



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS PARA TRANSPORTE DE  
AGENTES DE CONTRASTE E DETEÇÃO  
ESPECÍFICA DE CANCRO**

Daniel Fernandes Dornelles

Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

FARO

2012



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS PARA TRANSPORTE DE  
AGENTES DE CONTRASTE E DETEÇÃO  
ESPECÍFICA DE CANCRO**

Daniel Fernandes Dornelles

Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

**Orientadores:**

Dr. Nuno Rodrigues dos Santos

Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Rosa da Costa

FARO

2012

“ Aquilo que persistimos em fazer, torna-se fácil, não porque a natureza da tarefa tenha mudado mas, porque a nossa capacidade aumentou”

Hebert G. Grant

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Universidade do Algarve

MSc Thesis in Biomedical Sciences

Universidade do Algarve

As opiniões expressas nesta publicação são da exclusiva responsabilidade do seu Autor

The contents of this dissertation are of the exclusive responsibility of the Author

( Daniel Fernandes Dornelles )

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer aos meus orientadores neste projeto que desde o início demonstraram uma grande boa vontade para ajudar-me com este desafio. Agradeço ao Dr. Nuno Rodrigues dos Santos pela disponibilidade em todos os momentos em que foi preciso, por ajudar a esclarecer minhas dúvidas e pelo apoio constante.

Agradeço a Dra. Ana Costa pela orientação e pelo apoio para levar avante este trabalho. Ao Dr. Jorge Martins pela orientação e ajuda com as experiências.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório Fábio Paiva, Monica Fernandes, Marinela Ghezze, Ricardo Silva, Faiza Al-Dalaly e Patrícia Cavaco, pela amizade e por toda ajuda, apoio e orientação..

Aos colegas de todos os outros laboratórios por onde passei e que foram muito prestativos em todos os momentos que foram precisos.

Aos amigos e familiares pelo apoio e incentivo.

A todos o meu muito obrigado!

## RESUMO

Nas últimas décadas têm se desenvolvido nanotecnologias de potencial utilidade para a medicina, incluindo o desenvolvimento de nanopartículas. Para serem eficazes como elementos de diagnóstico e terapêutica, as nanopartículas, devem ser capazes de encapsular compostos no seu interior, ser estáveis, ter a capacidade para libertar drogas e agentes de contraste no tecido-alvo, e responder a estímulos fisiológicos específicos como as mudanças do pH e temperatura. Para além disso, não devem ser tóxicas para o organismo e preferencialmente, devem ser dirigidas para um alvo específico.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar nanopartículas para transporte de meio de contraste e deteção do cancro.

Com este fim, nanopartículas (NPs) com 1-metilpireno, usado como substituto de um agente de contraste, foram preparadas e conjugadas com o anticorpo monoclonal SM3 e C595 contra a proteína MUC1 que se encontra sobre-expressa na superfície das células MDA-MB-468 de cancro de mama.

Foram feitos testes de citotoxicidade através do método MTT utilizando a linha celular Jurkat, sendo que os resultados comprovaram que as NPs não eram tóxicas para as células.

Afim de analisar a reatividade dos anticorpos SM3 e C595, ambos reconhecendo epítomos da glicoproteína MUC1, contra as células MDA-MB-468, foi feita imunofluorescência por citometria de fluxo. Os resultados confirmaram que o anticorpo monoclonal SM3 é mais específico para MUC1 do que o mAb C595. De seguida, foi realizada microscopia de imunofluorescência com a linha celular MDA-MB-468, utilizando NPs com 1-metilpireno e conjugadas com os mesmos anticorpos contra MUC1. Os resultados revelaram maior intensidade de fluorescência em células MDA-MB-468 incubadas com NPs conjugadas com o mAb C595 do que com NPs conjugadas com o mAb SM3.

Através de análises de fluorometria, verificamos que as NP-MEPI e NP-MEPI-SM3 quando imersas em DMEM, mantêm a sua integridade conforme foi observado no espectro de fluorescência do 1-metilpireno na forma de monómero e de excímero. Os tamanhos das NPs preparadas ao longo do projecto foram medidos para avaliar possíveis alterações no seu diâmetro. Verificou-se que as NPs apresentavam valores de diâmetro variáveis entre cada preparação.

Testes de biodistribuição das NPs foram efectuados em ratinhos Swiss Nude, nos quais foram injectadas nanopartículas ou directamente num tumor subcutâneo derivado de células MDA-MB-468 previamente injetadas ou na circulação sanguínea. Os resultados demonstraram que o fluoróforo chegou a certas zonas do tecido tumoral e nos órgãos como fígado e baço.

Como conclusão, verificámos que as NPs conjugadas com anticorpos monoclonais são estáveis em meio fisiológico e têm maior afinidade para células que expressam a proteína-alvo do anticorpo. No entanto, verifica-se que será preciso mais investigações nesta área, principalmente em estudos de biodistribuição *in vivo*, pois existem muitos factores que podem influenciar os resultados tanto na preparação das nanopartículas como na sua aplicação em meios biológicos.

## ABSTRACT

Over the last decades, it has been developed nanotechnologies with potential utility in medicine, including the development of nanoparticles. In order to be effective as diagnostic and therapeutic elements, nanoparticles must be able to encapsulate compounds and present stability, the ability to release drugs and contrast agents in target tissues, and respond to specific physiological stimuli such as changes in pH and temperature. Furthermore, they should not be toxic to the organism and, preferably, should be directed to a specific target.

The aim of this study was to develop and optimize nanoparticles for transport of a contrast agent to be used in cancer detection.

With this purpose, nanoparticles with 1-methylpyrene, used instead of a contrast agent, were prepared and conjugated with the monoclonal antibodies SM3 and C595 against MUC1 protein, which is overexpressed on the surface of the MDA-MB-468 breast cancer cells.

Cytotoxicity tests were performed by the MTT method using Jurkat cell lines, and the results showed that the NPs were not toxic to the cells.

In order to analyze the reactivity of the monoclonal antibodies C595 and SM3, both recognizing the epitopes of the glycoprotein MUC1, against MDA-MB-468 cells, immunofluorescence by flow cytometry were performed. The results confirmed that SM3 monoclonal antibody was more specific to MUC1 than C595. Immunofluorescence microscopy were performed on the MDA-MB-468 cell line using nanoparticles loaded with 1-methylpyrene and conjugated with the same antibodies against MUC. The results showed greater fluorescence intensity on the MDA-MB-468 cells incubated with NPs conjugated with C595 monoclonal antibody than with SM3.

Through analysis of fluorometry, we verified that the NP-MEPI and NP-MEPI-SM3 when immersed in DMEM, maintains its integrity as it was observed in

fluorescence spectrum of 1-methylpyrene as monomer and excimer. The size of the NPs was measured during the project to evaluate possible alterations in its diameter. We verified that the NPs had variable diameter values between each batch.

Biodistribution tests with NPs were performed using Swiss Nude mice in which nanoparticles were injected directly into the tumor derived from subcutaneous MDA-MB-468 cells that were previously injected or into the bloodstream. The results showed that the fluorophore reached certain areas of tumor tissue and organs such as liver and spleen.

In conclusion, we have found that NPs conjugated with monoclonal antibodies are stable in physiological environment and have greater affinity for cells expressing the antibody target protein. However, it appears that more research in this field will be necessary, especially *in vivo* biodistribution studies as there are many factors that can influence the results, both in the preparation of such nanoparticles and their application in biological medium.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiv
ÍNDICE DE TABELAS .....	xvi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	xvii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
1. CANCRO E O SEU DIAGNÓSTICO PRECOCE .....	1
1.1. CANCRO DE MAMA .....	2
1.2. DETECÇÃO DE CANCRO PRECOCE .....	3
1.2.1. TÉCNICAS DE DETECÇÃO ONCOLÓGICA MAIS UTILIZADAS.....	3
1.2.2. VANTAGENS E LACUNAS DA IMAGIOLOGIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.....	4
1.3. EXPRESSÃO DE MUC1 EM CANCRO DE MAMA .....	4
1.3.1. UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MUC1 COMO INSTRUMENTOS PARA ALVEJAR CANCRO DE MAMA .....	6
2. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE ORGANIZAÇÃO ESPONTÂNEA .....	7
2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	7
2.1.1. TIPOS DE NANOPARTÍCULAS.....	8
2.1.1.1. MICELAS POLIMÉRICAS .....	10
2.2. DIMENSÕES DAS NANOPARTÍCULAS .....	12

2.3. ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM MEIO FISIOLÓGICO.....	12
3. UTILIDADE DE NANOPARTÍCULAS PARA DETETAR OU TRATAR CANCRO .....	13
3.1. NANOPARTÍCULAS COMO AGENTE DE CONTRASTE .....	15
3.2. DROGAS QUIMIOTERÁPICAS .....	16
3.3. MOLÉCULAS FLUORESCENTES.....	17
4. BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS .....	18
4.1. TEMPO DE VIDA NA CORRENTE SANGUÍNEA.....	18
4.2. EXCREÇÃO .....	19
4.3. ORGÃOS ATINGIDOS.....	19
4.4. TOXICIDADE.....	20
5. OBJECTIVOS DO PROJECTO.....	20
<b>CAPÍTULO II - MATERIAIS &amp; MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
1. SÍNTESE DE MICELAS E CONJUGADOS .....	21
2 . LINHAS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA .....	23
2.1. LINHAS CELULARES .....	23
2.2. CULTURA CELULAR .....	23
3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NPs ATRAVÉS DO ENSAIO MTT .....	24
4. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS mAbs PARA MUC1.....	25
4.1. DETEÇÃO DE MUC1 ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO .....	25
4.2. VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INTERNALIZAÇÃO DAS NPS CONJUGADAS COM mAb SM3 E C595 NAS CÉLULAS MDA-MB-468 ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA.....	26
5. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	26

