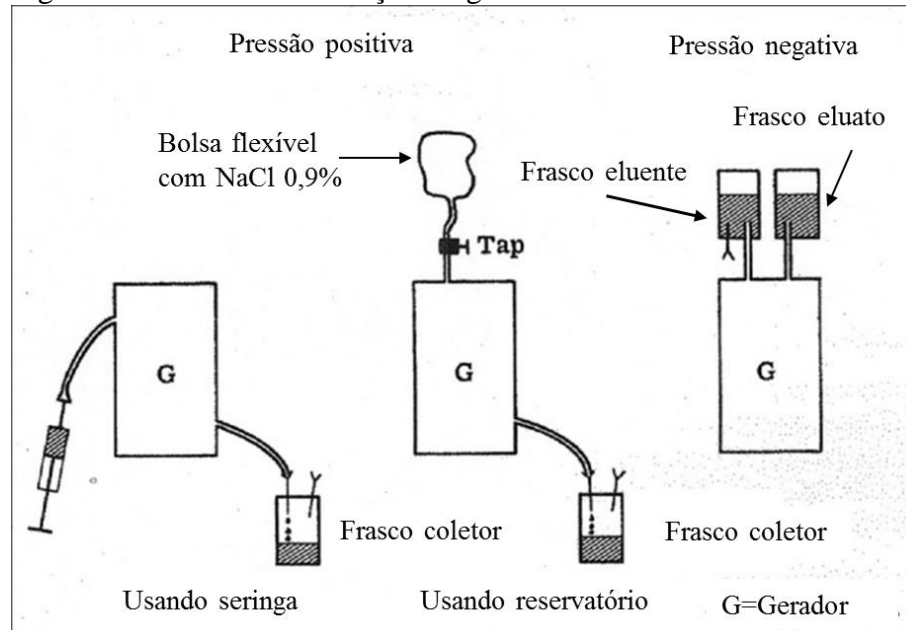
Fonte: Adaptação de GREEN, 2012.

Em 2009, a ANVISA lançou a primeira resolução (RDC N° 63/2009) sobre radiofármacos, promulgando os mesmos como: “Radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos”.

Os radiofármacos são medicamentos, compostos por dois componentes principais: carreador (partícula) e radionuclídeos ou radioisótopos (elemento radioativo), emissores de radiação e são utilizados na medicina para radioterapia e para exames de diagnóstico por

imagem, na medicina nuclear. Após administração no organismo, possuem uma biodistribuição específica ou uma afinidade pelo órgão ou função em estudo, com finalidades de diagnóstico, terapia ou monitoramento de doenças. A qualidade da imagem obtida e a eficácia dos radiofármacos estão diretamente relacionadas à escolha tanto do carreador a ser empregado como do radioisótopo (LIU, 2004; SAHA, 2010; SANTOS-OLIVEIRA, 2010).

Figura 11 – Métodos de eluição do gerador



Fonte: Adaptação de GREEN, 2012.

A efetividade de um radiofármaco geralmente é determinada pela seletividade pelo tecido doente em relação aos tecidos saudáveis. De um modo geral, os tumores possuem diferenças no fluxo sanguíneo, no pH, no metabolismo, de modo que os radiofármacos podem fazer uso dessas particularidades para se concentrar seletivamente nos tecidos malignos (ALBERNAZ et al., 2014; BORDIM et al., 2013; SA et al., 2012; SARCINELLI et al., 2016).

Os radiofármacos resultantes dos geradores de radionuclídeos podem ser utilizados para diagnóstico e terapia (Quadro 2 e 3, a seguir) (EDEM et al., 2016).

Quadro 2 – Radionuclídeos para terapia

RADIONUCLÍDEOS PARA DIAGNÓSTICO						
Pai	Decaimento	Meia Vida	Filho	Decaimento	Meia vida	Uso
Molibdênio-99	β^-	66 h	Tecnécio-99m	TI	6,01 h	SPECT
Germânio-68	CE	270,8 d	Gálio-68	β^+	1,130h	PET
Escândio-44m	TI	60 h	Escândio-44	β^+	4 h	PET
Ferro-52	CE/ β^+	8,3 h	Manganês-52m	β^+	21 min	PET
Zinco-62	CE/ β^+	9,2 h	Cobre-62	β^+	9,7 min	PET
Rubídio-81	CE	4,6 h	Criptônio-81m	TI	13 seg	SPECT
Cério-134	CE	3,2 d	Lantânio-134	β^+	6,5 min	PET
Neodímio-140	CE	3,4 d	Praseodímio-140	β^+	3,4 min	PET

Legenda: CE – captura eletrônica; TI – transição isomérica; PET -*Positron Emission Tomography*; SPECT - *Single-Photon Emission Computed Tomography*.

Fonte: Adaptação de EDEM et al., 2016.

Quadro 3 – Radionuclídeos para diagnóstico

RADIONUCLÍDEOS PARA TERAPIA					
Pai	Decaimento	Meia Vida	Filho	Decaimento	Meia vida
Estrôncio-90	β^-	28,5 a	Itrio-90	β^-	2,67 d
Níquel-66	β^-	2,3 d	Cobre-66	β^-	5,1 min
Paládio-112	β^-	21,04 h	Prata-112	β^-	3,14 h
Disprosio-166	β^-	3,4 d	Hólmio-166	β^-	1,12 d
Bismuto-213	α	45,6 min	Chumbo-209	β^-	3,3 h
Tungstênio-188	β^-	69,4 d	Rênio-188	β^-	16,8 h

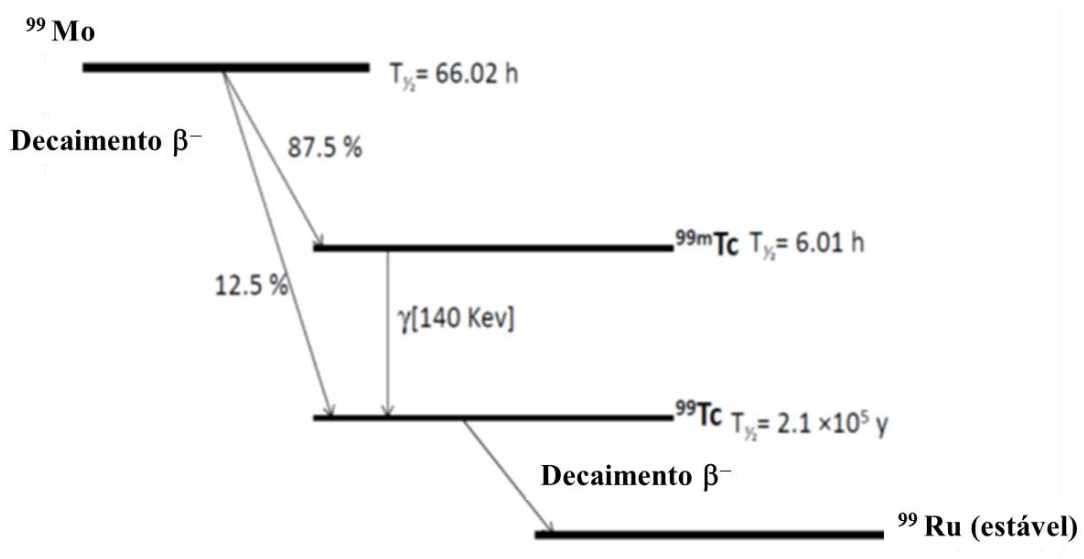
Legenda: CE – captura eletrônica.

Fonte: Adaptação de EDEM et al., 2016.

O esquema de decaimento de ^{99}Mo é dado na Figura 12. Nele é possível observar o decaimento do Molibdênio-99, com uma vida útil de 66,02 h, para o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (87,5%) e para o ^{99}Tc (12%) (PILLAI; DASH; KNAPP JUNIOR.; 2016).

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ metaestável com uma meia-vida de 6,01 horas e emitindo fótons gama com energia única de 140 keV, decai para ^{99}Tc . Esse, por sua vez é um radionuclídeo de vida muito longa, com uma vida média de $2,1 \times 10^5$ anos e decai para Rutênio-99 (^{99}Ru) estável e não apresenta quaisquer problemas de segurança e risco (GREEN, 2012; PILLAI; DASH; KNAPP JUNIOR, 2016; SAHA, 2010).

Figura 12 – Decaimento do ^{99}Mo -99 para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -99m



Fonte: Adaptação de PILLAI; DASH; KNAPP JUNIOR; 2016.

1.8.1.1 Radiofármacos SPECT

Single-photon emission computed tomography (SPECT) é uma técnica de imagem nuclear que requer a administração ao paciente de radiofármacos que são absorvidos pelo corpo e os raios γ são, então, detectados por uma gama câmera. A imagem SPECT permite reconstruir a distribuição tridimensional (3D) da radioatividade e as imagens resultantes são vistas em três planos ortogonais transaxial, sagital e coronal (KHALIL et al., 2011; SAHA, 2010).

As imagens de SPECT são obtidas utilizando-se gama-câmera que é constituída essencialmente por: a) detector, constituído por um ou mais cristais de iodeto de sódio; b) colimador de chumbo que limita a radiação (Figura 13) (SAHA, 2010).

A tecnologia SPECT produz uma imagem tomográfica, que mostra a distribuição da radiação no corpo do paciente, à medida que o detector vai percorrendo (180° ou 360°) (KHALIL et al., 2011; SAHA, 2010).

Além do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, outros radionuclídeos podem ser utilizados em SPECT, tais como: Índio-111 ($t_{1/2}=2,8$ dias), Galio-67 ($t_{1/2}=3,26$ dias), Iodo-123 ($t_{1/2}=13,22$ h) e Iodo-131 ($t_{1/2}=8,022$ dias) (KHALIL et al., 2011; SAHA, 2010).

Figura 13 - Equipamento SPECT



Fonte: PRODUTO da Ge Millennium, 2017.

1.8.1.2 Radiofármacos PET

Positron emission tomography (PET) é uma técnica de imagem da medicina nuclear baseada na administração e detecção de radiofármacos emissores pósitronicos (β^+). O pósitron tem as mesmas propriedades de interação que um elétron negativo, contudo, ao transferir sua energia cinética ele sofre processo de aniquilação, gerando dois fótons de radiação gama de energia 0,511 MeV cada, emitidas em um ângulo diametralmente oposto. Esses fótons são recolhidos externamente num detector circular, originando imagens tridimensionais. A detecção simultânea dos raios γ que têm sentidos opostos evita a presença de um colimador para limitar o campo de detecção. O sistema PET usa detectores múltiplos distribuídos em círculo, cada um ligado ao que se encontra na posição oposta, reconstruindo a imagem. O equipamento PET normalmente está associado a tomografia computadorizada (PET/CT), portanto, um equipamento híbrido, podendo fundir as imagens, obtendo uma análise anatômica e fisiológica do órgão ou tecido em questão (Figura 14) (SAHA, 2010; SHUKLA; KUMAR, 2006; VALLABHAJOSULA, S.; SOLNES; VALLABHAJOSULA, B., 2011).

Figura 14 - Equipamento PET/CT



Fonte: PRODUTO da GE Healthcare, 2017.

O PET emprega radionuclídeos de meia-vida curta, como: Flúor-18 ($t_{1/2}=109,8$ min), /Carbono-11 ($t_{1/2}=20,4$ min), Nitrogênio-13 ($t_{1/2}=9,98$ min), Oxigênio-15 ($t_{1/2}=2,03$ min), Gálio-68 ($t_{1/2}=68,3$ min) e Cobre-64 ($t_{1/2}=12$ h). A produção de radiofármacos PET é feita por ciclotron e/ou por uso de gerador (Gálio-68) e as reações são automatizadas para evitar exposição do manipulador (Quadro 4) (JALILIAN et al., 2016; SAHA, 2010).

Quadro 4 - PET e suas aplicações

Radiofármacos	Aplicação Clínica
^{18}F -FDG	Metabolismo de glicose
^{11}C -colina	Metabolismo lipídico
^{11}C -acetato	Metabolismo lipídico
^{11}C -metionina	Metabolismo de aminoácidos
^{18}F -FES (Flúor-17- β -estradiol- ^{18}F)	Receptores de esteróides
^{18}F -FDOPA (Fluorodi-hidroxifenilalanina)	Metabolismo de aminoácidos
^{68}Ga -DOTATOC	Receptores de somatostatina

Fonte: Adaptação de VALLABHAJOSULA, S.; SOLNES; VALLABHAJOSULA, B., 2011.

1.8.2 Nanorradiofármacos

A associação dos radiofármacos a nanotecnologia (nanorradiofármacos) revolucionou a medicina nuclear, despontando como alternativa ao tratamento e diagnóstico de tumores (GARNETT; KALLINTERI, 2006, MI et al., 2016; SANTOS-OLIVEIRA, 2011; TING et al., 2010).

A nanotecnologia permite a proteção dos radiofármacos de condições desfavoráveis do microambiente tumoral (pH, oxidação entre outros) e da ação de enzimas, mantendo-os íntegros e impedindo sua degradação prematura, além de aumentar sua biodisponibilidade, seu tempo de retenção e sua captação celular (CHO et al., 2008; COELHO et al., 2015; SARCINELLI et al., 2016).

Além disso, protegem o radiofármaco contra o reconhecimento por mecanismos de resistência a fármacos, como a resistência mediada pela glicoproteína P, o que culmina em uma maior concentração do fármaco no interior das células cancerígenas (CHO et al., 2008); melhorando as propriedades farmacológicas, terapêuticas e toxicológicas dos agentes utilizados no tratamento e diagnóstico do câncer (HAMOUDEH et al., 2008; KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010, TING et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas de magnetita decoradas com anticorpo monoclonal Trastuzumabe e radiomarcá-las com Tecnécio-99m, para obtenção de agente diagnóstico de tumores de mama com superexpressão do receptor HER2, bem como avaliar o estadiamento após tratamento convencional.

2.2 Objetivos Específicos:

- a) produção de nanopartículas de magnetita (NPM);
- b) decoração das nanopartículas de magnetita com o anticorpo monoclonal trastuzumabe (NPM-DTPA-TZB);
- c) marcação da nanopartícula de magnetita decorada com Trastuzumabe com o radionuclídeo Tecnécio-99m;
- d) avaliação da biodistribuição das NPM-DTPA-TZB marcadas com Tecnécio-99m em camundongos Balb/c nude saudáveis e induzidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Para realização deste trabalho foram utilizados os materiais descritos a seguir:

- a) Herceptin® (Trastuzumabe) comercializado pela Roche®, na forma de 440 mg de pó liofilizado injetável;
- b) Linhagem celular MCF-7 (células de câncer de mama com expressão de receptores de estrogênio e superexpressão de HER2) (American Type Culture Collection, Manassas, VALLC) cultivadas em RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, Life Technologies, MD, EUA), fornecido pela USP;
- c) *Fetal Bovine Serum* (FBS, em português, Soro Fetal Bovino) – Gibco, Life Technologies, MD, USA, fornecido pela USP;
- d) Gentamicina – Gibco, Life technologies, MD, EUA, fornecido pela USP;
- e) kit de detecção Lonza Mycoplasma, fornecido pela USP;
- f) SnCl₂ (Cloreto Estanoso) adquirido da Sigma Aldrich®;
- g) ^{99m}Tc (Tecnécio 99 metaestável) IPEN/CNEN, fornecido pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ);
- h) Acetona adquirido da Merck, grau de pureza P.A.;
- i) Álcool etílico adquirido da Merck, grau de pureza P.A.;
- j) Glutaraldeído adquirido da Sigma Aldrich®;
- k) N-(3-dimetilaminopropil)N'-etilcarbodiimida adquirido da Sigma Aldrich®;
- l) N-hidroxi-succinimida adquirido da Sigma Aldrich®;
- m) 3-azidopropilamina adquirido da Sigma Aldrich®;
- n) Fosfoetanolamina adquirido da Sigma Aldrich®;
- o) Ácido dietileno tri-aminopentacético anidro adquirido da Sigma Aldrich®;
- p) D-Luciferina adquirido da Sigma Aldrich®;
- q) papel de *Whatman* nº 1;
- r) camundongos Balb/c nude adquiridas do Biotério da USP;
- s) Cetamina 10 g / 100 mL, comercializado pela Syntec®;

- t) Xilazina 2 g/100 mL, comercializado pela Syntec[®].

3.2 Equipamentos

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- a) Balança Ay220, Shimadzu;
- b) Microscópio eletrônico transmissão Philips CM200, voltagem de aceleração 200 keV com acessório de análise química por energia dispersiva (EDS);
- c) Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica da Universidade Federal de São Paulo;
- d) Nanotrak (Microtrac) – Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia – Instituto de Química – Universidade de São Paulo (LQSN-IQ/USP);
- e) Software Multiexp;
- f) Calibrador de dose CRC[®] 25R, Capintec;
- g) Contador gama Perkin Elmer modelo Wizard[®]2470;
- h) Gama câmera GE Millenium, Universidade de São Paulo.

3.3 Métodos

3.3.1 Obtenção das nanopartículas de magnetita e processo de decoração bifuncional com fosfoetanolamina e DTPA

As nanopartículas de magnetita (NPM) sofreram uma bifuncionalização. Essa bifuncionalização foi requerida, uma vez que havia a necessidade de se ligar dois carreadores em sua superfície: o primeiro era um anticorpo monoclonal (TZB); e o segundo, o *diethylenetriaminepentaacetic acid* (DTPA, em português, ácido dietileno triamino

pentaacético) que se liga com um radionuclídeo emissor gama (^{99m}Tc) de modo a permitir o imageamento para SPECT.

Assim, o uso de uma química muito fina e técnicas patenteadas pelo grupo foi requerida, conforme descrito abaixo.

A funcionalização é a reação de grupos químicos específicos à superfície da NPM, tais como grupos: hidroxila, carboxila ou amino, que permitem a ligação da mesma com biomoléculas com afinidade por um determinado alvo onde exerce sua ação, seja diagnóstica ou terapêutica. A presença dos grupos biorreativos favorece a imobilização de biomoléculas por adsorção física, através de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, mas preferencialmente por ligações covalentes ou quelação (BISHT et al., 2016; LAM et al., 2016).

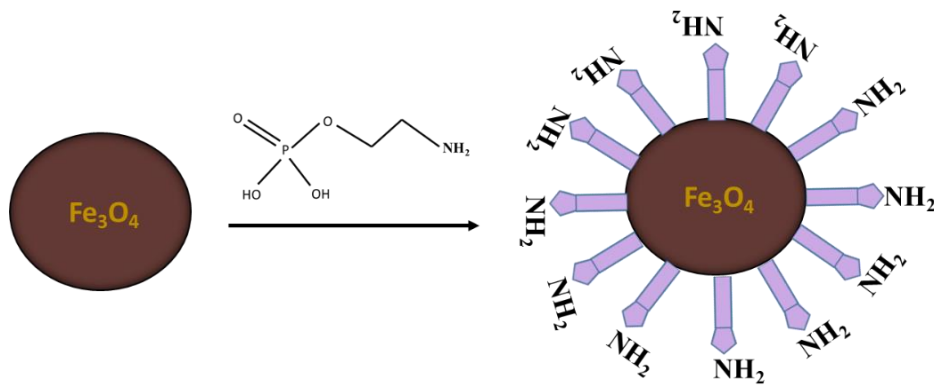
O processo de funcionalização com biomoléculas utiliza interações eletrostáticas ou ligações covalentes coordenadas. A fosfoetanolamina permite a reação tanto com a biomolécula quanto com o quelante bifuncional (GHOLAMI; ANIJ DAN, 2016; UCHIYAMA et al., 2015).

As NPM foram preparadas por termodecomposição de complexos de ferro (III) em solvente de elevado ponto de ebulição e na presença de grupos protetores hidrofílicos, de acordo com o método descrito por Caruntu (CARUNTU et al., 2004). Após 1 hora sob 210°C , a cor da mistura reacional mudou de laranja para preto, como esperado, devido à formação de partículas de magnetita. A mistura reacional foi resfriada até 90°C e, em seguida, a solução de nanopartículas de Fe_3O_4 , foram adicionados 0,5 mol de fosfoetanolamina. O uso da fosfoetanolamina às NPM foi para inserir grupos de etilaminas e assim, iniciar seu processo de dupla funcionalização, permitindo assim sua múltipla utilização. Mister se faz necessário notar, que tanto o processo de fabricação da NPM como sua funcionalização estão melhores descritos no processo de patente n° BR 102015013031-7. Uma vez funcionalizadas com etilaminas, as nanopartículas foram isoladas como um sólido preto através do resfriamento da mistura reacional até a temperatura ambiente e separadas com um ímã. O sólido foi lavado duas vezes com etanol e três vezes com uma mistura 1:1 (v/v) de etanol e acetona, e seco num dessecador sob vácuo durante 24 horas. A inserção dos grupos etilaminas (grupos altamente hidrofílicos e catiônicos na superfície das NPMs) propiciou ainda a dispersabilidade dessas NPMs solúveis em água (Figura 15) (TOMA et al., 2015; UCHIYAMA, 2015; UCHIYAMA et al., 2015).

Eles possuem átomos que formam ligações covalentes com um íon metálico central, onde o número de ligações depende do tamanho do metal, da identidade do ligante e das

interações eletrônicas. O número máximo de ligações que se podem estabelecer entre o íon central e os átomos doadores dos ligantes denomina-se número de coordenação do metal. Ligantes que estabelecem apenas uma ligação ao íon central designam-se ligantes monodentados, os que se ligam por intermédio de dois átomos são chamados bidentados e, se a ligação se dá por mais do que dois átomos ao íon metálico, denominam-se multidentados ou polidentatos (BRECHBIEL, 2008).

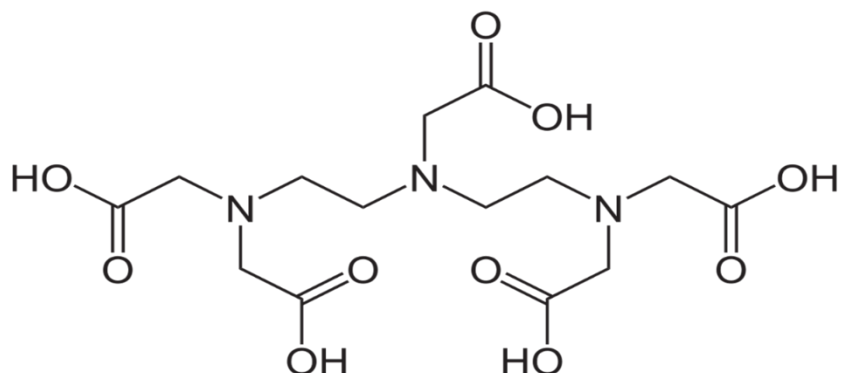
Figura 15 - Esquema funcionalização das NPM com fosfoetanolamina



Legenda: NPM - Nanopartícula de Magnetita.
Fonte: A autora, 2017.

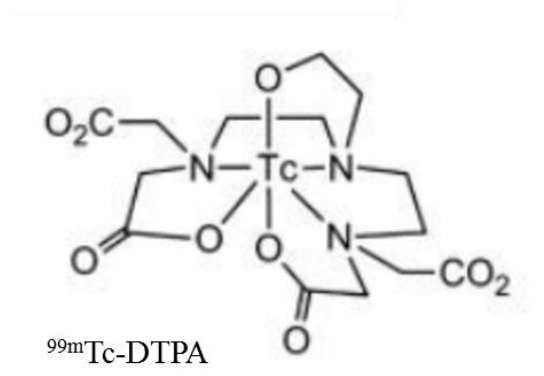
O DTPA é um quelante bifuncional, usado rotineiramente em medicina nuclear, para avaliação da função renal. Possui uma natureza bastante hidrossolúvel, o que faz com que sua distribuição seja essencialmente extracelular (FLORA; PACHAURI, 2010). Todavia, este agente quelante após a administração é rapidamente eliminado pela via renal, devido a sua alta hidrossolubilidade, daí seu uso para avaliação renal (Figura 16) (BRECHBIEL, 2008; MARUK; BRUSKIN; KODINA, 2011).

Figura 16 - Estrutura do DTPA



Fonte: WANG; TOMASELLA, 2016.

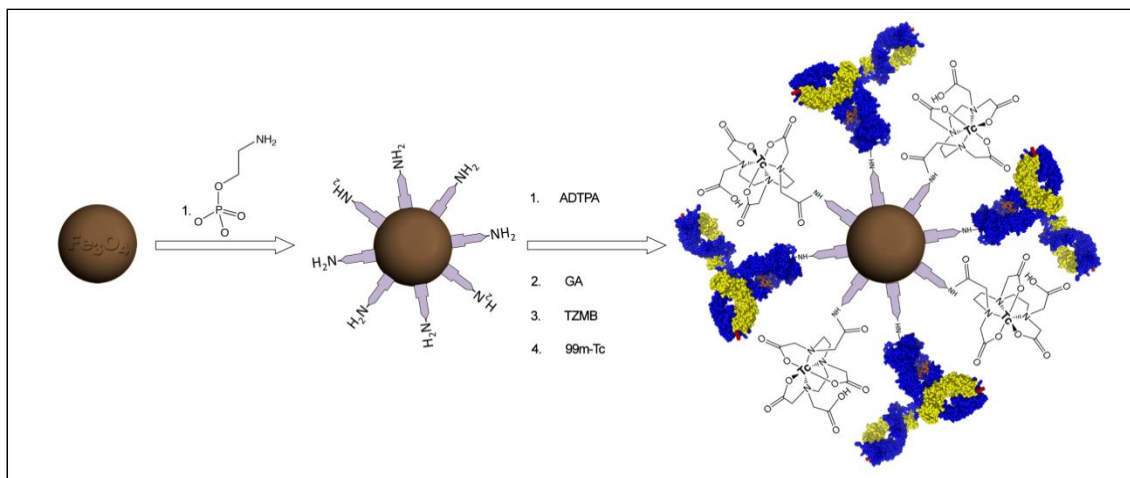
Ele pertence ao grupo dos quelatos poliaminocarboxílicos e é um derivado do EDTA, que foi desenvolvido por Sundberg et al. (1974). O DTPA se liga ao ^{99m}Tc pela complexação do grupo amino e carboxilas terminais desse quelante (Figura 17) (SUNDBERG et al., 1974).

Figura 17 - Estrutura do ^{99m}Tc -DTPA

Fonte: LIPOWSKA et al., 2014.

Assim, a NPM dispersível em água, ou seja, decorado com o etilaminas, foi combinada por meio de uma reação sub-estequiométrica (1:20) com DTPA. O produto dessa reação foi então tratado com excesso de glutaraldeído (10 vezes em escala). O glutaraldeído, converteu os grupos aminos remanescentes em derivados aldeídicos, que permitiram então, a ligação do anticorpo monoclonal TZB.

Figura 18 – Esquema da reação para obtenção de nanopartículas superparamagnéticas bifuncionalizadas com DTPA e TZB



Fonte: A autora, 2017.

3.3.2 Caracterização morfológica e dimensional das nanopartículas de magnetita

3.3.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

O estudo de caracterização das nanopartículas é uma etapa de grande importância no desenvolvimento de nanocarreadores (MALDONADO-CAMARGO; UNNI; RINALDI, 2017; TOMA et al., 2015).

Na *Transmission Electron Microscopy* (TEM, em português, Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET), um feixe de elétrons é acelerado por uma diferença de potencial da ordem de centenas de kV entre o catodo e o anodo. Ao serem acelerados, os elétrons são colimados por lentes condensadoras magnéticas, de modo a incidir perpendicularmente sobre a amostra. O feixe transmitido pela amostra atinge uma tela fluorescente, onde ocorre a formação da imagem (MICHEN et al., 2015; MUNEEAWANG; SIRISATHITKUL, 2015; TOMA et al., 2015).

A MET permite caracterizar de forma simultânea, a morfologia, cristalografia e composição química dos materiais. As medidas podem ser realizadas com resolução espacial

e em energia de alguns angstroms e elétron-volts, respectivamente, geralmente sob condições de alto vácuo (BISHT et al., 2016; LIM et al., 2013).

Atualmente, vem sendo utilizado a *High Resolution Transmission Electron Microscopy* (HRTEM, em português, Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução). O HRTEM tem grande aplicação na área de materiais metálicos, pois à sua alta resolução, permite estudar as propriedades em nanoescala de metais. A diferença entre o TEM e o HRTEM é que no segundo se utiliza tanto o feixe direcionado como o feixe espalhado de elétrons, dessa forma, possibilita realizar uma imagem de interferência entre os feixes e consequentemente, obter uma melhor resolução, em especial para sistemas muito pequenos (LI et al., 2017).

Um significativo desenvolvimento tem sido realizado na aplicação da HRTEM em nanotecnologia, como a implementação de experimentos *in-situ* para o estudo de processos dinâmicos em escala nanométrica; obtenção de imagens de campos elétricos e magnéticos por holografia; mapeamento químico quantitativo com resolução sub-nanométrica e metodologias para correção de aberrações através de hardware e/ou software para reconstrução da onda de saída, permitindo uma melhora na resolução e atingindo a escala sub-angstrom (FÉLIX et al., 2017; TOMA et al., 2015).

O tamanho médio e a morfologia das NPM-DTPA-TZB foram avaliados por *Transmission Electron Microscopy* (TEM, em português, Microscopia Eletrônica de Transmissão) no laboratório LIEC-UFSCar, utilizando o microscópio Philips CM200 e voltagem de aceleração de 200 kV com acessório de análise química por energia dispersiva (EDS) e HRTEM. As amostras foram dispersas em redes de cobre recobertas com carbono (BIGGEMANN et al., 2008; FÉLIX et al., 2017; TOMA et al., 2015).

3.3.2.2 Espalhamento dinâmico de Luz

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering – DLS*) é uma ferramenta fundamental na obtenção de tamanhos de nanopartículas em solução e ajudam a explicar seu equilíbrio hidrodinâmico (FÉLIX et al., 2017; LAM et al., 2016).

Por fornecer uma série de informações relacionadas à estrutura e às propriedades dinâmicas da matéria, experimentos de espalhamento de luz dão fundamento a análises de

rotina para determinar não apenas tamanho, mas também a forma de NPs em solução (LIM et al., 2013; ROGERS et al., 2015; TOMA et al., 2015).