5.1. ANÁLISE DA ESTABILIDADE EM ÁGUA, SORO DE VITELA E DMEM.....	26
5.1.1. EM H <sub>2</sub> O.....	27
5.1.2. EM SORO.....	27
5.1.3. EM DMEM.....	27
5.2. ANÁLISE FLUORIMÉTRICA PARA VERIFICAR A ENCAPSULAÇÃO DO MONÓMERO.....	28
6. ANÁLISE DA DIMENSÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	28
6.1. DLS - DISPERSÃO DINÂMICA DE LUZ.....	28
6.2. MICROSCOPIA ÓPTICA .....	28
7. AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS IN VIVO .....	29
7.1. RATINHOS.....	29
7.2. INJEÇÃO DE NP-MEPI NA VEIA DA CAUDA DOS RATINHOS.....	29
7.3. INDUÇÃO DE TUMOR EM RATINHOS .....	29
7.4. INOCULAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NO TUMOR.....	30
<b>CAPÍTULO III – RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
1. ANÁLISE DA TOXICIDADE DAS NPs ATRAVÉS DO ENSAIO MTT .....	30
2. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	31
2.1. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NP E NP-MEPI EM ÁGUA E EM SORO DE VITELA .....	31
2.2. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NPs, NP-MEPI E NP-MEPI-SM3 EM DMEM.....	32
2.3. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NPs EM ÁGUA À TEMPERATURA AMBIENTE E EM ÁGUA E SORO DE VITELA A 37 °C .....	33

2.4. RESULTADO DA ANÁLISE FLUORIMÉTRICA PARA VERIFICAR A ENCAPSULAÇÃO DO MONÓMERO.....	34
3. ANÁLISE DA DIMENSÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	36
4. VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO mAb SM3 PARA A PROTEÍNA MUC1 ....	39
4.1. ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DO mAb SM3 PARA A PROTEÍNA MUC1 ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO .....	39
4.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA NA INTERNALIZAÇÃO DAS NPS COM mAb SM3 NAS CÉLULAS MDA-MB-468 ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA.....	41
5. BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS IN VIVO.....	44
5.1. ANÁLISE DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NPs INJETADAS NA VEIA DA CAUDA DE RATINHOS SWISS NUDE .....	44
5.2. ANÁLISE DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NPS INJETADAS EM TUMORES INDUZIDOS EM RATINHOS SWISS NUDE.....	46
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO .....	48
1. TESTE DE CITOTOXICIDADE IN VITRO .....	49
2. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS mAbs PARA MUC1.....	50
3. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS PARTÍCULAS .....	51
4. ANÁLISE DO DIÂMETRO DAS NANOPARTÍCULAS .....	52
5. AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS IN VIVO .....	53
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	56
APENDICE A.....	64

APENDICE B..... 67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Expressão de MU1 em células normais e células com cancro .....	<b>6</b>
<b>FIGURA 2</b> – Esquema com ilustração da formação de uma micela polimérica .....	<b>11</b>
<b>FIGURA 3</b> – Possíveis vias de degradação e desestabilização de nanopartículas poliméricas na circulação sanguínea.....	<b>13</b>
<b>FIGURA 4</b> – Teste MTT - análise in vitro da toxicidade das NPs para diferentes concentrações utilizando as células Jurkat.....	<b>31</b>
<b>FIGURAS 5</b> – Espectro da intensidade de fluorescência das NP-MEPI .....	<b>35</b>
<b>FIGURAS 6</b> – Espectro da intensidade de fluorescência das NP-MEPI-SM3 .....	<b>36</b>
<b>FIGURA 7</b> – Análise do volume celular (FSC-H) e complexidade interna (SSC-H) das células MDA-MB-468, MCF7 e 293T por citometria de fluxo .....	<b>39</b>
<b>FIGURA 8</b> – Análise de expressão de MUC-1 à superfície das células MDA-MB-468, MCF7 e 293T através do receptor da membrana celular MUC1 usando os mAbs C595 e SM3 por citometria de fluxo.....	<b>40</b>
<b>FIGURA 9</b> – Análise da capacidade dos mAbs C595 e SM3 detectarem por citometria de fluxo o receptor da membrana celular MUC1 em células MCF7 e MDA-MB-468.....	<b>41</b>
<b>FIGURA 10</b> – Células MDA-MB-468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno (NP-MEPI).....	<b>42</b>
<b>FIGURA 11</b> – Células MDA-MB-468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo C595 (NP-MEPI-C-595).....	<b>43</b>
<b>FIGURA 12</b> – Células MDA-MB 468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo SM3 (NPMEPI-SM3).....	<b>43</b>
<b>FIGURA 13</b> – Células MDA-MB 468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo SM3 (NP-MEPI-SM3) com volume igual ao mAb C595.....	<b>44</b>
<b>FIGURA 14</b> – Células MDA-MB-468 incubadas com nanopartículas carregadas	

com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo C595 (NP-MEPI-C595).....	44
<b>FIGURA 15</b> – Detecção da presença de NPs nos tecidos do baço do ratinho após injeção de NP-MEPI .....	45
<b>FIGURA 16</b> – Detecção da presença de NPs nos tecidos do fígado do ratinho após injeção de NP-MEPI.....	46
<b>FIGURA 17</b> – Análise da biodistribuição das NP-MEPI-SM3 injectadas nos tumores induzidos em ratinhos swiss nude – corte interno do tecido tumoral .....	47
<b>FIGURA 18</b> - Análise da biodistribuição das NP-MEPI-SM3 injectadas nos tumores induzidos em ratinhos Swiss Nude .....	47
<b>FIGURA 19</b> – Análise da biodistribuição das NP-MEPI injectadas nos tumores induzidos em ratinhos Swiss Nude - corte externo do tecido tumoral.....	48
<b>FIGURA 20</b> – Análise da biodistribuição da água injectada nos tumores induzidos em ratinhos Swiss Nude - corte externo do tecido tumoral.....	48
<b>FIGURA 21</b> - Gota de NP-MEPI pipetada sobre uma lamina de vidro .....	64
<b>FIGURA 22</b> - Gota de NP-MEPI pipetada sobre uma lamina de vidro.....	64
<b>FIGURA 23</b> - Gota de NP-MEPI-C595 pipetada sobre uma lamina de vidro.....	65
<b>FIGURA 24</b> - Gota de NP-MEPI-SM3 pipetada sobre uma lamina de vidro .....	65
<b>FIGURA 25</b> - Gota de NP-MEPI-SM3 pipetada sobre uma lamina de vidro.....	66
<b>FIGURA 26</b> – Ratinho Swiss Nude usado nas experiências de biodistribuição .....	67
<b>FIGURA 27</b> – Ratinho Swiss Nude usado nas experiências de biodistribuição. ....	67

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Tipos de nanopartículas.....	<b>9</b>
<b>TABELA 2</b> - Experiências realizadas com nanopartículas para tratamento do cancro.....	<b>14</b>
<b>TABELA 3</b> – Nanopartículas poliméricas em ensaios clínicos.....	<b>16</b>
<b>TABELA 4</b> – Avaliação da estabilidade das NP com e sem 1-metilpireno, em água e soro de vitela a temperatura de 37°C.....	<b>32</b>
<b>TABELA 5</b> – Avaliação da estabilidade das NPs, NP-MEPI e NP-MEPI-SM3, em DMEM a 37°C.....	<b>33</b>
<b>TABELA 6</b> – Avaliação da estabilidade das NPs em água a temperatura ambiente e em água e soro de vitela à temperatura de 37°C.....	<b>34</b>
<b>TABELA 7 (parte 1)</b> – Tamanho das nanopartículas (NPs) preparadas e medidas ao longo dos meses. ....	<b>37</b>
<b>TABELA 7 (parte 2)</b> – Tamanho das nanopartículas (NPs) preparadas e medidas ao longo dos meses.....	<b>38</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>cDTPA</b>	<i>Calcium Diethylene-Triamine-Pentaacetic Acid</i> com anticorpo SM3
<b>CS (PAA)</b>	Soro de vitela
<b>DLS</b>	Dispersão Dinâmica da luz
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>EPR</b>	Aumento da permeabilidade e retenção
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino
<b>FL-H</b>	Intensidade de fluorescência
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter intensity</i>
<b>GAM –PEs</b>	Anticorpo secundário cabra anti-IgG murino
<b>MRI</b>	Ressonância magnética
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio
<b>MUC 1</b>	Mucina 1
<b>NPMEPISM3</b>	Nanopartícula carregada com 1-metilpireno conjugada
<b>NPMEPY</b>	Nanopartícula carregada com 1-metilpireno
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>O.C.T.</b>	<i>Optimal cutting temperature</i>
<b>OD</b>	Densidade ótica final
<b>PDI</b>	Índice de polidispersão
<b>PEG</b>	Poli etileno glicol
<b>PEG-AC</b>	PEG-ácido oligocólico

<b>PET</b>	Tomografia por emissão de positrões
<b>PGA</b>	Poliglicolidos
<b>PLA</b>	Polilactidos
<b>PLGA</b>	Poli(lactidio-co-glicolidos)
<b>RES</b>	Sistema retículo endotelial
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>SPIONs</b>	Nanopartículas de óxido de ferro Superparamagnéticas
<b>SSC</b>	<i>Side scatter intensity</i>
<b>TL</b>	Transmission Light

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

### 1. CANCRO E O SEU DIAGNÓSTICO PRECOCE

Na lista das doenças que mais preocupam as autoridades de saúde a nível mundial, o cancro encontra-se nos primeiros lugares. Em termos estatísticos, a probabilidade de alguém desenvolver cancro ao longo da vida é de 50% para o homem e de 30% para a mulher. Devido ao avanço do conhecimento científico e um maior esclarecimento das populações certos tipos de cancro têm a sua incidência diminuída, enquanto que a incidência de outros cancros tem permanecido estável ou mesmo aumentado (Shanker et al., 2011).

Um dos obstáculos para o desenvolvimento de terapias adequadas contra doenças malignas, encontra-se na dificuldade em diferenciar de forma consistente o tecido tumoral do tecido normal, e assim atingir o primeiro. O ambiente dos tumores sólidos diferencia-se dos tecidos normais no aspecto nutricional e metabólico e poderá ser portanto um factor de diferenciação a explorar (Makovitzki et al., 2009)

O pH ácido característico do microambiente de muitos tumores deve-se à produção de ácido láctico - em condições anaeróbicas e a hidrólise de ATP devido a um ambiente deficiente em energia. De acordo com a literatura, o pH extracelular do tecido tumoral é mais baixo do que o tecido normal, geralmente abaixo de 7.0 para o tecido tumoral e 7.4 para o tecido normal (Mahoney et al., 2003; Makovitzki et al., 2009; Liu et al., 2011) . Esta característica dos tecidos tumorais pode ser explorada para o desenvolvimento de terapias anti-tumorais específicas, como desenvolvido mais à frente.

Algumas características que não são encontradas em tecidos normais, são possíveis de observar na maioria dos tumores sólidos como uma angiogénese muito extensa, estrutura vascular e drenagem linfática - defeituosa, além da síntese de mediadores que aumentam a permeabilidade dos vasos. Este efeito, conhecido como aumento da permeabilidade e retenção (EPR) de macromoléculas e lípidos, fornece quantidades adequadas de nutrientes e

oxigénio para o crescimento do tecido tumoral, além de permitir a remoção dos resíduos decorrente do metabolismo celular ( Maeda et al., 2000; Schwoppe et al., 2010).