O espalhamento dinâmico de luz é um método em que um feixe de luz monocromática atinge a amostra, e a luz espalhada é detectada por uma fotomultiplicadora. Quando a luz interage com partículas em movimento, a luz espalhada sofre alterações em frequência devidas ao efeito Doppler. Desta forma, quando uma solução coloidal é iluminada, sinais espalhados com diferentes frequências apresentam fenômenos de interferência e batimento, que podem ser analisados com detectores e sistemas de processamento de sinais adequados. Deste modo, com o uso de um sofisticado sistema eletrônico e matemática computacional, é possível inferir o tamanho das nanopartículas (LIM et al., 2013; ROGERS et al., 2015; TOMA et al., 2015).

As medidas foram realizadas em triplicatas à 25°C e o ângulo de incidência do laser em relação à amostra foi ajustado para 173° usando cubetas de quartz de 12 mm². Tanto a média como o desvio padrão foram realizados. Essas medidas foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) (SARCINELLI et al., 2016; TOMA et al., 2015; UCHIYAMA, 2015; UCHIYAMA et al., 2015).

3.3.3 Modelo de xenoenxerto de tumor

As células MCF-7, linhagem de células de câncer de mama com expressão de receptores de estrogênio e superexpressão HER2 (American Type Culture Collection, Manassas, VALLC) foram cultivadas em RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, Life Technologies, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Life Technologies, MD, USA) / mL de gentamicina (Gibco, Life technologies, MD, EUA). A contaminação por micoplasma em células cultivadas foi monitorizada usando kit de detecção Lonza Mycoplasma. A escolha desta linhagem em particular deve-se a sua alta agressividade.

Os tumores de mama foram implantados por injeção subcutânea de 2x10⁶ de células MCF-7 no flanco direito de camundongos Balb/c nude fêmeas com seis semanas de idade. O tamanho do tumor foi monitorado durante três semanas e medido com paquímetro. O tamanho do tumor antes da imagem era de cerca de 2 cm de largura. Os camundongos Balb/c nude foram criados nas instalações para animais do Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear (IPEN) e todas as experiências obedeceram às leis relevantes e foram aprovadas pelos comitês

locais de ética animal. Os camundongos foram observados três vezes por semana para evidência de sofrimento, ascite, paralisia ou perda de peso excessivo.

Uma inspeção final foi realizada por análise de bioluminescência que confirmou não haver foco metastático e a fixação e crescimento do tumor no flanco direito dos animais.

3.3.4 Bioluminescência do xenoenxerto nos animais induzidos

Para imagiologia *in vivo*, foram avaliados três grupos de camundongos Balb/c nude fêmeas: grupo A (controle): camundongos saudáveis; grupo B: implante de xenoenxerto de tumor de mama após 2 h do implante; grupo C: implante de xenoenxerto após 21 dias.

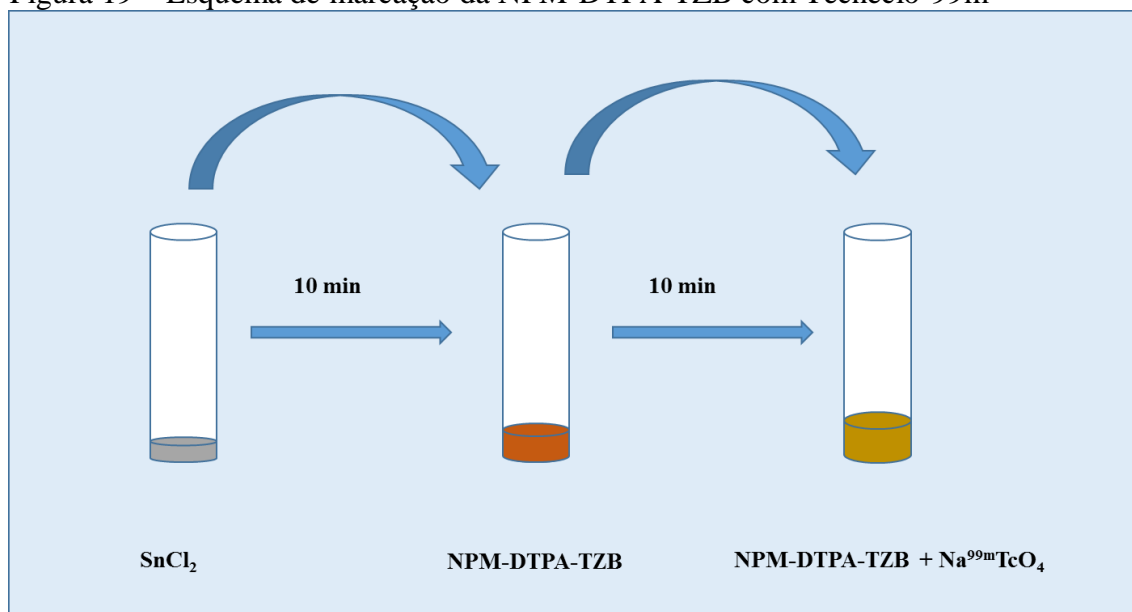
O grupo A (controle), recebeu uma injeção intra-peritoneal de salina; o grupo 2 e 3 receberam D-luciferina (150 mg/kg, Promega) por injeção intra-peritoneal. Imediatamente após a injeção de D-luciferina, foi avaliada a emissão de fótons (luminescência) de corpo inteiro de cada animal nos respectivos grupos utilizando o sistema IVIS Spectrum (Xenogen/Caliper Life Sciences, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados utilizando o software Living Image 4.3 (Xenogen).

Os tumores de mama não expressam luciferase. Este procedimento foi realizado devido ao desenvolvimento de uma modificação realizada na molécula de luciferina pelo Professor Emerson Soares Bernardes do IPEN, permitindo a obtenção da bioluminescência.

3.3.5 Marcação da NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

Foi utilizado o cloreto estânico (SnCl_2), como agente redutor, para a marcação da NPM-DTPA-TZB, na concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para tal, foi realizada a incubação, por 10 minutos, de 150 μL de suspensão 20% NPM-DTPA-TZB em tubo de ensaio com 150 μL da solução do agente redutor. Em seguida, foi acrescentado 600 μCi (22,2 MBq) de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), e foi realizada incubação por mais 10 minutos para finalizar o processo de marcação (Figura 19) (ALBERNAZ et al., 2014; SA et al., 2012).

Figura 19 – Esquema de marcação da NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m



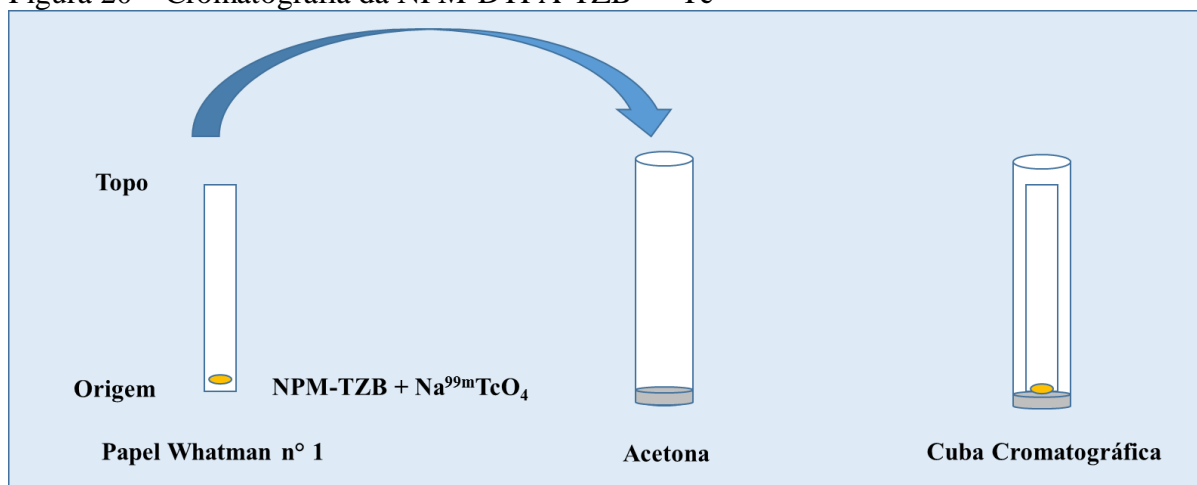
Legenda: SnCl_2 = cloreto estano; NPM-DTPA-TZB= Nanopartículas de magnetita com o quelante ácido dietileno triamino pentaacético com anticorpo monoclonal Trastuzumabe; NPM-DTPA-TZB+ $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ = Nanopartículas de magnetita com o quelante ácido dietileno triamino pentaacético com anticorpo monoclonal Trastuzumabe + pertecnetato de sódio

Fonte: A autora, 2017.

3.3.5.1 Controle de qualidade do processo de marcação das NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)

A qualidade da marcação foi avaliada por meio da cromatografia em papel, utilizando o papel *Whatman* nº 1 (papel em tiras de 14 cm de comprimento por 1 cm de largura) como fase estacionária e acetona como fase móvel (Figura 20, a seguir). Após a corrida cromatográfica, as tiras foram cortadas ao meio para separar o topo da origem e foi realizada a leitura das mesmas no contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard[®] 2470). Finalizando, foi calculada a porcentagem de atividade em cada uma das partes das fitas para avaliar o processo de marcação (ALMEIDA et al., 2012, PATRICIO; ALBERNAZ; SANTOS-OLIVEIRA, 2013).

Figura 20 – Cromatografia da NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc



Legenda: NPM-DTPA-TZB+ Na^{99m}TcO₄ = Nanopartículas de magnetita com o quelante ácido dietileno triamino pentaacético com anticorpo monoclonal Trastuzumabe + pertecnetato de sódio.

Fonte: A autora, 2017.

3.3.5.2 Estudo da estabilidade da marcação das NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

A eficiência de marcação foi realizada por cromatografia em papel *Whatman* nº1 e acetona como fase móvel em diferentes tempos: 0, 2, 4, 6 e 8 horas.

3.3.6 Imagem SPECT

Os camundongos foram anestesiados com uma solução a 10% de cetamina e 2% xilazina em 50 µL administrada por via intramuscular (coxa). Foram injetados 100 µCi (3,7 MBq/0,1 mL) de NPM-DTPA-TZB marcado com ^{99m}Tc por via intraocular (PINTO et al., 2014).

As imagens planares foram obtidas após 90 min de injeção intraocular da NPM-DTPA-TZB marcada com Tecnécio-99m (3,7 MBq em 0,1 mL) em três camundongos (triplicado), integrando por 5 minutos as contagens de radiação centradas em 140 keV, com uma Gama Câmera Millenium (GE Healthcare), utilizando uma janela de 15%. As imagens foram processadas usando OsiriXsoftware, selecionando *regions of interest* (ROIs, em português, regiões específicas de interesse) sobre o tumor para uma análise mais detalhada.

3.3.7 Estudo de biodistribuição

A avaliação da biodistribuição das NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc, foi realizada em camundongos Balb/c nude fêmeas, considerando dois grupos: controle, utilizando camundongos sadios (n=3) e induzidos, utilizando camundongos com tumor de mama (n=3), após injeção intraocular de NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc.

Após duas horas, os camundongos foram eutanasiados em câmara de gás de dióxido de carbono e dessecados para a retirada dos órgãos, de acordo com protocolo aprovado pelo comitê de ética de estudo em animais (ANEXO A). A atividade de cada órgão e no sangue foi determinada pelo contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470), em condições eletrônicas ótimas para a leitura do radioisótopo ^{99m}Tc. Os resultados foram expressos em dose por órgão e dose por grama de tecido (SA et al., 2012). Foram avaliados: cérebro, pulmão direito, pulmão esquerdo, estômago, baço, intestino delgado, intestino grosso, coração, rim direito, rim esquerdo, fígado, sangue e a lesão (tumor xenoenxertado).

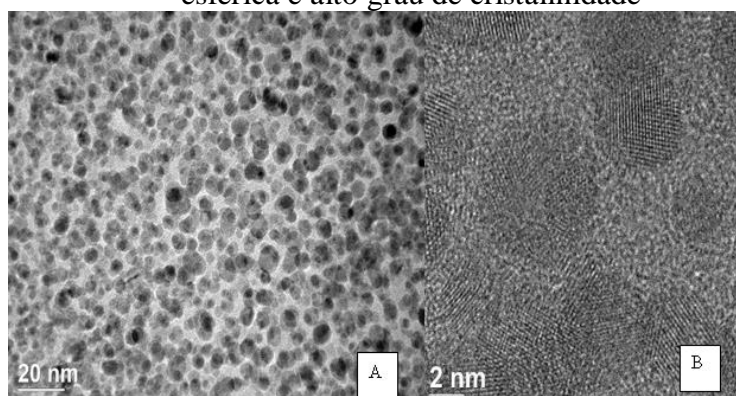
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Morfológica e Dimensional das Nanopartículas de Magnetita

As NPM decoradas com TZB e DTPA foram obtidas de modo eficaz pelo método de decomposição térmica após funcionalização com grupo etilaminas, apresentando diâmetro entre 7 e 10 nm. As nanopartículas se apresentaram como um pó negro, magnético e dispersível em água. A composição de nanopartículas dispersíveis em água permitem seu uso na rotina da radiofarmácia, assim como facilita o processo de marcação com tecnécio 99m uma vez que o mesmo é eluído na forma de solução salina de pertecnetato de sódio. Além disso, nanopartículas dispersíveis em meio aquoso apresentam maior compatibilidade biológica e maior versatilidade radioquímica.

As características morfológicas do fármaco, tais como tamanho, forma, estrutura e integridade, devem ser avaliadas na análise de biodistribuição, pois são fundamentais por estarem diretamente relacionadas com sua eficácia *in vivo* e *in vitro* (SITTERBERG et al., 2010). Assim, as imagens topográficas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), corroboradas pela Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM) das NPM-DTPA-TZB mostraram a formação de nanopartículas esféricas, com alta homogeneidade de forma e distribuição. Além disso, revelaram uma nanopartícula com estreita variação de tamanho, na faixa de 7 nm. (Figura 21).

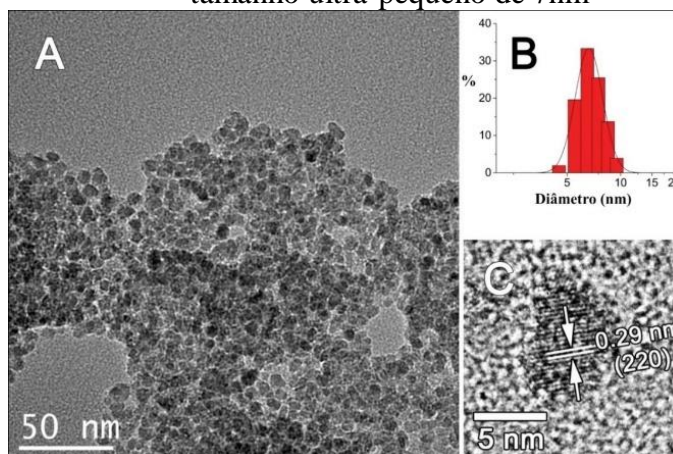
Figura 21 – Imagens TEM (A) e HRTEM (B) de NPM funcionalizadas mostrando sua forma quase esférica e alto grau de cristalinidade



Fonte: A autora, 2017.

Na Figura 22, o distanciamento do foco do feixe possibilita observar o agrupamento magnético típico de ligas metálicas, demonstrando a composição e o efeito metálico sobre a homogeneidade da amostra.