Os vasos sanguíneos dos tecidos tumorais são formados a partir de células endoteliais estimuladas pela secreção de moléculas pro-angiogénicas, como o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), produzidas pelas próprias células tumorais e também, por factores recrutados pela rede de vasos sanguíneos já existentes no hospedeiro (Potineni et al., 2003)

Estes vasos capilares formados ao redor do tumor estão desorganizados e são pouco funcionais, têm uma forma irregular e são muito permeáveis (Anderson et al., 2000; Potineni et al., 2003)

## **1.1. CANCRO DE MAMA**

O cancro de mama é o cancro mais frequente entre as mulheres e se encontra em segundo lugar na lista de causas de morte por cancro em mulheres, ficando somente atrás do cancro de pulmão. Com base em estudos estatísticos, estima-se que mais de 200.000 novos casos de cancro de mama foram diagnosticados nos Estados Unidos em 2010. Os resultados do tratamento do cancro de mama são variáveis e dependem muito da resposta à terapia aplicada ao tumor, bem como do subtipo, tamanho e da presença e envolvimento dos gânglios linfáticos (Lopez et al., 2008; Jemal et al., 2010).

É de extrema importância o estadio em que o cancro de mama é detectado, pois é actualmente, a fonte mais segura para prever a taxa de sobrevivência e o sucesso do tratamento dos pacientes com esta doença. Sendo assim, quanto mais cedo for iniciado o tratamento contra o cancro maiores são as chances de remissão e sobrevivência (Medarova et al., 2009).

## **1.2. DETECÇÃO DE CANCRO PRECOCE**

A oncologia defronta-se com muitos desafios, entre eles a necessidade de encontrar e aperfeiçoar meios para detetar o tumor numa fase inicial, pois como já foi dito, quanto mais cedo for descoberto maiores são as chances do tratamento ser bem sucedido (Moore et al., 2004).

A realidade é que em relação ao diagnóstico do cancro, este é muitas vezes descoberto, diagnosticado e tratado numa fase avançada, em que já invadiu e criou metástases em outras regiões do corpo (Nie et al, 2007), o que torna bastante premente a necessidade de desenvolver novos métodos de detecção de cancro.

### **1.2.1. TÉCNICAS DE DETECÇÃO ONCOLÓGICA MAIS UTILIZADAS**

Devido ao facto de haver uma necessidade de detectar e localizar o cancro o mais cedo possível, a utilização de imagens não invasivas do cancro são de grande importância, pois podem revelar não só a estrutura anatómica do tumor, como também, as suas propriedades bioquímicas e metabólicas (Nie et al, 2007).

A imagiologia por ressonância magnética tem evoluído ao ponto de ser considerada uma das mais poderosas técnicas de diagnóstico em radiologia clínica, fornecendo imagens tri-dimensionais dos tecidos vivos com resolução aproximada ao nível celular. É uma técnica não invasiva, não exige muito tempo para fazer o exame e não utiliza radioquímicos (Bridot et al, 2007; Torres et al, 2011).

Ao usar o conhecimento da estrutura e fisiologia diferenciada que caracteriza os tecidos tumorais, é possível, através da imagiologia molecular, conseguir desenvolver reagentes específicos para diagnosticar, tratar e monitorar o cancro (Bhang et al., 2011)

### **1.2.2. VANTAGENS E LACUNAS DA IMAGIOLOGIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Um dos grandes defeitos dos métodos atuais de diagnóstico para detecção do cancro é a pouca especificidade. Muitas modalidades de técnicas de imagens não fluorescentes in vivo utilizadas na clínica médica, como imagiologia por ressonância magnética (MRI) tomografia por emissão de positrões (PET) com 2-[F-18]-fluoro-2-deoxi-d-glucose (18F-FDG-PET), radiografia com raio x, ecografia a ultra som, além de muitas outras, não são seletivas em relação ao diagnóstico do cancro. São métodos pouco específicos e poucos sensíveis, sendo que, para além disso, grande parte destes métodos de diagnóstico têm custos financeiros muito altos (Frangioni, 2008; Fassa, 2008; Koolen et al., 2012).

O composto mais usado em PET, exame de imagiologia nuclear e que mimetiza a glucose, é o 18-FDG PET, o qual é capturado pelas células metabolicamente activas e não é metabolizado (Frangioni, 2008). Uma das vantagens do 18-FDG PET é a capacidade de apresentar a imagem da distribuição do composto em todo o corpo e poder assim, visionar procurar por áreas onde existe um alto consumo de glucose, como em tecidos tumorais ((Shankar et al., 2006). Não é o composto ideal para estes exames, pois também existem tecidos normais e órgãos com alto consumo de glucose, como o cérebro.

### **1.3. EXPRESSÃO DE MUC1 EM CANCRO DE MAMA**

A MUC 1 é uma glicoproteína da superfície celular pertencente à família das mucinas, que se expressa na matrix extracelular produzida por muitas células epiteliais glandulares e ductais e em algumas linhas celulares hematopoéticas. Devido à sua estrutura em forma de bastonete, a molécula estende-se por 100 a 200 nm acima da superfície, o que é 5 ou 10 vezes mais do que o comprimento da maioria das moléculas membranares. A sua localização

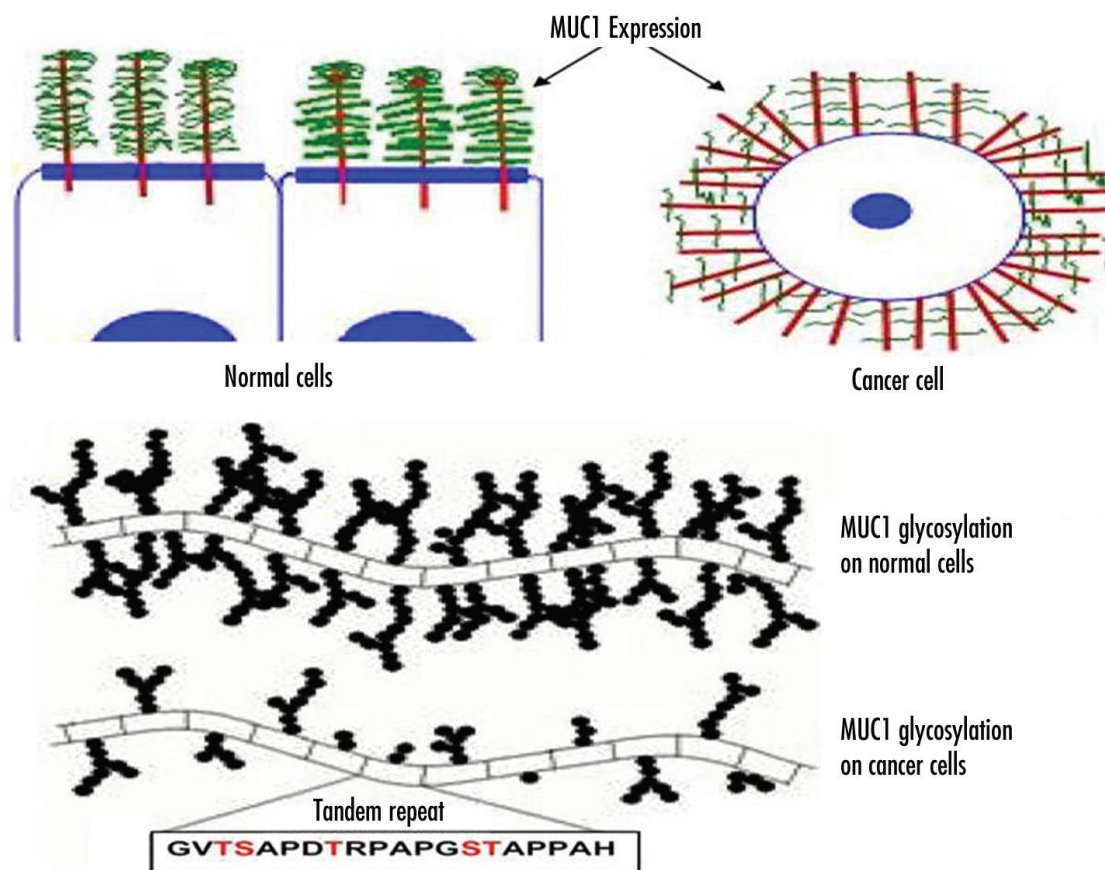
extracelular, estrutura alongada e um padrão sub-glicosilado característico, permite uma maior exposição da proteína nas células neoplásicas, sendo um alvo em potencial para terapias moleculares (Moore et al., 2004; Borba et al., 2007).

As mucinas possuem muitas ligações O-oligossacarídeas, entre 50 a 90 % da sua massa molecular, e são ricas em serina, treonina e prolina. A maioria das mucinas possuem um domínio extracelular, uma região com uma variedade de repetições em tandem (VNTR), regiões transmembranares e citoplasmáticas (Yang et al, 2007)

A proteína MUC1, que é expressa pelas células normais, está profundamente O-glicosilada com domínios repetidos em tandem enquanto que a MUC1 expressa pelas células cancerosas está aberrantemente O-glicosilada (Figura 1) (Ciborowski & Finn, 2002). As mucinas, incluindo MUC1, contribuem para uma função complexa e protectora em relação ao sistema imunológico, que no caso dos tumores, podem ajudar as células tumorais a escaparem da vigilância do sistema imunológico (Constantinou., 2011).

É importante salientar que, partes da proteína que são detetadas pelos anticorpos, estão expostas nas mucinas processadas pelo cancro de mama, enquanto que nas mucinas processadas pelos tecidos normais ou tumores benignos da mama, elas encontram-se camufladas (Burchell et al, 1987; Kosma & Muller-loennies, 2012).

O facto de as células cancerosas terem esta característica faz com que a proteína MUC1 seja um valioso marcador molecular no diagnóstico do cancro de mama (Zaretsky et al., 2006). Neste sentido verificou-se que anticorpos específicos para a forma glicosilada da MUC1 reagem mais frequentemente e em níveis muito altos, em pacientes num estágio inicial do cancro de mama do que em mulheres saudáveis ou com doenças da mama benignas (Blixt et al, 2011).



**Figura 1** Expressão de MU1 em células normais e células com cancro. As células cancerosas expressam a proteína MUC1 sub-glicosilada. (Adaptado de Singh et al., 2007).