Figura 22 – Imagem DLS da NPM mostrando o tamanho ultra-pequeno de 7nm



Legenda: A: Imagem da Microscopia eletrônica de transmissão das NPM; B: histograma de distribuição de tamanho correspondente; C: imagens de microscopia de transmissão de alta resolução mostrando a distância interplanar (220).

Fonte: A autora, 2017.

O desenvolvimento de nanopartículas esféricas e com tamanhos inferiores a 100 nm é o requerido no campo da aplicação da nanotecnologia em sistemas biológicos. O tamanho inferior a 50 nm corresponde a uma nova tecnologia de fármacos aplicada a nanotecnologia, que consiste no desenvolvimento de fármacos intracelulares. Nesse caso específico de nanopartículas, a interação com o alvo, assim como seu comportamento biológico são potencializados pelo uso de técnicas de decoração estrutural, obtidas fundamentalmente, pela inserção de peptídeos e/ou anticorpos monoclonais na estrutura externa da nanopartícula, como no caso dessa NPM-DTPA-TZB, onde houve a inserção do anticorpo monoclonal TZB (BREUNIG; BAUER; GOEPFERICH, 2008; D'SOUZA, WEISSIG, 2009).

É importante ressaltar ainda que nanopartículas esféricas apresentam tempo de circulação sanguíneo médio de 2-3 dias, em comparação com outro formatos de nanopartículas, tais como micelas filamentosas que apresentam tempo médio de circulação superior a 1 semana (GENG et al., 2007). Isso representa importante vantagem para partículas radioativas, em especial, para sua segurança de uso em pacientes.

É importante observar que se trata de nanopartículas magnéticas e, portanto, a incidência de feixes de elétrons, tende a criar campos magnéticos durante a imagem de MET

ou HRMET. Esse magnetismo pode desenvolver aglomeração (clots) de nanopartículas, conforme visto na Figura 22 (legenda B).

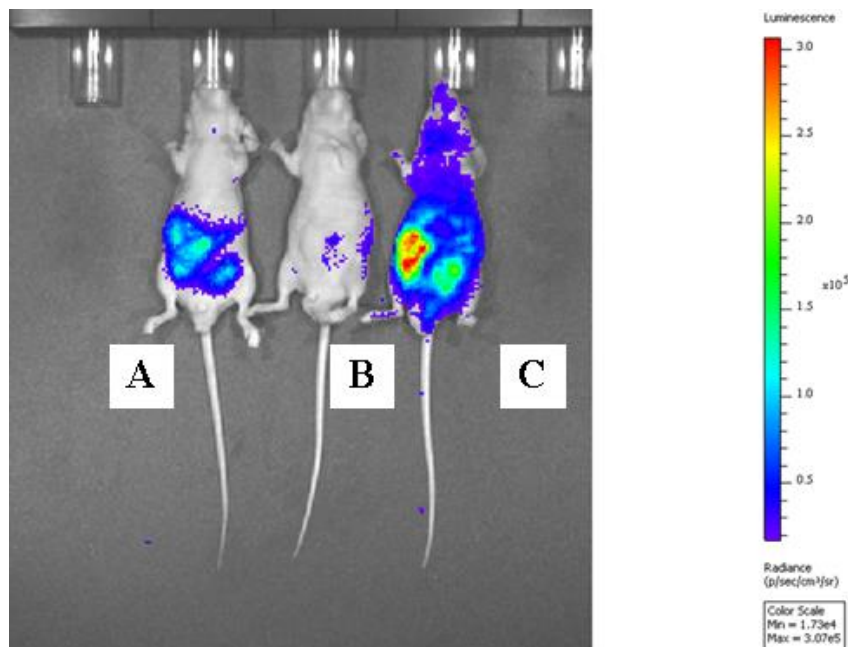
O DLS obtido das NPM bifuncionalizadas é mostrado na Figura 22. Observa-se uma distribuição monomodal do tamanho de partículas com diâmetro médio é de 7 nm, corroborando os dados do HRMET e do MET.

Na Figura 22 (legenda A), é possível observar a formação de clots devido à força magnética gerada no equipamento de MET. Contudo, os dados (B) e (C) desmistificam o tamanho real e demonstram o tamanho médio de 7 nm.

4.2 Análise por Bioluminescência do Modelo de Xenoenxerto

Uma inspeção final foi realizada por análise de bioluminescência que confirmou não haver foco metastático e a fixação e crescimento do tumor no flanco direito dos animais (Figura 23).

Figura 23 – Imagem por bioluminescência de câncer de mama



Legenda: Camundongo A: 2 horas após inoculação; B: controle; C: 21 dias após inoculação.

Nota: Imagem por bioluminescência de câncer de mama 2 horas e 21 dias após inoculação de 100 μ L de uma suspensão de MCF-7 (1×10^6 células) no flanco direito de camundongos Balb/c nude de 8-9 semanas de idade e camundongos controle

Fonte: A autora, 2017.

4.3 Marcação das NPM-DTPA-TZB com o Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

4.3.1 Controle de Qualidade do Processo de Marcação das NPM-DTPA-TZB com o Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

Os resultados da cromatografia em papel referentes a marcação da NPM-DTPA-TZB com o Tecnécio-99m, com acetona como fase móvel, estão expressos no Quadro 5.

Quadro 5 – Contagem dos pedaços da fita no Contador gama com as respectivas percentagens em cada pedaço

NPM-DTPA-TZB- ^{99m}Tc			
Porcentagem (%)	*CPM ^{99m}Tc	Pedaços da Fita	Fitas
97,13	3582861	Origem	1ª Fita
2,87	105912,34	Topo	
100,00	3688773,34	Total	
96,94	3467789	Origem	2ª Fita
3,06	109393,4	Topo	
100,00	3577182,4	Total	
97,11	3559759	Origem	3ª Fita
2,89	105765,3	Topo	
100,00	3665524,3	Total	
97,06	Média Percentual das Fitas		

Legenda: *CPM: Contagem por minuto.

Fonte: A autora, 2017.

O Tecnécio livre na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$) na cromatografia em papel Whatman nº1 utilizando a acetona como fase móvel, vai para o topo; enquanto que complexado a NPM-DTPA-TZB fica retido na origem.

De acordo com os dados do Quadro 5, pode-se concluir que as NPM-DTPA-TZB marcadas com Tecnécio-99m ficaram na origem e, no topo, o Tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), tendo um rendimento de marcação de 97,06%. Este resultado está de acordo com a literatura, que preconiza que a quantidade de ^{99m}Tc ligada a nanopartícula não deve ser inferior a 90%. A grande eficácia na marcação possibilita a translação do uso para radiofarmácias hospitalares por meio de processos conhecidos como preparações radiofarmacêuticas *in house*. Não obstante, a eficácia de marcação tem impacto global na qualidade da imagem obtida no exame

SPECT. De modo geral, alta eficácia de marcação (>95%) resulta em imagens com poucos artefatos, possibilitando assim uma qualidade de imagem superior e, conseqüentemente, um diagnóstico mais preciso e eficaz (ALMEIDA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2011; SAHA, 2010).

O percentual de marcação do TZB puro marcado com ^{99m}Tc é de 98,3% e das nanopartículas de nanopartículas de TZB em poli ácido lático (PLA) e Montmorilonita marcadas com ^{99m}Tc é de 98,1%. Portanto, o percentual de marcação, tanto do TZB puro quanto o da nanopartícula de PLA e Montmorilonita marcada com ^{99m}Tc e NPM-DTPA-TZB- ^{99m}Tc apresentam basicamente a mesma faixa de marcação (SARCINELLI et al., 2016).

4.3.2 Estabilidade de Marcação da NPM-DTPA-TZB com o Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

No Quadro 6, observa-se que a estabilidade de marcação até 8h apresenta um percentual maior que 91%, portanto, acima dos 90% considerado ideal na literatura.

Quadro 6 – Estabilidade da marcação da NPM-DTPA-TZB com Tecnécio-99m até 8 horas

Tempo (h)	Percentual de Marcação (%)
0	97,06
2	96,92
4	94,21
6	93,02
8	91,97

Fonte: A autora, 2017.

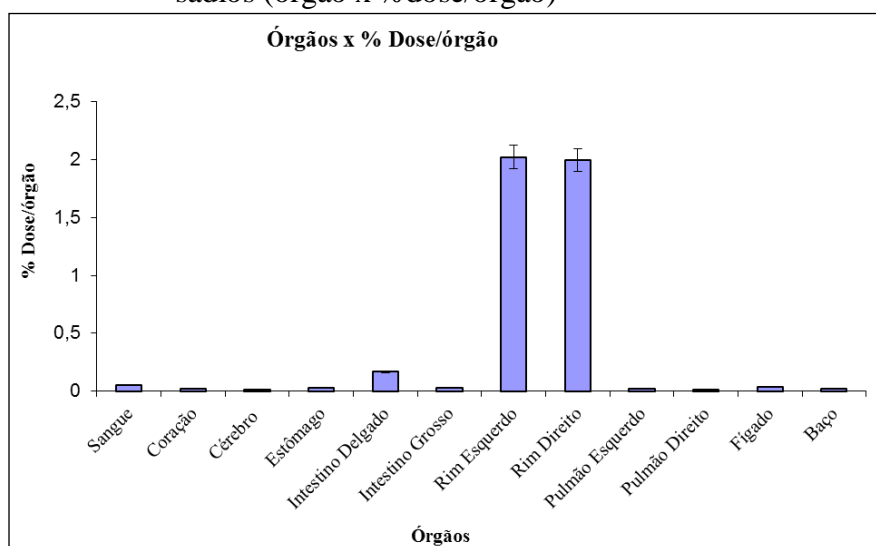
A estabilidade de marcação serve como parâmetro para o uso em radiofarmácia do tipo hospitalar ou centralizada. A possibilidade de obter complexos com alta eficácia de marcação (>90%) em um período de tempo próximo ao decaimento da primeira meia vida física do radionuclídeo permite sua utilização de forma rotineira em procedimentos clínicos, assim, como facilita a rotina desses ambientes, uma vez que o fármaco pode ser marcado com o radioisótopo e administrado ao longo do dia.

4.4 Estudo de Biodistribuição

Os estudos de biodistribuição são fundamentais para definir a aplicação potencial de nanomateriais como sistemas-alvo, mas também como agentes de imagem. Quando administrados por via intravenosa ou por via retro-orbital, as nanopartículas interagem com os fluidos corporais e tecidos, e atingem o alvo desejado. O uso de camundongos saudáveis e/ou induzidos são de grande valia para avaliar a eficiência do direcionamento, ou seja, a capacidade de superar os sistemas de defesa e excreção e concentrar-se no alvo desejado, nesse caso, o tumor.

Estes experimentos foram realizados em triplicata, utilizando seis camundongos (três saudáveis e três induzidos) e os resultados estão ilustrados nos Gráficos 1 e 2, onde os resultados são expressos em percentagem de dose por órgão (MELERO, 2008; SA et al., 2012).

Gráfico 1 – Biodistribuição de NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc duas horas após administração em camundongos Balb/c nude saudios (órgão x %dose/órgão)



Fonte: A autora, 2017.

Os resultados mostram que as nanopartículas radiomarcadas (NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc) circulam no sangue, como observado pela captação do pool sanguíneo e no coração. De modo geral, essa captação pode estar associada à ligação às proteínas plasmáticas, em particular a albumina. Os valores, ainda que inferiores a 10% da captação, representam importante dado, pois demonstra a afinidade sem alteração da estrutura das proteínas plasmáticas, o que poderia

ocasionar a filtração pelo baço, fato corroborado inclusive pelo valor de captação esplênica semelhante ao valor encontrado no coração e no pool sanguíneo (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015).

As NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc são captadas pelos rins indicando uma depuração por filtração renal, como via de excreção mais ativa. Esse fator é esperado, uma vez que houve a conjugação de um quelante com alta hidrofiliabilidade, o DTPA. O ^{99m}Tc-DTPA, como já dito anteriormente, é um radiofarmáco utilizado rotineiramente na prática clínica, para avaliação da função renal, devido a sua distribuição ser essencialmente extracelular.

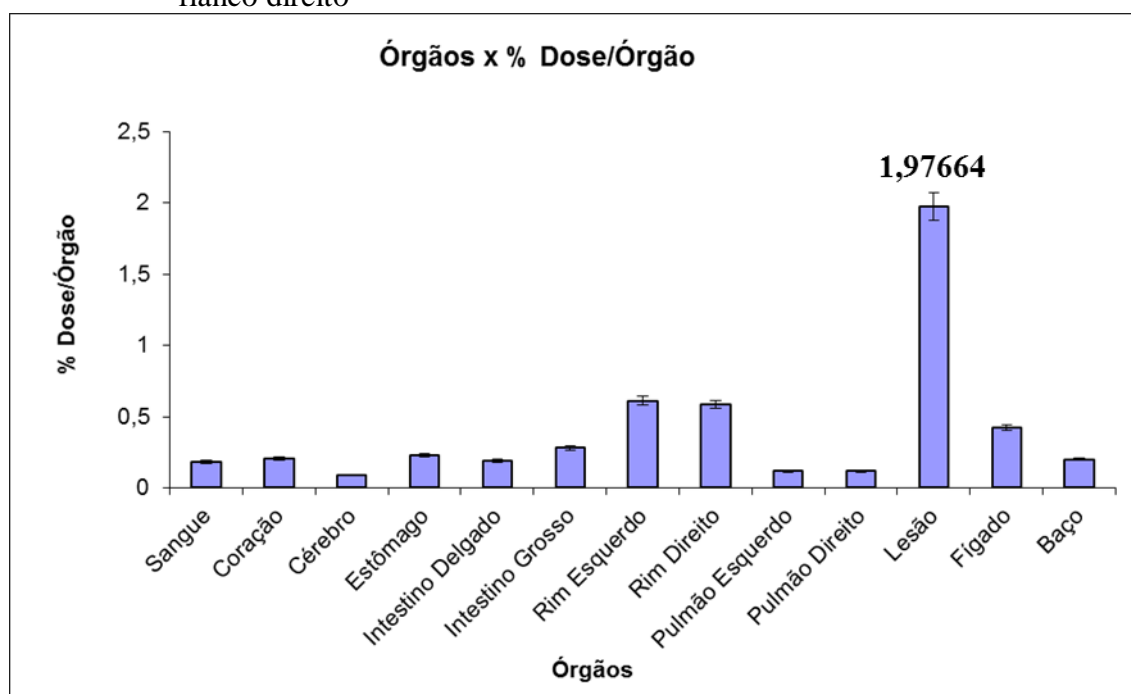
Foi observado um acentuado clearance sanguíneo. O clearance sanguíneo é necessário para minimizar a radioatividade no tecido não alvo. A razão da constante de ligação do nanorradiofarmáco no receptor alvo deve ser rápida e a razão de dissociação lenta. Dessa forma, o acúmulo da radiação no tecido alvo pode ser maximizado (LIU; EDWARDS, 1999). Assim, a excreção renal acentuada, propicia seu uso em humanos, com especial enfoque na redução da dose radioativa em órgãos sadios e representa importante aspecto toxicológico, em especial em casos de hiperdosagem, onde a administração de um diurético de alça (como furosemida) aumentaria a eliminação e, conseqüentemente, reduziria os efeitos tóxicos.

Mister se faz ressaltar, que uma quantidade significativa foi captada pelo intestino delgado. Essa captação pelo intestino deve-se provavelmente, a um segundo processo de excreção; entero-hepático, corroborado também pela captação pelo intestino grosso (OUDE MUNNINK et al., 2010). Uma segunda explicação seria devido à presença de receptores HER2 no intestino responsáveis pelo reconhecimento desse anticorpo e conseqüente acumulação (ALIREZAPOUR et al., 2014; LUB-DE HOOGE et al., 2004; TRAN et al., 2007).

Um dado apresentado e de grande importância foi relativo a captação pelo fígado, o qual apresenta grande afinidade pelas nanopartículas, incluindo as NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc. A baixa captação pelo fígado representa especial vantagem para o sistema desenvolvido pois corrobora a capacidade desse sistema em “enganar” o sistema mononuclear fagocítico (SMF). De modo geral, o grande problema no uso clínico de nanopartículas vem sendo a sua alta captação pelo SMF. Essa captação, além de gerar uma imagem com muitos artefatos, é responsável pela remoção de aproximadamente 80% das nanopartículas da corrente sanguínea. Além disso, a sensibilização do SMF gera uma resposta imunogênica levando a uma maior captação em administrações posteriores, levando ao aumento da dose. Em casos de radiofarmacos o aumento da dose representa aumento da radiação associada e conseqüentemente diminuição da segurança clínico-sanitária. Assim, sistemas que não são

reconhecidos pelo SMF são de extrema importância para o desenvolvimento de nanorradiofármacos para aplicação em humanos (PATEL; MOGHIMI, 1998; SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010; TENZER et al., 2013). O não reconhecimento da NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc pelo sistema SMF pode ser explicado pela inserção do anticorpo TZB as nanopartículas, o qual exerce um efeito protetor, evitando que sejam reconhecidas pelas células de Kupffer (ALIREZAPOUR et al., 2014; LUB-DE HOOGE et al., 2004; OUDE MUNNINK et al., 2010; TRAN et al., 2007).

Gráfico 2 – Biodistribuição de NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc duas horas após administração em camundongos Balb/c nude com xenoinxerto de tumor de mama no flanco direito



Fonte: A autora, 2017.

Um importante dado é referente a acumulação no tumor (1,97664 μ Ci), o que significa 37,98% (Gráfico 2). Esse valor é obtido principalmente pelo aumento do efeito EPR assim como o transporte facilitado das NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc pelas fenestrações do tumor (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015). Ambos esses efeitos eram esperados pelo sistema desenvolvido e uma vantagem sobre os fármacos convencionais. Isso representa excepcional biodirecionamento e corrobora o *targeting* intracelular da nanopartícula desenvolvida. Em termos de radiofármacos essa é uma característica desejada, pois diminui a irradiação de tecidos saudáveis e possibilita uma farmacoterapia mais eficiente, com a possibilidade de uma redução da dose de radiação global administrada ao paciente, aumentando dessa forma a

segurança de uso desses radiofármacos. No caso das NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc, a alta captação, ainda que em modelo xenoenxertado, possibilita a translação do uso para humanos, com excepcional superioridade ao radiofármacos convencionalmente em uso, que apresentam em média de 10-25% de captação pelo órgão alvo (SAHA, 2010).

Um fator importante é a passagem pela barreira hematoencefálica, que em termos de radiofarmacos é um ponto sensível. De maneira geral, os radiofármacos são desenvolvidos de modo a não ultrapassarem a barreira hemoencefálica, dada a sensibilidade do tecido cerebral à radiação. No caso em questão, a quantidade de NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc captada pelo cérebro foi considerada desprezível (< 0,1%), isso corrobora que, embora a nanopartícula só apresente 7 nm de tamanho, a química utilizada na sua decoração possibilitou a impermeabilidade à barreira hematoencefálica e permite seu uso em segurança na clínica.

Os resultados obtidos com as NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc podem ser comparados com resultados obtidos com NP de TZB em poli (ácido glutâmico) (PLA) e Montmorilonita, assim como a biodistribuição do fármaco TZB na sua forma livre. Tanto a NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc como a NP de PLA Montmorilonita, ambas utilizando TZB, são equivalentes, demonstrando a eficácia dos sistemas nanoestruturados em detectar o câncer de mama. A NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc apresenta, por sua vez, duas grandes vantagens frente as nanopartículas poliméricas com Montmorilonita, são elas: a) menor captação pelo cérebro; b) maior captação pelos rins, ambos os parâmetros requeridos para avaliação da segurança das nanopartículas (SARCINELLI et al., 2016).

Um outro dado importante é a comparação com o fármaco puro o qual possui alta captação intestinal (corroborando os dados de efeitos adversos) assim como baixa excreção renal, aumentando assim seu efeitos tóxicos. Assim, a comparação entre a nanopartícula NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc, a nanopartícula polimérica e fármaco puro corroboram a maior eficácia NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc, em particular pelo seu tamanho, forma e por sua interação intracelular, o que não é observado nos outros dois sistemas.

4.5 Imagem SPECT

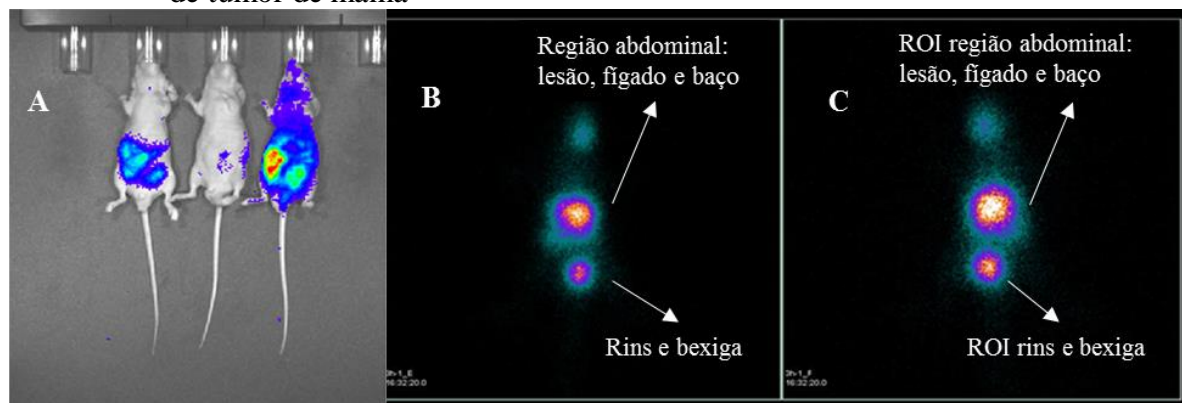
A imagem SPECT corrobora o sucesso do uso da NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc como agente de imagem molecular a ser utilizado em Medicina Nuclear para câncer de mama.

Nas imagens ilustradas na Figura 24, visualiza-se três regiões hipercaptantes, onde a primeira, no topo (cabeça dos camundongos fêmeas) é o ponto residual no local da injeção (administração intraocular). Foi utilizada a administração intraocular devido à facilidade de acesso, assim como sua intercomparação com a via endovenosa, essa última a mais utilizada para aplicação de radiofármacos (CERQUEIRA-COUTINHO et al., 2017).

A imagem mais proeminente no meio corresponde à lesão tumoral, como confirmado pela localização correspondente com a respectiva imagem de bioluminescência obtida com D-luciferina (Figura 24, legenda A). Esse resultado é consistente com os dados de biodistribuição mostrados no Gráfico 2, indicando que a maior contribuição é devida à concentração de NPM-TZB-^{99m}Tc na lesão, mas não é possível excluir a possibilidade de alguma contribuição do fígado e do baço encontrados na mesma região (abdominal).

A terceira região de captação foi atribuída a rins e bexiga, conforme esperado, uma vez que os nanorradiofármacos são eliminados por via renal nas primeiras 2 horas, o que foi corroborado pelos dados de biodistribuição (Gráficos 1 e 2). Foi realizada também uma imagem da região de ROI (Figura 24, legenda C).

Figura 24 – Imagens SPECT comparadas a imagem por biofluorescência com xenoinxerto de tumor de mama



Legenda: A - em comparação com a imagem de biofluorescência com D-luciferina; B - camundongos com xenoinxerto de tumor de mama injetadas com NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc; C - A região de ROI calculada é também mostrada.

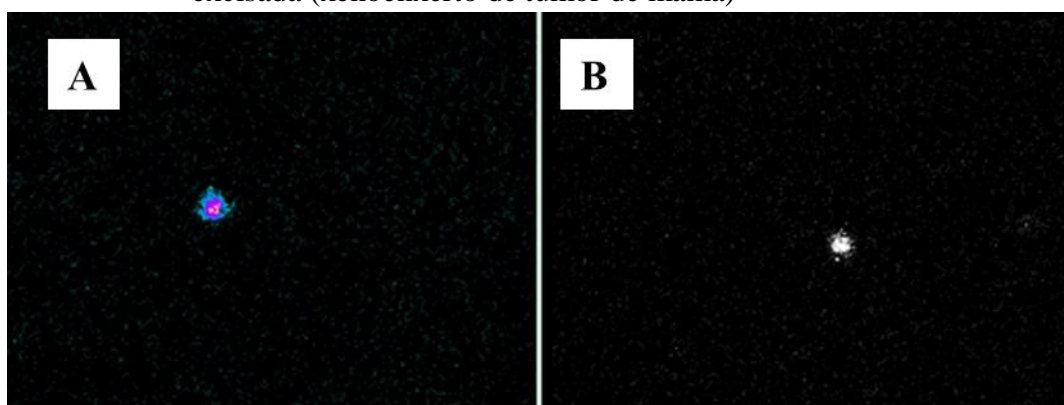
Fonte: A autora, 2017.

Na imagem de bioluminescência os camundongos estão em decúbito dorsal, portanto, a lesão está em seu lado direito. Nas imagens SPECT, a imagem é inversa, portanto, na imagem a lesão aparece ao lado esquerdo.

Para confirmação da captação pelo tumor, a lesão foi excisada quatro horas após a administração intraocular e realizada imagem por SPECT (Figura 25), demonstrando a

potencialidade da NPM-DTPA-TZB marcada com Tecnécio-99m (nanorradiofármaco). Apesar da quantidade significativa de radioatividade medida confirmar a concentração seletiva de partículas de NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc no tumor xenotransplantado, o tamanho da área marcada foi significativamente menor do que o da imagem de bioluminescência obtida por injeção de D-luciferina marcada com TZB.

Figura 25 – Imagem SPECT comparada a imagem biofluorescência da lesão excisada (xenoenxerto de tumor de mama)



Legenda: A - em comparação com a imagem de fluorescência; B - após 4 horas de administração do complexo NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc em camundongos.

Fonte: A autora, 2017.

Foi demonstrado, inequivocamente, por métodos de imagem e de biodistribuição a eficácia do sistema nanoparticulado intracelular desenvolvido (NPM-DTPA-TZB-^{99m}Tc). A captação pela lesão alvo (câncer de mama), a baixa captação por órgãos sentinelas, tais como fígado e baço e a manutenção da excreção renal com baixa excreção entero-hepática, corroboram a qualidade do sistema proposto e fortalecem o uso das nanopartículas na Radiofarmácia e na Medicina Nuclear.

CONCLUSÃO

A obtenção das nanopartículas de óxido de ferro por termodecomposição foi eficaz. Sua caracterização por TEM e HRTEM demonstra uma dispersão de tamanho entre 7-10 nm. A sucessiva conjugação da NPM com DTPA e TZB e sua posterior marcação com Tecnécio-99m, foi definitivamente bem sucedida como demonstrado no controle de qualidade da marcação, apresentando um percentual maior que 97%, como no estudo de biodistribuição devido à alta seletividade do complexo pelo xenoenxerto de tumor de mama de células MCF-7 induzidos em camundongos Balb/c nude e quase ausência de captação em camundongos saudáveis, gerando um promissor nanorradiofármaco para diagnóstico *in vivo* de câncer de mama.

O sucesso da funcionalização da NPM com DTPA e TZB é uma metodologia promissora, sendo necessários estudos aprofundados tanto de imagem quanto efeitos toxicológicos para confirmar a segurança e adequação do nanocomplexo tanto para diagnóstico com Tecnécio-99m e outros radionuclídeos, como PET, com Gálio-68, e para terapia, com Rênio-186 e Rênio-188, e estudos das NPM-DTPA-TZB, utilizando imagem de Ressonância Magnética (IRM).

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, A. et al. Proteins involved in HER2 signalling pathway, their relations and influence on metastasis-free survival in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab in adjuvant setting. *J. Cancer*, v. 8, n. 1, p. 131-139, Jan. 2017.
- AHN, B. C. Personalized medicine based on theranostic radioiodine molecular imaging for differentiated thyroid cancer. *BioMed Res. Int.*, v. 2016, Apr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1680464>>. Acesso em: 12 jan. 2017.
- AKTOLUN, C.; BAYHAN, H.; KIR, M. Clinical experience with Tc-99m MIBI imaging in patients with malignant tumors: preliminary results and comparison with Tl-201. *Clin. Nucl. Med.*, v. 17, p. 171-176, 1992.
- ALAM, F. et al. Unique roles of nanotechnology in medicine and cancer-II. *Indian J. Cancer*, v. 52, n. 1, p. 1-9, 2015.
- ALBERNAZ, M. S. et al. Radiolabelled nanohydroxyapatite with 99mTc: perspectives to nanoradiopharmaceuticals construction. *Artif. Cells, Nanomed. Biotechnol.*, v. 42, n. 2, p. 88-91, Apr. 2014.
- ALIREZAPOUR, B. et al. Preclinical evaluation of [111In]-DOTA-trastuzumab for clinical trials. *J. Cancer Res. Ther.*, v. 10, n. 1, p. 112-120, 2014.
- ALMEIDA, R. S. et al. Can quality control of radiopharmaceuticals be done using water and ethanol? *Adv. Sci. Lett.*, v. 10, n. 1, p. 140-142, May 2012.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures*. 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2016.
- ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. *Quím. Nova*, v. 30, p. 1484-1490, 2007.
- ARRIORTUA, O. K. et al. Antitumor magnetic hyperthermia induced by RGD-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles, in an experimental model of colorectal liver metástases. *Beilstein J. Nanotechnol.*, v. 7, p. 1532-1542, Oct. 2016.
- AZIZ, F. et al. Novel route synthesis of porous and solid gold nanoparticles for investigating their comparative performance as contrast agent in computed tomography scan and effect on liver and kidney function. *Int. J. Nanomed.*, v. 27, n. 12, p. 1555-1563, Feb. 2017.
- BADAN, G. M. et al. Complete internal audit of a mammography service in a reference institution for breast imaging. *Radiol. Bras.*, v. 47, n. 2, p. 74-78, Mar./Abr. 2014.