### 1.3.1. UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MUC1 COMO INSTRUMENTOS PARA ALVEJAR CANCRO DE MAMA

Receptores celulares e outras proteínas membranares ajudam na transmissão de sinais do microambiente para o interior da célula, os quais são essenciais para o crescimento das células tumorais. Por vezes, essas proteínas têm estruturas ou estão expressas em quantidades aberrantes e podem tornar-se antigénicas e levarem a uma resposta do sistema imunitário.. Estes antigénios tumorais têm sido extensivamente investigados como um meio para alcançar as células tumorais através de transportadores nano ou macromoleculares (Ross et al, 2004)

Num trabalho realizado por Song et al (2008), tendo como objectivo desenvolver uma terapia dirigida para controlar a ascite do cancro de ovário,

utilizando um isótopo radioactivo (Bismuto 213) ligado a um anticorpo monoclonal contra a proteína MUC-1 (C595) e aplicando-o em ratinhos com ascite do cancro do ovário, demonstram que este anticorpo tem uma boa especificidade para a proteína MUC-1, a qual se expressa de forma significativa nas células do cancro do ovário. Além disso demonstraram que este reagente pode destruir as células do cancro do ovário tanto *in vitro* como *in vivo* (Song et al., 2008).

No nosso trabalho utilizámos este mesmo anticorpo monoclonal (mAb) tal como outro mAb designado SM3. Em um estudo imuno-histoquímico, de tecidos do cancro de mama ficou demonstrado que o anticorpo SM3 reage de forma evidente contra a maioria dos cancros de mama primários (91%) e tem pouca ou nenhuma reacção contra os tumores benignos ou tecidos normais (Burchell et al. 1987), sendo portanto um utensílio molecular bastante útil para detectar especificamente o cancro.

## **2. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE ORGANIZAÇÃO ESPONTÂNEA**

Actualmente, muitos nanomateriais poliméricos têm sido desenvolvidos para o transporte de fármacos, agentes de contraste para imagiologia e materiais genéticos (Nie et al., 2007). Entre os materiais que estão em desenvolvimento encontram-se os lipossomas, polímeros conjugados com fármacos, nanogels e micelas poliméricas. O uso da nanotecnologia como um meio de transporte de fármacos dirigido a um alvo específico, oferece as mais promissoras aplicações da nanotecnologia na área do tratamento de pacientes contra o cancro (Tabakovic et al., 2012)

### **2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

As Nanopartículas poliméricas representam um dos mais eficazes meios de transporte e entrega de drogas dirigidas a um alvo definido. Langer e Folkman

conseguiram através de uma experiência laboratorial, a primeira libertação controlada de macromoléculas usando polímeros (Langer & Folkman, 1976), possibilitando assim, o desenvolvimento de um sistema anti-angiogénico de transporte e entrega de drogas e abrindo novas perspectivas na área do tratamento do cancro.

Com o desenvolvimento da primeira nanopartícula polimérica *in vitro* e *in vivo* nos anos de 1980, carregada com drogas usando polialquícianoacrilato como base para libertar doxorubicina, deu-se início a vários relatos de experiências que usaram materiais à base de polímeros para transporte e entrega de drogas (Couvreur et al., 1979). Nanopartículas poliméricas permitem uma grande flexibilidade na sua montagem pois, podem ser biodegradáveis e podem ser preparadas na forma sintética ou a partir de fontes naturais (Severino et al., 2011).

### 2.1.1. TIPOS DE NANOPARTÍCULAS

Além de lipossomas e conjugados poliméricos, existem outros tipos de nanopartículas como, micelas, dendrímeros, nanopartículas virais, nanopartículas poliméricas, nanopartículas cerâmicas e metálicas, e nanopartículas à base de polissacáridos (Tabela 1). Estas nanopartículas apresentam um potencial terapêutico para quase todos os ramos da medicina como, oncologia, cardiologia, imunologia, neurologia entre muitos outros. (Zhang et al., 2008).

As partículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) são as nanopartículas mais comuns para aplicações biomédicas, incluindo ensaios imunológicos, MRI, separação celular, separação de ácidos nucleicos, sistemas de transporte e entrega de drogas (Dey & Maiti 2012). Copolímeros anfífilicos di-bloco têm despertado interesse devido ao facto de poderem se auto-organizar em meio aquoso para formarem diversas morfologias (Jones et al., 2012).

**Tabela 1 - Tipos de nanopartículas.** Diferente tipos de nanopartículas e aplicações biomédicas. Adaptado de (Mulder et al., 2008).

<b>Tipo de Nanopartículas</b>	<b>Possibilidade de modificar a superfície</b>	<b>Modalidades de imagem (agentes de contraste possíveis)</b>	<b>Obejtivo</b>
Lipossomas	Ligandos –alvos específicos, polimeros, carga, Fragmentos de proteínas virais	MRI (gadolinio, manganês, óxido de ferro), imagem nuclear (índio), CT (iodo), imagem óptica (fluoróforo), ultrasonografia	Transporte de drogas, genes e proteínas, terapia fotodinâmica
Micelas	Ligandos –alvos específicos, polimeros, carga	MRI (gadolinio, manganês, óxido de ferro), imagem nuclear( índio), CT (iodo), imagem óptica (fluoróforo)	Transporte de drogas, genes , terapia fotodinâmica
Microemulsões	Ligandos –alvos específicos, polimeros, carga	MRI(flúor,gadolinio, manganês, óxido de ferro), imagem nuclear (índio), CT (iodo), imagem óptica (fluoróforo), ultrasonografia	Transporte de drogas
Óxido de ferro	Ligandos –alvos específicos,lípidos, polimeros, dextrano, carga	MRI, imagem nuclear( índio), imagem óptica (fluoróforo)	Transporte de siRNA, termoablação
Nanopartículas de ouro	Ligandos –alvos específicos, lípidos, polimeros	CT, imagem óptica	Transporte de drogas, termoablação
Quantum dots	Ligandos –alvos específicos, lípidos, polimeros	MRI (gadolinio) optical	terapia fotodinâmica
Lipoproteínas	Ligandos –alvos específicos	MRI (gadolinio) imagem óptica (fluoróforo)	Transporte de drogas, terapia fotodinâmica
Dendrimeros	Ligandos –alvos específicos, polimeros, carga	MRI (gadolinio) imagem óptica (fluoróforo)	Transporte de drogas e genes
Nanopartículas de sílica	Ligandos –alvos específicos, polimeros, carga	MRI (gadolinio, óxido de ferro) imagem óptica (fluoróforo)	Transporte de drogas e genes

A seleção do polímero para formar as micelas tem como base as características hidrofílicas e hidrofóbicas dos dois copolímeros di-bloco (Oerlemans et al., 2010).

Apesar de haver um grande desenvolvimento nos polímeros sintéticos e semi-sintéticos, o uso de polímeros naturais como transportadores de drogas tem tido uma aplicação frequente. O quitosano, a gelatina, o alginato de sódio, as gomas e a albumina, são alguns exemplos, de polímeros naturais usados na formação de nanopartículas poliméricas (Severino et al., 2011).

Entretanto, nos anos recentes, muitos polímeros têm sido investigados para aplicações médicas e entraram no grupo das nanopartículas poliméricas de libertação controlada de agentes bioactivos. Entre eles, estão os polilactidos (PLA), poliglicolidos (PGA), Poli(lactidio-co-glicolidos (PLGA), polianidridos, poliortoesters, policianoacrilatos e policaprolactona (Severino et al., 2011).

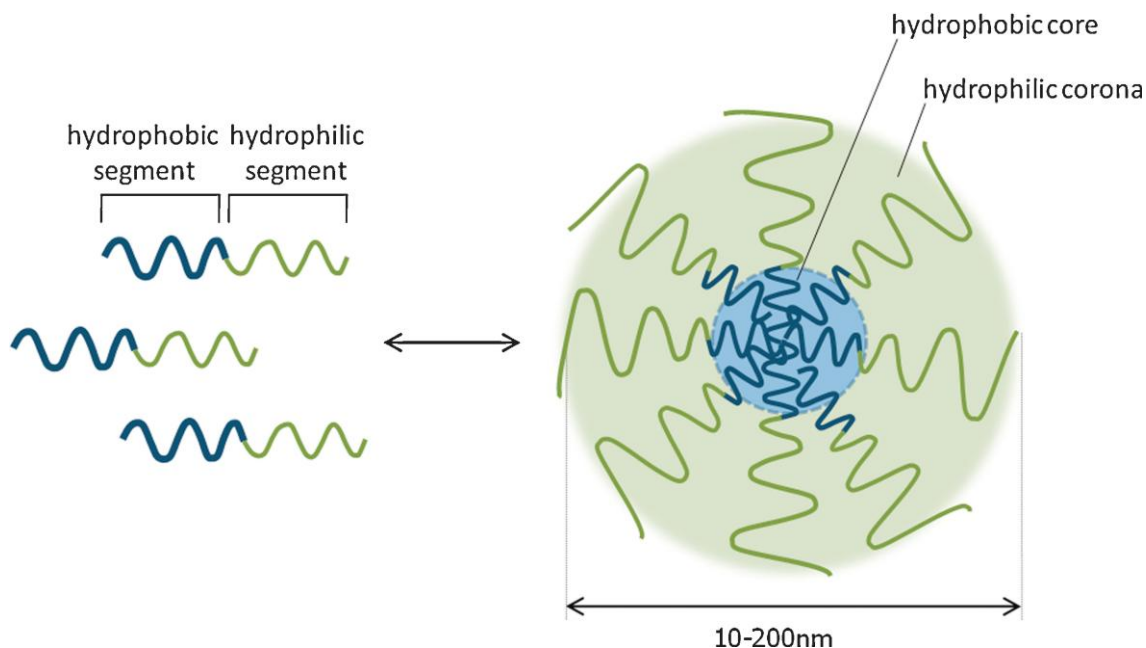
#### **2.1.1.1. MICELAS POLIMÉRICAS**

Entre as estruturas de primeira escolha na escala nano para transporte de fármacos, existem as micelas poliméricas que podem levar fármacos encapsulados de uma forma segura até um alvo fisiológico potencial (Faraji & Wipf, 2009). Esta propriedade deve-se a algumas características importantes como uma boa capacidade de encapsulamento de uma grande variedade de fármacos, um eficiente processo de endocitose e a capacidade de alcançar o alvo de uma forma passiva ou activa (Rios-Doria, 2012).