- BAILEY, T. A. et al. Mechanisms of Trastuzumab resistance in ErbB2-driven breast cancer and newer opportunities to overcome therapy resistance. *J. Carcinog.*, v. 10, n. 28, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3243087/>> . Acesso em: 31 dez. 2016.
- BARCELLOS-HOFF, M. H.; LYDEN, D.; WANG, T. C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, v. 13, n. 7, p. 511-518, Jul. 2013.
- BAROK, M. et al. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol. Cancer Ther.*, v. 6, p. 2065–2072, 2007.
- BARTELINK, H. The changing landscape in radiotherapy for breast cancer: lessons from long term follow-up in some European breast cancer trials. *Radiother. Oncol.*, v. 121, n. 3, p. 348-356, 2016.
- BASS, T. Z. et al. In vivo evaluation of a novel format of a bivalent HER3-targeting and albumin-binding therapeutic affibody construct. *Sci. Rep.*, v. 7, p. 43118, Feb. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5322329/pdf/srep43118.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2017.
- BIAN, T. et al. Metaplastic carcinoma of the breast: Imaging and pathological features. *Oncol. Lett.*, v. 12, p. 3975-3980, 2016.
- BIGGEMANN, D. et al. High-resolution transmission electron microscopy study of nanostructured hydroxyapatite. *Microsc. Microanal.*, v. 14, n. 5, p. 433-438, Oct. 2008.
- BISHT, G. et al. Synthesis, characterization, and study of in vitro cytotoxicity of zno-fe₃o₄ magnetic composite nanoparticles in human breast cancer cell line (MDA-MB-231) and mouse fibroblast (NIH 3T3). *Nanoscale Res. Lett.*, v. 11, n. 537, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5135709/pdf/11671_2016_Article_1734.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.*, v. 33, n. 9, p. 941-951, Sep. 2015.
- BLUMGART, H. L.; YENS, O. C. Studies on the velocity of blood flow: I. The method utilized. *J. Clin. Invest.*, v. 4, n. 1, p.1-13, 1926.
- BOMBARDIERI, E. et al. Imaging of neuroendocrine tumours with gamma-emitting radiopharmaceuticals. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 54, n. 1, p. 3-15, Feb. 2010.
- BORDIM, A. et al. Nanoradiopharmaceuticals: development of labeling process for polymeric nanoparticles. *Analytical Oncol.*, v. 2, n. 1, p. 30-33, 2013.
- BRECHBIEL, M.W. Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 52, n. 2, p. 166-1173, Jun. 2008.
- BREM, R. F. et al. Breast-specific gamma imaging as an adjunct imaging modality for the diagnosis of breast cancer. *Radiology*, v. 247, p. 651-657, 2008.

BREUNIG, M.; BAUER, S.; GOEPFERICH, A. Polymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting? *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 68, n. 1, p. 112-128, Jan. 2008.

BRIX, D. M.; CLEMMENSEN, K. K. B.; KALLUNKI, T. When good turns bad: regulation of invasion and metastasis by ErbB2 receptor tyrosine kinase. *Cells*, v. 3, p. 53-78, 2014.

BROCHADO, P. M. D. S. C. *Nanotecnologia e a sua aplicação à terapêutica oncológica*. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

BUSTAMANTE, F. L. S. et al. Complexos ativados por hipóxia: uma estratégia para o combate ao câncer. *Rev. Virtual Quím.*, v. 1, n. 2, p. 138-148, 2009.

CADDOO, K. A. et al. Management of unusual histological types of breast cancer. *Oncologist*, v. 17, n. 9, p. 1135-1145, Sep. 2012.

CAMPEAU, R. J.; KRONEMER, K. A.; SUTHERLAND, C. M. Concordant uptake of Tc-99m sestamibi and Tl-201 in unsuspected breast tumor. *Clin. Nucl. Med.*, v. 17, p. 936-937, 1992.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. *Quím. Nova*, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CARUNTU, D. et al. Synthesis of variable-sized nanocrystals of Fe₃O₄ with high surface reactivity. *Chem. Mat.*, v. 16, n. 25, p. 5527-5534, 2004.

CERQUEIRA-COUTINHO, C. et al. Comparison of biodistribution profile of monoclonal antibodies nanoparticles and aptamers in rats with breast cancer. *Artif. Cells, Nanomed. Biotechnol.*, v. 45, n. 3, p. 598-601, May 2017.

CHIAVENNA, S. M.; JAWORSKI, J. P.; VENDRELL, A. State of the art in anti-cancer mAbs. *J. Biomed. Sci.*, v. 24, n. 15, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5319201/pdf/12929_2016_Article_311.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2017.

CHIEN, K. R. Herceptin and the heart- a molecular modifier of cardiac failure. *N. Engl. J. Med.*, v. 354, n. 8, p. 789-790, 2006.

CHO, K. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, 2008.

CHOI, Y. E.; KWAK, J. W.; PARK, J. W. Nanotechnology for early cancer detection. *Sensors (Basel)*, v. 10, n. 1, p. 428-455, 2010.

CIAPPELLANO, S. G. et al. In vitro toxicity assessment of oral nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 106, p. 381-401, Nov. 2016.

COELHO, B. F. et al. Nanoradiopharmaceuticals for bone cancer metastasis imaging. *Curr. Cancer Drug Targets*, v. 15, n. 5, p. 445-449, 2015.

- CONNROT, J. et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers Chem.*, v. 2, p. 105, Nov. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2014.00105/full>>. Acesso em: 18 nov. 2016.
- CORDEIRO, M. L. S. et al. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. *Rev. Saúde Ciênc. (On line)*, v. 3, n. 3, p. 252-262, 2014. Disponível em: <<http://www.ufcg.edu.br/revistasaudefciencia/index.php/RSC-UFCG/article/view/189/126>>. Acesso em: 11 out. 2016.
- DE ABREU, F. B.; WELLS, W. A.; TSONGALIS, G. J. The emerging role of the molecular diagnostics laboratory in breast cancer personalized medicine. *Am. J. Pathol.*, v. 183, n. 4, p. 1075-1083, Oct. 2013.
- DEL VECCHIO, S.; SALVATORE, M. ^{99m}Tc -MIBI in the evaluation of breast cancer biology. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 31, p. S88-S96, 2004.
- DELPY, Y. et al. DNA Methylation and cancer diagnosis. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 14, n. 7, p. 15029-15058, Jul. 2013.
- D'SOUZA, G. G.; WEISSIG, V. Subcellular targeting: a new frontier for drug-loaded pharmaceutical nanocarriers and the concept of the magic bullet. *Expert Opin. Drug Deliv.*, v. 6, n. 11, p. 1135-1148, Nov. 2009.
- DE SANTIS, C. et al. Breast Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J. Clin.*, v. 64, n. 1, p. 52-62, 2014.
- DI LEO, A. et al. New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe. *Breast*, v. 24, n. 4, p. 321-330, Aug. 2015.
- DI SIBIO, A. et al. Female breast cancer in Central and South America. *Cancer Epidemiol.*, v. 44, supl. 1, p. S110-S120, Sep. 2016.
- DING, C. et al. Recent advances in stimuli-responsive release function drug delivery systems for tumor treatment. *Molecules*, v. 21, n. 12, p. 30, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/12/1715/htm>>. Acesso em: 12 nov. 2016.
- DOKMANOVIC, M.; WU, W. J. Trastuzumab-induced HER2 phosphorylation: exploring the mechanisms and implications. *Receptors Clin. Investig.*, v. 1, n. 4, Nov. 2014. Disponível em: <http://www.smartscitech.com/index.php/rci/article/view/340/pdf_24>. Acesso em: 15 maio 2015.
- DUNCAN, R.; GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.*, v. 8, n. 6, p. 2101-2141, 2011.
- EARLY, P. J. Use of diagnostic radionuclides in medicine. *Health Phys.*, v. 69, n. 5, p. 649-661, 1995.

EDEM, P. E. et al. In Vivo radionuclide generators for diagnostics and therapy. *Bioinorg. Chem. Applic.*, v. 2016, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5183759/pdf/BCA2016-6148357.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

ELMORE, J. G. et al. Screening for Breast Cancer. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 293, n. 10, p. 1245-1256, Mar. 2005.

ELMORE, J. G.; KRAMER, B. S. Breast cancer screening: toward informed decisions. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 311, n. 13, p. 1298-1299, Mar. 2014.

Estrutura DTPA. Disponível em: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pentetic_acid>. Acesso em: 11 out. 2016.

FALCO, M. et al. Tumour biomarkers: homeostasis as a novel prognostic indicator. *Open Biol.*, v. 6, n. 12, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5204124/pdf/rsob-6-160254.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

FEKETE, S. et al. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *TrAC Trends Analyt. Chem.*, v. 42, p. 74-83, Jan. 2013.

FÉLIX, L. L. et al. Structural and magnetic properties of core-shell Au/Fe₃O₄ nanoparticles. *Sci. Rep.*, v. 7, Feb. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292710/pdf/srep41732.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

FELLER, L.; KHAMMISSA, R. A. G.; LEMMER, J. Biomechanical cell regulatory networks as complex adaptive systems in relation to câncer. *Cancer Cell Int.*, v. 17, n. 16, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5286848/pdf/12935_2017_Article_385.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2017.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, v. 136, n. 5, p. E359-E386, Mar. 2015.

FISZMAN, G. L.; JASNIS, M. A. Molecular mechanisms of trastuzumab resistance in HER2 over expressing breast cancer. *Int. J. Breast Cancer*, 2011, Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijbc/2011/352182/>>. Acesso em: 31 dez. 2016

FLOBBE, K. et al. The role of ultrasonography as an adjunct to mammography in the detection of breast cancer. a systematic review. *Eur. J. Cancer*, v. 28, n. 8, p. 1044-1050, May 2002.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V. Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 7, p. 2745-2788, 2010.

FOULKES, W. D.; SMITH, I.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 363, p. 1938-1948, 2010.

- FU, D. et al. Molecular classification of lobular carcinoma of the breast. *Sci. Rep.*, v. 7, n. 43265, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5355990/pdf/srep43265.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2017.
- GAJRIA, D.; CHANDARLAPATY, S. HER2-amplified breast cancer: Mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, v. 11, n. 2, p. 263-275, 2011.
- GAMMON, J. M.; DOLD, N. M.; JEWELL, C. M. Improving the clinical impact of biomaterials in cancer immunotherapy. *Oncotarget*, v. 7, n. 13, p. 15421-15443, 2016.
- GARNETT, M. C.; KALLINTERI, P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup. Med.*, v. 56, n. 5, p. 307-311, Aug. 2006.
- GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. pharm. Biopharm.*, v. 69, n. 1, p. 1-9, May 2008.
- GENENTECH, Herceptin[®] (Trastuzumab) in Early-Stage and Advanced Breast Cancer. Disponível em: <<https://www.gene.com/media/product-information/herceptin-breast>>. Acesso em: 29 ago. 2016.
- GENG, Y. et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotechnol.*, v. 2, n. 4, p. 249-255, Apr. 2007.
- GHAEMIMANESH, F. et al. Production and characterization of a novel monoclonal antibody against human sortilin. *Monocl. Antibodies Immunodiag. Immunother.*, v. 34, n. 6, p. 390-395, Dec. 2015.
- GHOLAMI, A.; ANIJ DAN, S. H. M. Development of ¹⁵³Sm-DTPA-SPION as a theranostic dual contrast agents in SPECT/MRI. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, v. 19, n. 10, p. 1056-1106, Oct. 2016.
- GHONCHEH, M.; MIRZAEI, M.; SALEHINIYA, H. Incidence and mortality of breast cancer and their relationship with the Human Development Index (HDI) in the World in 2012. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, v. 16, n. 18, p. 8439-8443, Dec. 2015.
- GLASGOW, M. D. K.; CHOUGULE, M. B. Recent Developments in Active Tumor Targeted Multifunctional Nanoparticles for Combination Chemotherapy in Cancer Treatment and Imaging. *J. Biomed. Nanotechnol.*, v. 11, n. 11, p. 1859-1898, Nov. 2015.
- GOLOVINA, Y. I. et al. Towards nanomedicines of the future: remote magnetomechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields. *J. Control. Release*, v. 10, n. 219, p. 43-60, 2015.
- GONZÁLEZ NIÑO, L. A. et al. Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev. Colomb. Cancerol.*, v. 11, n. 1, p. 40-57, 2007.
- GREEN, C. H. Technetium-99m production issues in the United Kingdom. *J. Med. Phys.*, v. 37, n. 2, p. 66-71, Apr./Jun. 2012.

GUIMARÃES, T. T. et al. Quality Control of Radiopharmaceutical ^{99m}Tc -MAG3. *Latin Am. J. Pharm.*, v. 30, n. 7, p. 1437-1439, Apr. 2011.

HAMOUEH, M. et al. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 60, n. 12, 1329-1346, 2008.

HARRELL, J. C. et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res. Treat.*, v. 132, n. 2, p. 523-535, Apr. 2012.

HERCEPTIN. Bula de remédio. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016.

HERTZ, S.; ROBERT, A.; EVANS, R. D. Radioactive iodine as an indicator in the study of thyroid physiology. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 38, p. 510-513, 1938.

HEYWANG-KÖBRUNNER, S. H. et al. *Deutsches Ärzteblatt Int.*, v. 105, n. 31-32, p. 541-547, Aug. 2008.

HOUSSAMI, N.; LORD, S. J.; CIATTO, S. Breast cancer screening: Emerging role of new imaging techniques as adjuncts to mammography. *Med. J. Aust.*, v. 190, n. 9, p. 493-498, May 2009.

HUBALEK, M. et al. Resistance to HER2-targeted therapy: mechanisms of trastuzumab resistance and possible strategies to overcome unresponsiveness to treatment. *Wien. Med. Wochenschr.*, v. 160, n. 19-20, p. 506-512, Nov. 2010.

INOUE, K.; FRY, E. A. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. *Biomarkers Cancer*, v. 8, p. 25-42, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2015a. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas_incidencia_cancer_2012.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil*. Rio de Janeiro, 2015b. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_deteccao_precoce_final.pdf>. Acesso em: 30 dez. 2016.

JALILIAN, A. R. et al. Production and clinical applications of radiopharmaceuticals and medical radioisotopes in Iran. *Semin. Nucl. Med.*, v. 46, n. 4, p. 350-358, Jul. 2016.

KANNAN, R. M. et al. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. *J. Intern. Med.*, v. 276, n. 6, p. 579-617, Dec. 2014.

KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KAZEMI, T. et al. Characterization of novel murine monoclonal antibodies directed against the extracellular domain of human HER2 tyrosine kinase receptor. *Hybridoma*, v. 30, n. 4, p. 347-353, Aug. 2011.

KHALID, A. et al. Strategies for improving drug delivery: nanocarriers and microenvironmental priming. *Expert Opin. Drug Deliv.*, v. 11, p. 1-13, Oct. 2016.

KHALIL, M. M. et al. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int. J. Mol. Imaging*, v. 11, 2011. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijmi/2011/796025/>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

KHANDHAR, A. P. et al. Tuning surface coatings of optimized magnetite nanoparticle tracers for in vivo Magnetic Particle Imaging. *IEEE Trans. Magn.*, v. 51, n. 2, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4403869/pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

KHODABANDEHLOO, H.; ZAHEDNASAB, H.; HAFEZ, A. A. Nanocarriers usage for drug delivery in cancer therapy. *Iran. J. Cancer Prev.*, v. 9, n. 2, p. e3966, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4951761/pdf/ijcp-09-02-3966.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2016.

KIM, D. J. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against recombinant tethered follicle-stimulating hormone from Japanese eel *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 233, p. 8-15, Jul. 2016.

KIM, S. et al. Engineered polymers for advanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 71, n. 3, p. 420-30, Mar. 2009.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, p. 495-497, Aug. 1975.

KUŁAKOWSKI, A. The contribution of Marie Skłodowska-Curie to the development of modern oncology. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 400, p.1583-1586, 2011.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B*, v. 75, n. 1, p. 1-18, Jan. 2010.

LAM, T. et al. Fabricating water dispersible superparamagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications through ligand exchange and direct conjugation. *Nanomaterials*, v. 6, n. 100, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-4991/6/6/100>>. Acesso em: 28 dez. 2016

LANDA, E. R. Buried treasure to buried waste: the rise and fall of the radium industry. *Q. Colorado School Mines*, v. 82, n. 2, p. 77, 1987.

LEHMAN, B. D.; PIETENPOL, J. Identifications and use of biomarkers in treatment strategies for triple negative breast cancers subtypes. *J. Pathol.*, v. 232, p. 142-150, 2014.

LEI, L.; WANG, X.; CHEN, Z. PET/CT Imaging for Monitoring Recurrence and Evaluating Response to Treatment in Breast Cancer. *Adv. Clin. Exp. Med.*, v. 25, n. 2, p. 377-382, Mar./Apr. 2016.

LI, L. et al. Recent advances of biomaterials in biotherapy. *Regen. Biomaterials*, v. 3, n. 2, p. 99-105, Jun. 2016.

LI, Y. et al. *In situ* study on atomic mechanism of melting and freezing of single bismuth nanoparticles. *Nat. Commun.*, v. 8, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316836/pdf/ncomms14462.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2017.

LIGIÉRO, T. B. et al. Monoclonal Antibodies: application in radiopharmacy. *Curr. Radiopharm.*, v. 6, p. 231-248, 2013.

_____. Diagnosing gastrointestinal stromal tumours by single photon emission computed tomography using nano-radiopharmaceuticals based on bevacizumab monoclonal antibody. *Biomed. Phys. Eng. Express*, v. 2, n. 4, 2016.

LIM, J. K. et al. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Letters*, v. 8, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3846652/pdf/1556-276X-8-381.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2016.

LIPOWSKA, M. et al. Al18F-NODA-butyric acid: Biological evaluation of a new PET renal radiotracer. *Nucl. Med. Biol.*, v. 41, p. 248-253, 2014.

LIU, S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.*, v. 33, n. 7, p. 445-461, Set. 2004.

LIU, S.; EDWARDS, D. S. 99mTc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.*, v. 99, n. 9, p. 2235-2268, Sep. 1999.

LIU, X. M.; KIM, J. K. Solvothermal synthesis and magnetic properties of magnetite nanoplatelet. *Mat. Letters*, v. 63, p. 428-430, 2009.

LO, P.; WOLFSON, B.; ZHOU, Q. Cancer stem cells and early stage basal-like breast cancer. *World J. Obstetr. Gynecol.*, v. 5, n. 2, 150-161, May 2016.

LOI, S. et al. HER2-overexpressing breast cancer: time for the cure with less chemotherapy? *Curr. Opin. Oncol.*, v. 23, n. 6, p. 547-558, 2011.

LÖNDAHL, J. et al. Do nanoparticles provide a new opportunity for diagnosis of distal airspace disease? *Int. J. Nanomedicine*, v. 12, p. 41-51, 2017.

LUB-DE HOOGE, M. N. et al. Preclinical characterisation of ¹¹¹IN-DTPA-trastuzumab. *Br. J. Radiol.*, v. 143, p. 99-106, 2004.

- LV, Q. et al. Molecular Mechanisms and Translational Therapies for Human Epidermal Receptor 2 Positive Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, n. 12, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187895/pdf/ijms-17-02095.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2017.
- MACIEJCZYK, A. New prognostic factors in breast cancer. *Adv. Clin. Exp. Med.*, v. 22, n. 1, p. 5-15, Jan./Feb. 2013.
- MACMILLAN, R. D.; MCCULLEY, S. J. Oncoplastic Breast Surgery: what, when and for whom? *Curr. Breast Cancer Rep.*, v. 8, p. 112–117, 2016.
- MALDONADO-CAMARGO, L.; UNNI, M.; RINALDI, C. Magnetic characterization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Methods Mol. Biol.*, v. 1570, p. 47-71, 2017.
- MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.*, v. 10, n. 10, p. 955-960, Nov. 2010.
- MAROJA, F. E. D. et al. *Potencialidades da magnetita/quitosana para marcadores biológicos*. 2012. Trabalho apresentado no 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal, 2012.
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, R.; ESTELRICH, J.; BUSQUETS, M.A. Liposomes Loaded with Hydrophobic Iron Oxide Nanoparticles: Suitable T2 Contrast Agents for MRI. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, n. 8, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5000607/pdf/ijms-17-01209.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2016.
- MARUK, A.Y.; BRUSKIN, A. B.; KODINA, G. E. Novel ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals with Bifunctional Chelating Agents. *Radiochemistry*, v. 53, n. 4, p. 341-353, 2011.
- MCGUIRE, S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv. Nutrition*, v. 7, p. 418-419, 2016.
- MELERO, L. T. U. H. *Preparação e Padronização de metodologia de marcação “in vivo” e estudo de biodistribuição do Octreotídeo-[tyr3]-HYNIC/EDDA/Tricina-[^{99m}Tc]*. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.
- MERTZ, T. M.; HARCY, V.; ROBERTS, S. A. Risks at the DNA Replication Fork: Effects upon Carcinogenesis and Tumor Heterogeneity. *Genes (Basel)*, v. 8, n. 46, Jan. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5295039/pdf/genes-08-00046.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2017.
- MI, Y. et al. Application of nanotechnology to cancer radiotherapy. *Cancer Nanotechnol.*, v. 7, n. 11, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5167776/pdf/12645_2016_Article_24.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2017.

MICHEN, B. et al. Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: Characterizing the size and colloidal state of nanoparticles. *Scientific Reports*, v. 12, n. 5, May 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4428270/pdf/srep09793.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2016.

MISTRY, D. A. H.; FRENCH, P. W. Circulating Phospholipids as Biomarkers of Breast Cancer: a review. *Breast Cancer*, v. 10, p. 191-196, Nov. 2016.

MOLLARD, S. et al. In Vivo Bioluminescence Tomography for Monitoring Breast Tumor Growth and Metastatic Spreading: comparative study and mathematical modeling. *Scientific Reports*, v. 6, Nov. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5095884/pdf/srep36173.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2016.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 385, n. 1-2p. 113-142, Feb. 2010.

MUNEEAWANG, P.; SIRISATHITKUL, C. Size measurement of nanoparticle assembly using multilevel segmented TEM images. *J. Nanomaterials*, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jnm/2015/790508/>> Acesso em: 22 nov. 2016.

NAHAS, G. R. et al. A Perspective of Immunotherapy for Breast Cancer: Lessons Learned and Forward Directions for All Cancers Supplementary Issue: Targeted Therapies in Breast Cancer Treatment. *Breast Cancer (Auckl)*, v. 9, supl. 2, p. 35-43, 2015.

NAHTA, R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol.*, v. 2012, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3512309/pdf/ISRN.ONCOLOGY2012-428062.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2015.

NAHTA, R.; ESTEVA, F. J. HER-2-Targeted Therapy: lessons learned and future directions. *Clin. Cancer Res.*, v. 9, p. 5078–5084, 2003.

_____. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett.*, v. 232, n. 2, p. 123–138, Feb. 2006.

NALLATHAMBY, P. D. et al. New surface radiolabeling schemes of super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for biodistribution studies. *Nanoscale*, v. 7, n. 15, p. 6545-6555, 2015.

NAOUM, G. E. et al. Role of nanotechnology and gene delivery systems in TRAIL-based therapies. *Ecancermedicalscience*, v. 10, n. 660, p. 1-17, 2016.

NAQOS, N. et al. Mucinous carcinoma of the breast: clinical, biological and evolutive profile. *Cancer Radiother.*, v. 20, n. 8, p. 801-804, Dec. 2016.

NARAYANAN, R.; DALTON, J. T. Androgen Receptor: A Complex Therapeutic Target for Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, v. 8, n. 12, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187506/>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

NIE, S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine*, v. 5, n. 4, p. 523-528, Jun. 2010.

NIE, S. et al. Nanotechnology Applications in Cancer. *Ann. Rev. Biomed.*, v. 9, p. 257-288, Apr. 2007.

NORTH, B. J. et al. Enhancement of pomalidomide anti-tumor response with ACY-241, a selective HDAC6 inhibitor. *PLoS One*, v. 12, n. 3, Mar. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5338861/pdf/pone.0173507.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

NOTHACKER, M. et al. Early detection of breast cancer: benefits and risks of supplemental breast ultrasound in asymptomatic women with mammographically dense breast tissue. *BMC Cancer*, v. 9, p. 335, Sep. 2009.

NUNE, S. K. et al. Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opin. Drug Deliv.*, v. 6, n. 11, p. 1175-1194, Nov. 2009.

OAK RIDGE NATIONAL LABORATORIES. Availability of radioactive isotopes. *Science*, v. 10, p. 391, 1945.

OJER, P. et al. Toxicity evaluation of nanocarriers for the oral delivery of macromolecular drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 97, p. 206-217, Nov. 2015.

OKUBO, Y. et al. Neuroendocrine Differentiation in Breast Cancer: Clinicopathological Significance of Bcl-2 Positive Solid Papillary Carcinoma. *Case Rep. Med.*, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5220427/pdf/CRIM2016-9501410.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2017.

OLIVEIRA, L. C. et al. Aplicações das nanopartículas lipídicas no tratamento de tumores sólidos: revisão de literatura. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 58, n. 4, p. 695-701, maio 2012.

OUDE MUNNICK, T. H. et al. Trastuzumab pharmacokinetics influenced by extent human epidermal growth factor receptor 2 – positive tumor load. *J. Clin. Oncol.*, v. 28, n. 21, p. e355-e356, 2010.

PALMERO, E. I. et al. Screening for germline BRCA1, BRCA2, TP53 and CHEK2 mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a population-based study from Southern Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, v. 39, n. 2, p. 210-222, 2016.

PANAGIOTOPOULOS, N. et al. Magnetic particle imaging: current developments and future directions. *Int. J. Nanomed.*, v. 22, n. 10, p. 3097-3114, 2015.

PATEL, H. M.; MOGHIMI, S. M. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system - The concept of tissue specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 32, p. 45-60, Jun.1998.

PATRICIO, B. F. C.; ALBERNAZ, M. S.; SANTOS-OLIVEIRA, R. Development of Nanoradiopharmaceuticals by Labeling Polymer Nanoparticles with Tc-99m. *World J. Nucl. Med.*, v. 12, n. 1, p. 24-26, Jan./Mar. 2013.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 353, p. 1659-1672, 2005.

PILLAI, M. R. A.; DASH, A.; KNAPP JUNIOR, F. F. Radionuclide Generators: a ready source diagnostic and therapeutic radionuclides for nuclear medicine applications. In: SANTOS-OLIVEIRA, R. (Ed.). *Radiopharmaceuticals: applications, insights and future*. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2016. p. 63-118.

PINTO, S. R. et al. In vivo studies: comparing the administration via and the impact on the biodistribution of radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.*, v. 41, n. 9, p. 772-774, Oct. 2014.

PIRANDA, D. N.; FREITAS-ALVES, D. R.; VIANNA-JORGE, R. Farmacogenética e Implicações Terapêuticas no Câncer de Mama. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 59, n. 3, p. 449-452, 2013.

POHLAND, M. et al. Biocompatibility of very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles in murine organotypic hippocampal slice cultures and the role of microglia. *Int. J. Nanomed.*, v. 27, n. 12, p. 1577-1591, Feb. 2017.

POHLMANN, P. R.; MAYER, I. A.; MERNAUGH, R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 15, n. 24, Dec. 2009.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, v.12, n. 5, p. R68, 2010.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.*, v. 5, p. 5-23, 2011.

PRODUTO da GE Healthcare. Disponível em: <http://www3.gehealthcare.com/en/products/categories/molecular_imaging/pet-ct>. Acesso em: 02 out. 2017.

PRODUTO da GE Millennium. Disponível em: <<http://nuclearcamera.com/nuclear-products/ge-millennium-mg-mc-myosight/>>. Acesso em: 02 out. 2017.

PU, X.; YE, Y.; WU, X. Development and Validation of Risk Models and Molecular Diagnostics to Permit Personalized Management of Cancer. *Cancer*, v. 120, n. 1, p. 11-19, Jan. 2014.

QIAN, C. N. et al. Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. *Chin. J. Cancer*, v. 35, n. 10, Jan. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4706692/pdf/40880_2015_Article_70.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.

RADOMSKA, A.; LESZCZYSZYN, J.; RADOMSKI, M. W. The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. *Adv. Clin. Exp. Med.*, v. 25, n. 1, p. 151-162, 2016.

REN, Z. et al. Prognostic factors in patients with metastatic breast cancer at the time of diagnosis. *Pathol. Res. Pract.*, v. 210, n. 5, p. 301-306, May 2014.

- RIVENBARK; A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer. Challenges for personalized Medicine. *Am. J. Pathol.*, v. 183, p. 1113-1124, 2013.
- ROGERS, H. B. et al. Exploiting Size-Dependent Drag and Magnetic Forces for Size-Specific Separation of Magnetic Nanoparticles. *Int. J. Molec. Sci.*, v. 16, n. 8, p. 20001-20019, Aug. 2015.
- SÁ, L. T. M. et al. Aptamer-based nanoparticles for cancer targeting. *J. Drug Target.*, v. 21, n. 5, p. 427-434, 2013.
- _____. Biodistribution of nanoparticles: Initial considerations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 70, p. 602-604, 2012.
- SABATIER, R. et al. Invasive ductal breast carcinoma with predominant intraductal component: clinicopathological features and prognosis. *Breast*, v. 27, p. 8-14, Jun. 2016.
- SABNIS, S. et al. Superparamagnetic reconstituted high-density lipoprotein nanocarriers for magnetically guided drug delivery. *Int. J. Nanomed.*, v. 12, p. 1453-1464, Feb. 2017.
- SAHA, G. B. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 6. ed. Nova Iorque: Springer Verlag, 2010.
- SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A.V. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release*, v. 145, n. 3, p. 182-195, Aug. 2010.
- SAME, S. et al. Radiolabeled theranostics: magnetic and gold nanoparticles. *BioImpacts*, v. 6, n. 3, p. 169-181, 2016.
- SANCHES, S. M.; SILVA, J. M. A. Interação entre Especialidades: Miocardiopatia Dilatada e Neoplasia de Mama HER2 Positiva. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 94, n. 1, p. e11-e15, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abc/v94n1/26.pdf>>. Acesso em: 31 dez. 2016.
- SANTOS-OLIVEIRA, R. *Comparação das diversas tecnologias de imagem disponíveis atualmente no mundo e em uso em medicina*. Rio de Janeiro: Instituto de Engenharia Nuclear, 2016. Notas de aula.
- _____. Nanoradiopharmaceuticals: is that the future for nuclear medicine? *Curr. Radiopharm.*, v. 4, n. 2, p. 140-143, Apr. 2011.
- _____. *Radiofarmácia: com monografia de radiofármacos extraída de farmacopeia internacional*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- SANTOS-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. História da radiofarmácia e as implicações da Emenda Constitucional N. 49. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, v. 44, n. 3, jul./set. 2008.
- SARCINELLI, M. A. et al. Nanoradiopharmaceuticals for breast cancer imaging: development, characterization, and imaging in induced animals. *Onco Targets Ther.*, v. 9, p. 5847-5854, 2016.
- SAUBERMANN, S. *The curative action of radium*. New York: Radium Limited, 1914. 113p.