A capacidade de manipular o segmento hidrofóbico da estrutura das micelas poliméricas fazem com que seja um excelente sistema de transporte/entrega de drogas insolúveis em água (He et al., 2010; Yih & Al-Fandi, 2006). É de extrema importância para que a internalização das micelas poliméricas nas células ocorra eficientemente, determinar certas características das nanopartículas (NPs) como, tamanho, forma, carga eléctrica e o grau de agregação das partículas (Gratton et al., 2008; Sahay, 2010). O tamanho , a

forma e as características da superfície influenciam propriedades como a estabilidade na circulação sanguínea, biodistribuição, endocitose e distribuição intracelular das nanopartículas (Elsabahy & Wooley, 2012).

As micelas poliméricas mais usadas em um sistema de transporte e entrega de drogas são os polímeros anfifílicos di-bloco (hidrofílico-hidrofóbico) (Figura 2) ou tri-bloco (hidrofílico-hidrofóbico-hidrofílico). Além destes sistemas poliméricos existem outros com estruturas diferentes, como o iônico (hidrofílico-ionico) ou o “graft” (hidrofílico-estrutura de suporte principal-hidrofóbico) (Owen et al., 2012). Em quase todos os sistemas poliméricos, o segmento hidrofílico é composto de poli(etileno glicol) (PEG) (Xiao et al., 2011). Varias alternativas para polímeros hidrofílicos têm sido estudadas, como poli(etilenoimina), poli(ácidoaspartico), poli(ácidoacrílico) e dextrano mas, muitas das novidades em relação a composição das micelas são derivadas da escolha entre segmentos hidrofóbicos ou hidrofílicos (Owen et al, 2012).



**Figura 2 - Esquema com ilustração da formação de uma micela polimérica.** Os copolímeros auto-organizam-se de modo a terem uma estrutura com um núcleo hidrofóbico e uma coroa hidrofílica em ambiente aquoso. Adaptado de (Owen et al., 2012)

## 2.2. DIMENSÕES DAS NANOPARTÍCULAS

Existe um certo consenso que, com um diâmetro abaixo dos 100 nm e em conjunto com compostos incorporado na sua estrutura, as micelas poliméricas podem realmente alcançar os tumores sólidos por via vascular e consequentemente destruir as células malignas (Yih & Al-Fandi, 2006). Em seu trabalho com micelas formadas por PEG-ácido oligocólico (PEG-AC), Xiao e colegas (2011), demonstraram que a biodistribuição das NPs é dependente da dimensão das partículas. Partículas com diâmetro de 17-60 nm acumulam-se preferencialmente no local do tumor enquanto que partículas com diâmetro acima de 150 nm são captadas pelos macrófagos que se encontram em órgãos como o fígado e os pulmões (Xiao et al., 2011).

O tamanho das nanopartículas pode influenciar de forma significativa o tempo de circulação destas na corrente sanguínea, bem como a sua distribuição pelos tecidos, a internalização nas células e a sua remoção pelo organismo (Caldorera-Moore et al., 2010).

Nanopartículas maiores que 1  $\mu\text{m}$  na maioria das vezes, são opsonizadas e acumulam-se no fígado e no baço, havendo ainda a possibilidade de agregarem-se. Por outro lado nanopartículas menores que 5 nm são removidas rapidamente da circulação sanguínea através de extravasamento ou filtração pelos rins (Elsabahy & Wooley, 2012).

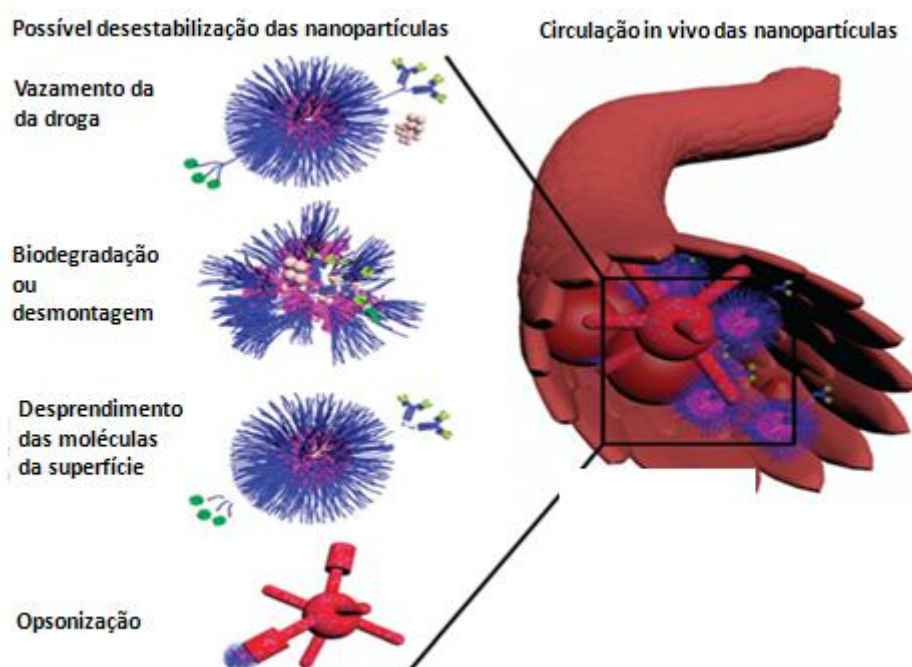
## 2.3. ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM MEIO FISIOLÓGICO

Existem muitos fatores que podem influenciar a estabilidade *in vivo* das micelas poliméricas como interações entre as micelas e os componentes do soro (Figura 3), variações de temperatura, pH, tensão de escoamento nos fluidos e forças iónicas (Owen et al., 2012).

Com a ligação de polímeros que contenham PEG, estes podem bloquear a adsorção de proteínas do plasma à superfície das nanopartículas e manter

assim, uma estrutura que impede que as nanopartículas possam agregar-se (Nie et al., 2007; Gonçalves et al., 2010).

Segundo Shanker e colegas (2011), a síntese de partículas com co-polímeros contendo PEG revelou ser uma excelente opção pois, observou-se uma redução da remoção das NPs pelo sistema retículo endotelial, um aumento da estabilidade *in vivo* e uma maior acumulação no tecido alvo. A soma destes resultados traduziu-se numa melhor eficácia da acção antitumoral (Shanker et al., 2011).



**Figura 3 - Possíveis vias de degradação e desestabilização de nanopartículas poliméricas na circulação sanguínea.** Libertação da droga antes de atingir o alvo, biodegradação, as moléculas de superfície podem se soltar, fixar opsoninas . Adaptado de (Elsabahy et al., 2012).

### 3. UTILIDADE DE NANOPARTÍCULAS PARA DETETAR OU TRATAR CANCRO

Existe um grande potencial para o uso das NPs no combate ao cancro, desde o diagnóstico de células malignas passando pelo acompanhamento em tempo

real da sua localização após serem introduzidas no organismo, até à destruição das células cancerosas sem afetar as células normais (Bae et al., 2007; Cho et al., 2008).

Uma característica dos tumores sólidos é o efeito EPR ocorrendo devido aos vasos sanguíneos tumorais serem muito permeáveis e a drenagem feita pelos vasos linfáticos ter um funcionamento defeituoso. O efeito EPR pode ser aproveitado para fazer chegar de forma passiva NPs carregadas com fármacos ou com meio de contraste aos tecidos tumorais (Gratton et al., 2008; Sahay et al., 2010).

**Tabela 2 - Experiências realizadas com nanopartículas para tratamento do cancro.** As nanopartículas são constituídas por diferentes materiais e exploram as características diferenciadas do tecido tumoral.

TIPO DE NANOPARTÍCULA	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ALVO MOLECULAR	MECANISMO DE LIBERTAÇÃO	REFERÊNCIA
Micela polimérica	Tri-bloco / PEG-Pasp(DIP)-CA	Recetor Celular: Folato	Sensível PH	Wang et al.,2012
Coloidal	Au-NP	Recetor celular: MUC-1	Fototermal	Danysh et al, 2012
Micela Polimérica	Di-bloco / PEG-Catecol	Recetor celular: Biotina	Sensível PH	Su et al. 2011
Lipossoma	PEG-DOPE-CHEM	Recetor celular: $\alpha 5\beta 1$	Sensível PH	Garg et al, 2011
Quantum dots	ScFvEGFR-QDs	Recetor celular: EGFR	Passivo	Yang et al.2009
Micela polimérica	Di-bloco PEG-PE	Recetor celular: Nucleosoma	Passivo	Sawant et al, 2009
Coloidal	Au-PEG-Thiol	Recetor celular: TNF- $\alpha$	Passivo	Goel et al, 2009
Micela polimérica	Di- bloco PEG-PCL	Recetor celular: EGFR	Passivo	Noah et al, 2008

Atualmente, muitas experiências tem sido feitas com diferentes tipos de NPs conjugadas com moléculas que reconhecem receptores na superfície celular (Tabela 2), de forma a tornar mais eficiente o processo de transporte e entrega de fármacos como agentes terapêuticos ou de contraste, na terapia contra o cancro.

Outra abordagem usada para desencadear a libertação de compostos bioactivos em microambientes onde existe uma patologia, é explorar a alteração do pH, que podemos encontrar em áreas de inflamação, infecção ou tumores. Na verdade, o pH é um dos estímulos endógenos que tem sido mais usados para induzir no interior do organismo libertação de compostos ou sondas para imagiologia (Bhaskar et al., 2010; Torres et al., 2011).

### **3.1. NANOPARTÍCULAS COMO AGENTE DE CONTRASTE**

A nanotecnologia direccionada para cancro, é uma tecnologia emergente sendo ao mesmo tempo uma área interdisciplinar que reúne conhecimentos em biologia, engenharia, medicina e química. As expectativas são que a nanotecnologia tenha um papel fundamental no avanço do tratamento do cancro, através de uma melhor detecção e diagnóstico e também possibilitar o desenvolvimento de terapias mais eficazes (Gunasekera et al., 2009). Existem técnicas que associam diagnóstico com a terapia, onde um isótopo radioactivo é conjugado com um anticorpo para alvejar células tumorais. Estas técnicas podem ter uma certa eficácia mas, por outro lado, podem ser tóxicas para as células normais, principalmente aquelas que se encontram nos tecidos hematológicos (Nie et al., 2007; Carter, 2001). Devido à alta permeabilidade dos vasos sanguíneos dos tecidos tumorais, existe um potencial para os agentes de contraste tumorais de dimensões nano poderem ser utilizados em imagiologia e caracterização de tumores (Zarabi et al., 2008).

O óxido de gadolínio (Gd III) induz um aumento do contraste positivo nas imagens por ressonância magnética quando comparado com outros agentes de contraste, o que faz dele o íão paramagnético preferido para aplicações em

ressonância magnética (MRI). A eficácia deste metal para melhorar o contraste da imagem em MRI deve-se a capacidade de aumentar a taxa de relaxamento longitudinal, R1, dos prótons da água (Hedlund et al., 2011; Bridot et al., 2007; Torres et al., 2011).

### 3.2. DROGAS QUIMIOTERÁPICAS

Existem vários tratamentos para o cancro, entre os mais usados estão a quimioterapia e a cirurgia. O tratamento através de quimioterapia traz consigo alguns desafios, como a toxicidade para as células saudáveis e o desenvolvimento de resistência aos múltiplos fármacos usados contra as células cancerosas. Nas primeiras sessões de quimioterapia, as células do tecido tumoral são sensíveis aos fármacos quimioterápicos mas, após algumas sessões e eventual regressão tumoral, podem surgir células resistentes aos mesmos e recidiva tumoral (Lee et al., 2008).

**Tabela 3 – Nanopartículas poliméricas em ensaios clínicos.** Características de NPs em ensaios clínicos com a respectiva fase de avaliação (Adaptado de Riggio et al., 2011)

Micela polimérica	Polímeros	Droga Quimioterápica	Diâmetro (nm)	Indicação	Fase clínica
NK012	PEG-PGlu	SN-38	20	Cancro de mama	II
NK105	PEG-P	paclitaxel	85	Cancro do estômago avançado	II
SPI049C	Plurónico L-61/ F-127	Doxorubicina	22-27	Adenocarcinoma do esófago, estômago e junção gástricoesofágica	III
NC-6004	PEG-PGlu-cisplatina	Cisplatina	30	Tumores sólidos, cancro de mama, cancro do pâncreas	I / II
Genexol	PEG-P (D,L-lactido)	Paclitaxel	20-50	NSLC cancro, cancro do pâncreas e cancro do ovário, em combinação com outras drogas	I / II

Um meio de ultrapassar a falta de especificidade dos tratamentos de quimioterapia, que afetam de forma tóxica tanto as células normais como as células tumorais, é a utilização de terapia molecular dirigida ( Cho et al., 2008). Estas terapias pretendem interferir com proteínas ou moléculas presentes unicamente nas células malignas e não em células normais. Estas terapias exigem que se conheça o perfil molecular de cada tumor e por essa razão nem sempre são de carácter universal.

Muitos ensaios clínicos tem sido realizados nos últimos anos, com nanopartículas poliméricas carregadas com drogas quimioterápicas (Tabela 3) conforme estudos feitos até a metade de 2011 (Riggio et al, 2011).

### 3.3. MOLÉCULAS FLUORESCENTES

Nos últimos anos, a imagiologia de fluorescência tem recebido alguma atenção devido ao aumento da disponibilidade de proteínas e outras moléculas fluorescentes, corantes e sondas que permitem realizar estudos não invasivos da expressão dos genes, das funções das proteínas e muitos outros processos celulares (Tsien., 2005).

O avanço tecnológico em imagiologia de fluorescência e tomografia, acompanhado pelo aumento da disponibilidade de novas moléculas fluorescentes, pode melhorar de forma significativa a capacidade de questionar *in vivo* novos alvos para diagnóstico e terapia, a acção das drogas e a função das moléculas (Ntziachristos, 2006).

De modo a visualizar moléculas pequenas nas células, *in vivo*, é preciso que o fluoróforo tenha brilho e alta especificidade para a molécula-alvo, que o número de cópias da molécula seja baixo, afim de evitar a co-localização de múltiplas cópias dentro do limite de difracção , e finalmente, ter alta resolução temporal e uma dose baixa de excitação (Joo et al., 2008).

Um fluoróforo pode ser incorporado em uma nanopartícula polimérica para torná-la sensível a estímulos externos, neste caso, através do uso de luz

ultravioleta (Menon & Das, 2012).

Por exemplo o polímero de poli(etilenoglicol-b-trimetilsililometacrilato) possui a capacidade de se auto-organizar em estruturas polimicelares, sendo capaz de encarcerar dentro do seu núcleo uma grande quantidade de marcadores fluorescentes hidrofóbicos (Mouffouk et al., 2011).

#### **4. BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS**

Parâmetros farmacocinéticos e de biodistribuição são características muito importantes quando novas nanopartículas são preparadas e testadas (Lee et al., 2010). Estudos feitos sobre a biodistribuição de nanopartículas geralmente avaliam o tempo na circulação sanguínea, distribuição pelos órgãos e a cinética de eliminação das diferentes configurações de nanopartículas (Shah et al., 2012).

Com auxílio do MRI é possível acompanhar através de imagem, o processo de entrega do fármaco ao tecido-alvo. Além disso, existe um interesse crescente no desenvolvimento de sistemas capazes de monitorar a libertação do agente terapêutico nas suas diversas fases (Torres et al., 2011; Huang et al., 2012).

##### **4.1. TEMPO DE VIDA NA CORRENTE SANGUÍNEA**

Tal como abordado anteriormente, as propriedades relacionadas com o tamanho e a superfície das nanopartículas (NPs) são importantes para que o mecanismo de alcance do alvo de forma passiva (EPR) possa funcionar escapando ao sistema retículo endotelial (RES). Segundo alguns investigadores, afim de evitar a remoção pelos macrófagos, aumentar o tempo de vida na circulação sanguínea e aumentar a quantidade de NPs que alcançam o alvo, a superfície das partículas deve ser hidrofílica e o tamanho não deve ultrapassar os 100 nm (Nie et al., 2007).

De acordo com as experiências realizadas por Brinkhuis e colegas (2012), nanopartículas com 90 nm permanecem na circulação sanguínea com um tempo estimado de meia vida de 24 horas (Brinkhuis et al., 2012).

## **4.2. EXCREÇÃO**

A toxicidade das nanopartículas está relacionada com as suas dimensões, concentração, estrutura, revestimento da superfície e composição química. A excreção renal representa uma via para a remoção das nanopartículas do sangue. Durante a filtração pelos rins, partículas maiores que 10 nm não passam. Sendo assim, o diâmetro das nanopartículas deve ser levado em conta quando estas forem preparadas (He et al., 2010).

## **4.3. ORGÃOS ATINGIDOS**

Quando as nanopartículas são administradas por via endovenosa, diversas proteínas do soro ligam-se à superfície das nanopartículas, as quais são reconhecidas pelos receptores celulares na superfície celular dos macrófagos que internalizam estas nanopartículas retirando-as da circulação sanguínea (Li & Huang, 2008).

Segundo Shah e colegas, que analisaram a biodistribuição de nanopartículas de ouro em ratos, ficou demonstrado que independente das propriedades da superfície das nanopartículas após serem injectadas por via venosa, elas se acumulam no fígado e no baço (Shah et al., 2012).

Em outra experiência realizada com nanopartículas ficou confirmado que partículas com 120 nm e maiores, são rapidamente retiradas da circulação sanguínea e acumulam-se no fígado e no baço (Brinkhuis et al., 2012).

#### 4.4. TOXICIDADE

Em geral, as nanopartículas biodegradáveis são menos tóxicas que as não biodegradáveis, desde que os produtos degradáveis não sejam tóxicos. A nanopartícula biodegradável, poli(alquilcianoacrilato) produz uma reacção inflamatória moderada reversível enquanto que as nanopartículas não biodegradáveis produzem uma reacção tóxica severa em animais de laboratório (Sahu & Prusty, 2010).

As NPs com um tempo de circulação na corrente sanguínea longo demais poderão ter efeito tóxico para os tecidos normais. Para que as NPs, possam acumular-se em quantidade suficiente no tecido-alvo e para que possam ser eficazes no desempenho da sua função, devem sair da circulação sanguínea e ligarem-se à molécula-alvo, de modo que possam ser retidas no tecido ou serem internalizadas pelas células (Lee et al., 2010).

Em experiências *in vitro* e *in vivo* com nanopartículas de poli(lactideo-co-glicolideo) (PLGA) foi demonstrado que estas partículas não são tóxicas tanto para as células em cultura como quando administradas por via oral em ratinhos BALB-c. (Semete et al., 2010). São contudo, necessários mais estudos com outros sistemas de nanopartículas para transporte e entrega de drogas, de modo a avaliar a segurança para além da eficácia.

#### 5. OBJECTIVOS DO PROJECTO

O objectivo principal deste projecto é o desenvolvimento e optimização de nanopartículas para transportar agentes de contraste para tecidos tumorais e assim detetar especificamente cancro.

Com este propósito, foram desenvolvidas experiências para testar a capacidade destas nanopartículas poliméricas de alvejar de forma específica as células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*.

- Para realizar os testes de especificidade das nanopartículas, elas

foram carregadas com a molécula fluorescente 1-metilpireno e depois, conjugadas com um anticorpo específico para a proteína MUC1. As nanopartículas foram incubadas com uma linha celular humana do cancro de mama (MDA-MB-468) e foi determinado através de microscopia de fluorescência a capacidade das nanopartículas de internalizarem nestas células.

- Através da citometria de fluxo foi analisada a sensibilidade dos anticorpos SM3 e C595 para a proteína de superfície da membrana celular MUC1, a qual se encontra sobre expressa nas células MDA-MB-468 e MCF7 de cancro de mama.
- Foram realizadas experiências *in vitro* por fluorimetria, dispersão dinâmica de luz e ensaios MTT para determinar respectivamente a estabilidade, a dimensão e a toxicidade das nanopartículas.
- Foram realizados testes *in vivo* de biodistribuição, para avaliar a acumulação de nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo anti-MUC1 em alguns órgãos e tecidos tumorais, após injeção daquelas na corrente sanguínea ou no local do tumor.

## **CAPÍTULO II - MATERIAIS & MÉTODOS**

### **1. SÍNTESE DE MICELAS E CONJUGADOS**

A preparação das micelas poliméricas, a bioconjugação e a encapsulação do fluoróforo 1-metilpireno foram realizadas de acordo com procedimentos feitos por Mouffouk e colegas (2008) e detalhados seguidamente.

#### **Preparação das micelas poliméricas conjugadas com fluoróforo**

A preparação das micelas poliméricas carregadas com 1-metilpireno seguiu os seguintes procedimentos: adicionou-se num tubo de vidro de 5 ml, 30 mg de

poli(etileno glicol -b-metacrilato de trimetisililo) mais 0,4 ml de dimetilformamida (DMF). A mistura foi agitada durante cerca de 2 horas. De seguida, pesou-se para outro tubo de menor dimensão, 0,5 mg de 1-metilpireno (Fluka) e adicionou-se à solução anterior. Esta foi agitada durante 15 minutos.