SCHÖNECKER, S. et al. Treatment planning and evaluation of gated radiotherapy in left-sided breast cancer patients using the Catalyst™/ Sentinel™ system for deep inspiration breath-hold (DIBH). *Radiation Oncol.*, v. 11, n. 1, p. 143, Oct. 2016.

SCHROEDER, H.W. JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 125, supl. 2, p. S41-S52, Feb. 2010.

SELLI, C.; DIXON, J. M.; SIMS, A. H. Accurate prediction of response to endocrine therapy in breast cancer patients: current and future biomarkers. *Breast Cancer Res.*, v. 18, n. 1, p. 118, Dec. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5131493/pdf/13058_2016_Article_779.pdf>. Acesso em: 30 dez. 2016.

SENGUPTA, S. et al. Evaluation of Clinico-Radio-Pathological Features of Tubular Adenoma of Breast: a study of ten cases with histopathological differential diagnosis. *Iran. J. Pathol.*, v. 10, n. 1, p. 17-22, 2015.

SHI, Y. et al. Second-generation proteasome inhibitor carfilzomib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity and apoptosis in breast cancer cells. *Oncotarget*, v. 7, n. 45, p. 73697-73710, Sep. 2016.

SHUKLA, A. K.; KUMAR, U. Positron emission tomography: an overview. *J. Med. Phys.*, v. 31, n. 1, p. 13-21, Jan./Mar. 2006.

SIAFAKA, P. I. et al. Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: current status and uses. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, n. 1440, p. 40, 2016.

SIMPSON, F. E. *Radium therapy*. St. Louis: C.V. Mosby, 1922.

SINN, H. P.; KREIPEB, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care*, v. 8, p. 149-154, 2013.

SITTERBERG, J. et al. Utilizing atomic force microscopy for the characterization of nanoscale drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 74, n. 1, p. 2-13, Jan. 2010.

SNEIDER, A. et al. Remotely Triggered Nano-Theranostics For Cancer Applications. *Nanotheranostics*, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2017.

STERN, M.; HERRMANN, R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v. 54, n. 1, p. 11-29, 2005.

SUNDBERG, M.W. et al. Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA. *J. Med. Chem.*, v. 17, n. 12, p. 1304-1307, 1974.

SURENDIRAN, A. et al. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J. Med. Res.*, v. 130, n. 6, p. 689-701, Dec. 2009.

SWAMINATHAN, S.; RIMINTON, S. Monoclonal antibody therapy for non-malignant disease. *Aust. Prescr.*, v. 29, n. 5, p. 130-136, Oct. 2006.

TAGAMI, T.; OZEKI, T. Recent trends in clinical trials related to carrier-based drugs. *J. Pharm. Sci.*, v. 106, n. 9, p. 2219-2226, 2017.

TAUSSIG, L. Carcinoma of the tongue and its treatment with radium. *Radium*, v. 2, p. 9-17, 1923.

TENZER, S. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature nanotechnol.*, v. 8, n. 10, p. 772-781, Sep. 2013.

THAKUR, M. K.; WOZNIAK, A. J. Spotlight on necitumumab in the treatment of non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, v. 8, p. 13-19, Feb. 2017.

TIETZE, R.; ALEXIOU, C. Improving cancer imaging with magnetic nanoparticles: where are we now? *Nanomedicine*, v. 12, n. 3, p. 167-170, 2017.

TING, G. et al. Nanotargeted radionuclides for cancer nuclear imaging and internal radiotherapy. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2010, 2010.

TOMA, S. H. et al. Pushing the surface-enhanced Raman scattering analyses sensitivity by magnetic concentration: a simple non core-shell approach. *Anal. Chim. Acta*, v. 855, p. 70-75, Jan. 2015.

TONG, H. V. et al. Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. *EBioMedicine*, v. 15, p. 12-23, Feb. 2017.

TRAN, T. et al. (99m)Tc-maEEE-Z(HER2:342), an Affibody molecule-based tracer for the detection of HER2 expression in malignant tumors. *Bioconjugate Chem.*, v. 18, n. 6, p. 1956-1964, 2007.

UCHIYAMA, M. K. *Estudo de nanopartículas de ouro e magnetita voltadas para medicina diagnóstica*. 2015. 222 f. Dissertação (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

UCHIYAMA, M. K. et al. *Nanoparticles and their use as MRI contrast agente*. BR1020150130317, 08 jun. 2015.

_____. Ultrasmall cationic superparamagnetic iron oxide nanoparticles as nontoxic and efficient MRI contrast agent and magnetic-targeting tool. *Int. J. Nanomed.*, v. 10, p. 4731-4746, 2015.

VALLABHAJOSULA, S. Molecular Imaging: radiopharmaceuticals for PET and SPECT. *J. Nucl. Med.*, v. 51, n. 4, p. 660-661, Apr. 2010.

VALLABHAJOSULA, S.; SOLNES, L.; VALLABHAJOSULA, B. A Broad Overview of Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals and Clinical Applications: what is new? *Semin. Nucl. Med.*, v. 41, n. 4, p. 246-264, Jul. 2011.

VERCHER-CONEJERO, J. L. et al. Positron Emission Tomography in Breast Cancer. *Diagnostics*, v. 5, n. 1, p. 61-83, 2015.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. *Ann. Oncol.*, n. 23, supl. 10, p. x207–x210, 2012.

VU, T.; CLARET, F. X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Frontiers Oncol. Cancer Mol. Targets Ther.*, v. 2, n. 62, p. 1-6, Jun. 2012.

WANG, G.; TOMASELLA, F. P. Ion-pairing HPLC methods to determine EDTA and DTPA in small molecule and biological pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Anal.*, v. 6, p. 150-156, 2016.

WANG, W. et al. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Frontiers Immunol.*, v. 6, n. 368, Jul. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515552/pdf/fimmu-06-00368.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2015.

WANG, W. J. et al. Thermo-sensitive polymer nanospheres as a smart plugging agent for shale gas drilling operations. *Pet Sci.*, v. 14, n. 1, p. 116-125, Dec. 2017.

WANG, W.; WANG, E. Q.; BALTHASAR, J. P. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharm. Ther.*, v. 84, n. 5, p. 548-558, 2008.

WANG, X. X. et al. Difference in characteristics and outcomes between medullary breast carcinoma and invasive ductal carcinoma: a population based study from SEER 18 database. *Oncotarget*. v. 7, n. 16, p. 22665–22673, Apr. 2016.

WANG, Z. et al. Active targeting theranostic iron oxide nanoparticles for MRI and magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation of lung cancer. *Biomaterials*, v. 127, p. 25-35, mar. 2017.

WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL. *Breast cancer statistics*. 2012. Disponível em: <<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol. Oncol.*, v. 4, n. 3, p. 192-208, Jun. 2010.

WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Rev. Immunol.*, v. 10, n. 5, p. 317-327, May 2010.

WESOŁA, M.; JELEŃ, M. The Diagnostic Efficiency of Fine Needle Aspiration Biopsy in Breast Cancers – Review. *Adv. Clin. Exp. Med.*, v. 22, n. 6, p. 887-892, 2013.

WESTON, A.; HARRIS, C. C. Multistage carcinogenesis. In: KUFÉ, D. W. et al. (Ed.). *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6.ed. Hamilton: B.C. Decker, 2003. Cap. 17. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>> Acesso em: 30 dez. 2016.

WILLIS, R. E. Targeted Cancer Therapy: vital oncogenes and a new molecular genetic paradigm for cancer initiation progression and treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, n. 9, Sep. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037825/pdf/ijms-17-01552.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

WONG, D. J. L.; HURVITZ, S. A. Recent advances in the development of anti-HER2 antibodies and antibody-drug conjugates. *Ann. Translation. Med.*, v. 2, n. 12, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260046/pdf/atm-02-12-122.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

WYMANT, J. M. et al. The Role of BCA2 in the Endocytic Trafficking of EGFR and Significance as a Prognostic Biomarker in Cancer. *J. Cancer*, v. 7, n. 15, p. 2388-2407, 2016.

YAKOH, A. et al. Biomedical probes based on inorganic nanoparticles for electrochemical and optical spectroscopy applications. *Sensors*, v. 15, n. 9, p. 21427-21477, 2015.

YANG, C. S.; WANG, H. Cancer preventive activities of tea catechins. *Molecules*, v. 21, n. 12, Dec. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/12/1679>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

YANG, H. Y. et al. Biodegradable mesoporous delivery system for biomineralization precursors. *Int. J. Nanomed.*, v. 12, p. 839-854, Jan. 2017.

YANG, Y. L. et al. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: an update. *Arch. Pathol. Laboratory Med.*, v. 140, n. 8, p. 799-805, Aug. 2016.

YU, K. et al. Personalized chemotherapy selection for breast cancer using gene expression profiles. *Sci. Reports*, v. 7, n. 43294, Mar. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep43294>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

ZDROJEWICZ, Z. et al. Medical applications of nanotechnology. *Postepy hig. med. dosw*, n. 69, p. 1196-1204, 2015.

ZHANG, X. Y.; ZHANG, P. Y. Nanotechnology for multimodality treatment of cancer. *Oncol. Lett.*, v. 12, p. 4883-4886, 2016.

ZHANG, Y.; KOHLER, N.; ZHANG, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, v. 23, p. 1553-1561, 2002.

ZHOU, Z.; HICK, D. G. HER2 - Amplification or Overexpression in Upper GI Tract and Breast Cancer with Clinical Diagnosis and Treatment. In: SIREGAR, Y. *Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic*. Croácia: In Tech, 2013. Cap. 3.

ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética no uso dos animais CEUA-UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de agosto de 2013.

Ofício nº 606/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof Ralph Santos Oliveira**
Faculdade de Farmácia
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
Processo nº 23076.020578/2013-27

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Desenvolvimento de Nanorradiofármacos.**"


Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério; Animais: ratos;
Linhagem: Wistar; Idade: 10 semanas; Peso: 180-
300 dias; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de
animais: 30.

Atenciosamente,


Profª Tahia Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924

ANEXO B - Artigos submetidos e publicados

Artigo submetido

Submission Confirmation for "TRASTUZUMABE TARGETED AND TECHNETIUM-99M LABELED IRON OXIDE NANOPARTICLE FOR BREAST CANCER IMAGING BY SINGLE PHOTON EMISSION COMPUTED TOMOGRAPHY AND POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY" has been received by journal Advanced Functional Materials. The manuscript number for your submission is adfm.201606786. (23/12/2016)

Artigos completos publicados em periódicos

Dos REIS, S. R. R.; VIEIRA, T. O.; SILVA, L. F. C.; PINTO, SUYENE ROCHA; **ALBERNAZ, M. S.**; SANTOS-OLIVEIRA, R. PET Radiopharmaceuticals and PET/CT Technology: Comparative Numbers of Brazil, India, Canada and Latin America.. AJNMR: Austin Journal of Nuclear Medicine and Radiotherapy, v. 3, p. 1-2, 2016.

SARCINELLI, M. A.; **ALBERNAZ, M. S.**; SZWED, MARZENA; ISCAIFE, A.; LEITE, K. R. M.; JUNQUEIRA, M. S.; BERNARDES, E. S.; SILVA, E. O.; TAVARES, MIB ; SANTOS-OLIVEIRA, R. Nano-radiopharmaceuticals for Breast Cancer Imaging: Development, Characterization and Imaging in Inducted Animals. ONCOTARGETS THER **JCR**, v. x, p. x, 2016.

LIGIERO, T. B.; CERQUEIRA-COUTINHO, CRISTAL; **ALBERNAZ, MS**; SZWED, M.; BERNARDES, E. S. ; WASSERMAN, MAV; SANTOS-OLIVEIRA, R. Diagnosing gastrointestinal stromal tumours by single photon emission computed tomography using nanoradiopharmaceuticals based on bevacizumab monoclonal antibody. Biomedical Physics & Engineering Express, v. 4, p. x-xx, 2016.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

PASCUAL, L.; CERQUEIRA, C. S.; **ALBERNAZ, M. S.**; MISSAILIDIS, SOTIRIS; SOARES BERNARDES, EMERSON; SANCENON, F.; MARTINEZ-MANEZ, R. ; SANTOS-OLIVEIRA, R. DNA-gated material as simultaneous drug delivery and radioimaging toll. In: Nano-Portugal, 2016, Braga. Anais do Nano_portugal, 2016. v. 1. p. x-x.

Resumos publicados em anais de congressos

ALBERNAZ, M. S.; ROCHA PINTO, SUYENNE; Dos REIS, S. R. R.; SANTOS DO CARMO, FAGNER; TOMA, S. H.; ARAKI, K.; SANTOS-OLIVEIRA, R. Estudo de marcação de nanopartícula magnética de trastuzumabe: aplicação clínica em câncer de mama. In: 8 Riopharma, 2015, Rio de Janeiro. Anais do 8 Riopharma, 2015. v. 1. p. x-xx.

LIGIERO, THAIS; **ALBERNAZ, M. S.**; WASSERMAN, MAV; SANTOS-OLIVEIRA, R. Estudos Pré-Clínicos do nanorradiofármaco à base de bevacizumabe marcado dom Tecnécio-99m para diagnóstico de Tumor Estriomal Gastrointestinal. In: XXIX

Congresso Brasileiro de Medicina Nuclear, 2015, Rio de Janeiro. Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Nuclear, 2015. v. x. p. x-xx.

LIGIERO, THAIS; **ALBERNAZ, M. S.**; SANTOS DO CARMO, FAGNER; ROCHA PINTO, SUYENNE; Dos REIS, S. R. R.; WASSERMAN, MAV; SANTOS-OLIVEIRA, R. Desenvolvimento de Nanorradiofármaco à base de bevacizumabe marcado com tecnécio-99m para diagnóstico precoce do tumor estromal gastrointestinal. In: 8 Riopharma, 2015, Rio de Janeiro. Anais do 8 Riopharma. v. 1. p. x-xx.

ALBERNAZ, Marta de Souza; ROCHA PINTO, SUYENNE; Dos REIS, S. R. R.; CARMO, F. S.; TOMA, S. H.; ARAKI, K.; SANTOS-OLIVEIRA, R. Desenvolvimento de Nanorradiofármaco à base de Magnetita e Processo de Decoração com Anticorpo Monoclonal para Determinação de Alvo Intracelular: Uso para Câncer de Mama. In: XXV Congresso ALASBIMN, 2015, Punta del Leste. Anais do XXV Congresso ALASBIMN, 2015. v. 1. p. x-xx.

TORRES BERDEGUEZ M.B; THOMAS, S.; PIAZZA, P. R.; SANCHEZ, T. A.; RAMOS, S. M. O.; **ALBERNAZ, M. S.**; VASCONCELLOS DE SÁ L.; MILIAN, F. M.; SILVA, A. X. Radiosinoviotese aplicada à artropatia hemofílica: Metodologia de planejamento de dose através de RM 3D. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE EDUCACIÓN, CAPACITACIÓN Y GESTIÓN DEL CONOCIMIENTO EN ENERGÍA NUCLEAR Y SUS APLICACIONES, 2015, Cusco. SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE EDUCACIÓN, CAPACITACIÓN Y GESTIÓN DEL CONOCIMIENTO EN ENERGÍA NUCLEAR Y SUS APLICACIONES, 2015.