A seguir, foi adicionada água Milli-Q (Millipore) gota a gota em intervalos de 10 segundos para induzir a formação de micelas. A solução de micelas foi então, introduzida numa cassette de diálise de 10 kDA (Pierce) e ficou a dialisar em água destilada por 48 horas, mudando-se a água uma vez ao fim de 24 horas.

### **Bioconjugação do polietileno glicol com os anticorpos anti-MUC1**

A bioconjugação do PEG com anticorpos monoclonais (mAbs) murinos contra a proteína MUC1 (C595 [Santa Cruz Biotechnology] e SM3 [eBioscience]) foi realizada segundo o seguinte procedimento: adicionou-se 3 mg de éster de N-hidroxi-succinamida de metoxi-poli(etilenoglicol) (Sigma-Aldrich), em uma solução tampão de hidrogenocarbonato 0,1 molar (500 µl, pH=8,3) contendo 3 µg de mAb C595 (30 µl), sendo que para o mAb SM3 foi usado 6 µl. A solução ficou 5 dias em agitação lenta inclinada, à temperatura de 4 °C.

### **Preparação de micelas poliméricas carregadas com fluoróforo e bioconjugadas com mAb**

As micelas carregadas com fluoróforo e bioconjugadas com mAb foram preparadas adicionando 30 mg de poli(etileno glicol-b-metacrilato de trimetisililo) e dissolvidas em 0,4 ml de DMF. A mistura ficou em agitação por 2 horas à temperatura ambiente, sendo em seguida adicionado 0,5 mg de 1-metilpireno à solução que foi agitada por mais 15 minutos. Logo a seguir, foi adicionado gota a gota, 0,5 ml de solução PEG-Anti-MUC1 e imediatamente após, foi adicionado 0,5 ml de água Milli-Q fria da mesma forma, gota a gota, para induzir a formação de micelas. A solução de micelas foi introduzida numa cassette de diálise de 10 kDa e ficou a dialisar em água destilada por 24 horas a 4°C.

## **2. LINHAS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA**

### **2.1. LINHAS CELULARES**

As linhas celulares Jurkat (células -T leucémicas humanas ), MCF7 e MDA-MB-468 (células humanas de adenocarcinomas da mama) foram fornecidas por Dr. João Barata (IMM, Lisboa), Dr. Raquel Seruca e Dr. Joana Paredes (IPATIMUP, Porto), respectivamente. A linha celular 293T (células humanas embrionárias do rim) foi fornecida pelo Dr. Guilherme Ferreira (IBB/CBME, Faro). A linha celular 1C6 foi fornecida pelo Dr. Georg Hollander (Basileia, Suíça).

### **2.2. CULTURA CELULAR**

As células aderentes MDA-MB-468, 293T, MCF7 e 1C6 foram mantidas em meio de cultura DMEM (LONZA) suplementado com 10% soro bovino fetal (FBS) (PAA), 200 mM glutamina, 10000 U/mL de penicillina e 10000 µg/mL de estreptomicina (Lonza). Todas as linhas celulares em cultura foram incubadas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

A linha celular Jurkat foi mantida em meio de cultura RPMI 1640 (Lonza) suplementado conforme indicado acima. As células foram descongeladas a 37 °C e pipetadas em 10 ml de meio previamente aquecido. As células foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos para remover o meio de congelação contendo dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck).

A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 2 ml de meio DMEM. As células foram colocadas e incubadas em frascos T25 (Nunc) e 8 ml de meio foi adicionado para completar um volume final de 10 ml. As células foram subcultivadas em novo meio a cada 2 a 3 dias.

Para a contagem de células aderentes, as células foram dissociadas através da remoção do meio, lavagem com tampão fosfato salino (PBS) (Lonza) e incubação com 1 ml de tripsina 0,25% (Lonza) por cada 59 cm<sup>2</sup>.

As células foram colocadas em incubação a 37 °C, por 5 minutos ou mais, para permitir que dissociassem. Após esta etapa, foram suspendidas novamente em DMEM. Para separar agregados de células, tanto as células aderentes como as células em suspensão foram pipetadas repetidamente. A seguir, foram adicionados 50 µl de células previamente suspendidas, num tubo de microcentrifugação com 50 µl de 0.4% de Trypan Blue (Sigma-Aldrich), o qual foi agitado para misturar a solução.

Adicionou-se 10 µl da solução de células com Trypan Blue no hemocítmetro de Neubauer (Hausser Scientific) e as células viáveis não coradas foram contadas usando um microscópio óptico invertido (Leica DM IL). As células foram contadas em 4 áreas de 1 mm<sup>2</sup> e foi utilizada a seguinte equação para obter o total de células por milímetro cúbico: nº de células por mm<sup>2</sup> x fator de diluição x 10.

### 3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NPs ATRAVÉS DO ENSAIO MTT

Para avaliar a toxicidade das NPs, utilizou-se o teste de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este teste tem como base a capacidade das células vivas para reduzirem o MTT. Ao ser reduzido, este sal origina cristais de formazan de cor azul escura cuja absorvância resultante da dissolução desses cristais é directamente proporcional à quantidade de MTT reduzido. Este, por sua vez, reflecte a capacidade redutora das mitocôndrias e, consequentemente, a viabilidade das células (Mosmann, 1983).

A linha celular, utilizada para este ensaio foi a Jurkat, sendo que 15 poços de uma placa de cultura de 96 poços (BD Falcon) recebeu 50 µl de células Jurkat numa concentração de  $4 \times 10^5$  células/mL. Foram usadas quantidades diferentes de NPs (5, 10, 20, 40 e 50 µl, mais um volume de RPMI 1640, para perfazer 200 µl em cada uma amostras), sendo retirados 50 µl de cada uma das amostras e adicionadas nos respectivos poços em triplicado, em que, em 3 deles foi adicionado somente o meio de cultura, para servir como controlo. Depois, a placa foi colocada na incubadora a 37 °C durante três dias.

No final do tempo de incubação, foi adicionado 10 µl da solução de MTT (5 mg/mL) (AppliChem) e foi colocada a incubar por mais 4 horas. Após este tempo, adicionou-se aos poços 100 µl de 0.04 N HCL em isopropanol (BDH Prolabo) e permaneceu por mais uma hora a dissolver os cristais de formazan.

A concentração de formazan foi quantificada usando um espectrofotômetro (Tecan Infinite M200 monochromator-based multi-function microplate reader). A absorvância foi lida a 570 nm, com um comprimento de onda de referência de 630 nm. A densidade ótica final (OD) obtida a partir da formação do formazan foi calculada pela seguinte fórmula:  $OD = L(570 \text{ nm}) - L(630 \text{ nm})$ . A toxicidade das células foi avaliada por comparação da absorvância correspondente às células tratadas com as NPs (% de células que sobrevivem) em relação a absorvância das células controlo não tratadas. As partículas utilizadas não continham 1-metilpireno no seu núcleo, sendo que, o que foi analisado nesta experiência foram as micelas poliméricas como um polímero di-bloco, composto por PEG e Poli(metacrilato).

#### **4. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS MABs PARA MUC1**

##### **4.1. DETECÇÃO DE MUC1 ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO**

Afim de realizar a citometria de fluxo, células MDA-MB-468, 293T e MCF7 foram tripsinizadas e resuspendidas em PBS como descrito acima. Preparou-se 3 tubos de fundo redondo de 5 ml (BD Falcon) para cada uma das linhas celulares, onde se adicionou  $5 \times 10^5$  células e 1 ml de tampão FACS (PBS com 3% CS (PAA) e 10mM NaN<sub>3</sub>) em 3 tubos designados para cada linha celular. As células foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado por aspiração. De cada 3 tubos, 2 foram incubados com anticorpos primários. Um com 0,5 µl de mAb SM3 (1:500 em tampão FACS) e outro com 0,5 µl de mAb C595 (1:100 em tampão FACS). Os tubos com anticorpo primário foram incubados por uma hora no gelo e após incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 ml

de tampão FACS (descartado o sobrenadante e centrifugado por 5 minutos a 300g). A seguir, foi adicionado em todos os tubos, 0,5 µl de anticorpo secundário cabra anti-IgG murino conjugado a ficoeritrina (Gam-PE) (Biolegend) incluindo os tubos que não receberam anticorpos primários. As células foram a incubar no escuro por 30 minutos no gelo. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes conforme procedimento acima e suspendidas novamente em 1 ml de tampão PBS/10mM NaN<sub>3</sub>. As células foram então, analisadas no BD FACS Calibur (BD Biosciences) através do programa Cell Quest Software Package (BD Biosciences).

#### **4.2. VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INTERNALIZAÇÃO DAS NPS CONJUGADAS COM mAb SM3 E C595 NAS CÉLULAS MDA-MB-468 ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA**

Em 6 poços foram adicionados  $1 \times 10^5$  células MDA-MB-468 mais 1 ml de DMEM. As células foram colocadas em cultura por 24 horas em placas de Petri de 12 poços (BD Falcon). Após 24 horas de incubação, foi removido o meio de cultura das células, lavou-se duas vezes com PBS, sendo adicionado em seguida 1 ml de DMEM em cada um dos doze poços. Em seguida, nos poços foi adicionado 200 µl NPs com e sem metilpireno, 200 µl de NPs conjugadas com anticorpo SM3 e 200 µl de NPs conjugadas com anticorpo C595. As células foram colocadas na incubadora por uma hora e depois retiradas. Foi removido o meio de cultura e as células foram lavadas três vezes com PBS. As células fluorescentes foram analisadas no microscópio óptico invertido (Leica DC 500) e imagens foram tratadas com o programa Adobe Photoshop. Todas as imagens foram obtidas com uma objectiva de ampliação 40x.

### **5. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS**

#### **5.1. ANÁLISE DA ESTABILIDADE EM ÁGUA, SORO DE VITELA E DMEM**

As nanopartículas foram medidas por dispersão dinâmica de luz no aparelho

Zetasizer nano S (Malvern) antes de serem incubadas em água Milli-Q, soro de vitela ou DMEM. A cada intervalo, de 1, 3 e 6 horas de incubação, as soluções foram analisadas para novas medições.

#### **5.1.1. EM H<sub>2</sub>O**

Adicionou-se 450 µl de água Milli-Q em 2 microtubos de centrifugação. Em um microtubo com água pura Milli-Q, foi adicionado 50 µl de NPs sem 1-metilpireno e em outro microtubo foi adicionado 50 µl de NPs com 1-metilpireno. Os dois microtubos foram colocados a temperatura de 37 °C por 1, 3 e 6 horas.

#### **5.1.2. EM SORO**

Adicionou-se 450 µl de soro de vitela em 2 microtubos de centrifugação. Em um microtubo foi adicionado 50 µl de NPs sem 1-metilpireno e no outro foi adicionado NPs com 1-metilpireno, sendo colocados a temperatura de 37 °C por 1, 3 e 6 horas.

Na segunda experiência para análise da estabilidade das nanopartículas, foi seguido o mesmo processo de preparação, usando somente as NPs sem 1-metilpireno.

#### **5.1.3. EM DMEM**

Nesta experiência, adicionou-se 450 µl de DMEM em 9 microtubos de centrifugação. Em 3 microtubos foi adicionado 50 µl de nanopartículas sem 1-metilpireno (NPs), em 3 outros microtubos foi adicionado 50 µl de nanopartículas com 1-metilpireno (NP-MEPI) e noutros 3 microtubos foi adicionado 50 µl de nanopartículas com 1-metilpireno conjugadas com o mAb SM3. Os microtubos de centrifugação foram colocados em incubação a 37

°C, por 1, 3 e 6 horas.

## **5.2. ANÁLISE FLUORIMÉTRICA PARA VERIFICAR A ENCAPSULAÇÃO DO MONÓMERO**

Numa cuvete de 1 cm (Hellma Quartz-Suprasil), adicionou-se 800 µl de água Milli-Q, mais 200 µl de solução com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno. A seguir, a cuvete foi colocada no espectro fluorímetro (Spex FluoroMax - 3, Jobin Yvon - Horiba) para análise do espectro da fluorescência. Repetiu-se a mesma experiência, substituindo a água Milli-Q por DMEM. Uma terceira experiência foi realizada, adicionando-se 800 µl de DMEM mais 200 µl de nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugada com anticorpo SM3 (NP-MEPI-SM3).

## **6. ANÁLISE DA DIMENSÃO DAS NANOPARTÍCULAS**

### **6.1. DLS - DISPERSÃO DINÂMICA DE LUZ**

As partículas foram analisadas num aparelho que utiliza a tecnologia da Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) (Zetasizer Nano S, Malvern). Numa cuvete foi adicionado 1 ml de água Milli-Q. A seguir adicionou-se na mesma cuvete, 20 µl da solução de NPs com diferentes composições (com e sem metilpireno e conjugada ou não com anticorpos). A cuvete foi então, colocada no aparelho para ser analisado o tamanho e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas.

### **6.2. MICROSCOPIA ÓPTICA**

Amostras de NPs foram pipetadas sobre uma lâmina de vidro (apêndice A – Figuras 21-25) e colocadas na camara de fluxo laminar para secarem e depois

serem observadas com o microscópio de fluorescência (Zeiss Axioimager Z2).

## **7. AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS IN VIVO**

### **7.1. RATINHOS**

Para as experiências de biodistribuição in vivo foram utilizados ratinhos da estirpe Swiss Nude (Charles River Laboratories). Os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas sob temperatura constante, sendo fornecida ração e água autoclavada *ad libitum*. Toda a experimentação animal efectuada no decorrer deste trabalho seguiu as diretivas europeias (Directiva do Conselho 86/609/EEC relativa à Protecção dos Animais Utilizados para Fins Científicos) e nacionais (Decreto-Lei nº 129/92).

### **7.2. INJECCÃO DE NP-MEPI NA VEIA DA CAUDA DOS RATINHOS**

Os ratinhos Swiss Nude foram previamente anestesiados com isoflurano, e num ratinho foi injectado 100 µl de nanopartículas carregadas com 1-metilpireno (NP-MEPI) através da veia da cauda. O mesmo procedimento foi feito para o outro ratinho, com a diferença que este foi injectado com 200 µl de NP-MEPI misturados com PBS na proporção 1/1. Outro ratinho serviu de controlo. Uma hora após a injeccão, os ratinhos foram sacrificados e foi-lhes retirado o fígado e o baço. Os órgãos foram congelados em composto Tissue-Tek O.C.T. (*optimal cutting temperature*), seccionados em criostato e observados em microscopia de fluorescência.

### **7.3. INDUÇÃO DE TUMOR EM RATINHOS**

Nesta experiência foram seleccionados 6 ratinhos Swiss Nude, machos, os quais foram previamente anestesiados com isoflurano, sendo depois,

injectados subcutâneamente na parte dorsal dos ratinhos, próximo ao pescoço,  $10 \times 10^6$  de células MDA-MB-468 em solução de 100  $\mu$ l /PBS. Depois de serem injectadas as células MDA-MB-468, os ratinhos ficaram em observação no biotério até ao desenvolvimento de tumor subcutâneo de aproximadamente 1 cm de diâmetro.

#### **7.4. INOCULAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NO TUMOR**

Os ratinhos foram anestesiados com isoflurano antes das NPs serem injectadas no local do tumor. A solução injectada não foi diluída. Os ratinhos foram identificados com números, sendo que os ratinhos com os números 5 e 6 (controlo) foram injectado com 50  $\mu$ l de água no local do tumor, o 7 e 8, (NP-MEPI), o 9 e 10 (NP-MEPI-SM3) receberam 20  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30  $\mu$ l e 40  $\mu$ l de nanopartículas no local do tumor, respectivamente. Após 1 hora, os ratinhos foram sacrificados e os tumores foram removidos. Os órgãos foram congelados em composto Tissue-Tek O.C.T. (*optimal cutting temperature*), seccionados em criostato e observados em microscopia de fluorescência.

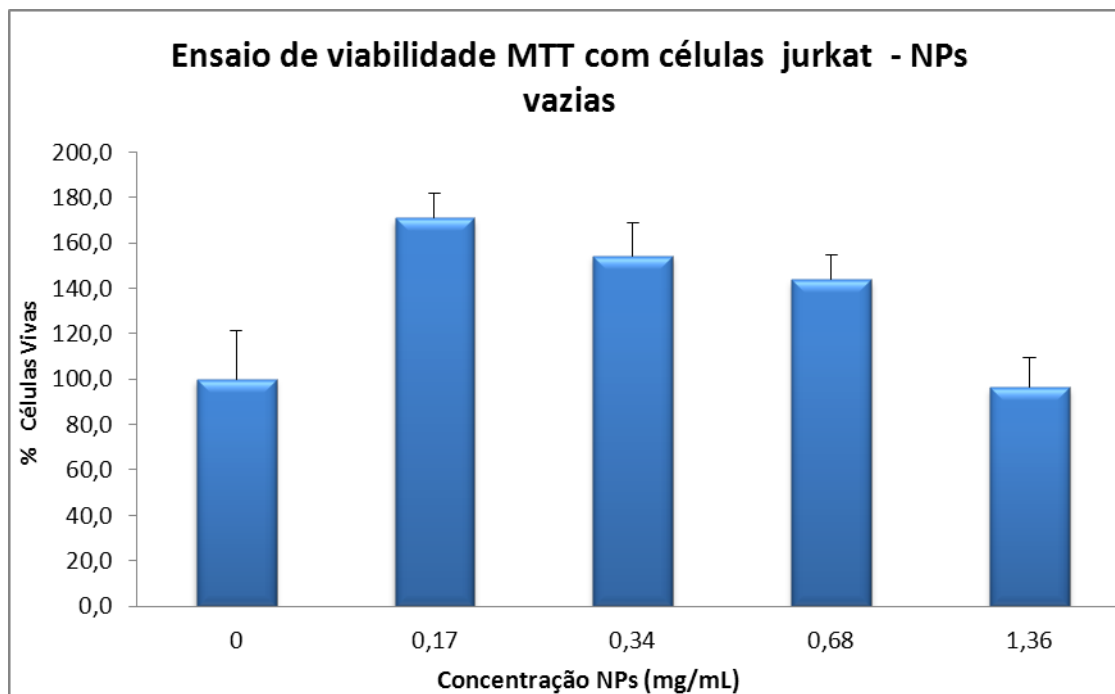
### **CAPÍTULO III – RESULTADOS**

#### **1. ANÁLISE DA TOXICIDADE DAS NPs ATRAVÉS DO ENSAIO MTT**

Para avaliar a toxicidade das NPs, utilizou-se o teste de redução do MTT. Este teste tem como base a capacidade das células vivas para reduzirem o MTT. A linha celular utilizada para este ensaio foram as células Jurkat.

Os resultados do teste de toxicidade estão representados na Figura 3. Para a concentração 1,36 mg/ml de NPs é possível observar uma pequena redução percentual de células viáveis em relação ao controlo, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa. A percentagem de células viáveis para

as outras concentrações de NPs ficaram muito acima do valor percentual do controlo. Esta experiência indica portanto que as NPs não são tóxicas, pelo menos nas concentrações testadas.



**Figura 4 – Teste MTT - análise in vitro da toxicidade das NPs para diferentes concentrações utilizando as células Jurkat.** As células foram incubadas com as NPs por 3 dias à temperatura de 37°C. Após este período, foi aplicado o teste MTT. Cada teste foi feito em triplicado. As células não tratadas serviram como controlo.

## 2. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

### 2.1. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NP E NP-MEPI EM ÁGUA E EM SORO DE VITELA

A estabilidade das partículas foi analisada através de sucessivas medições do diâmetro com auxílio do aparelho Zetasizer que mede o diâmetro das partículas por dispersão dinâmica de luz. As nanopartículas foram incubadas em água pura Milli-Q, soro de vitela ou DMEM, durante 1, 3 e 6 horas, à temperatura ambiente ou a 37 °C.

Nesta experiência foi adicionado 450 µl de água pura Milli-Q em um microtubo e noutro foi adicionado 450 µl de soro de vitela. A seguir foi adicionado 50 µl de NPs em cada um dos microtubos. O mesmo

procedimento foi utilizado para a preparação da solução com NP-MEPI, acrescentando em vez de água, soro de vitela.

Os tubos foram a incubar a 37 °C . O diâmetro inicial da solução de partículas foi medido ao longo de 1, 3 e 6 horas de incubação. A cada intervalo, foram retiradas as amostras para novas medições. O diâmetro das NPs e NP-MEPI em água após 6 horas, aumentou ao longo do tempo enquanto que o diâmetro das partículas em soro de vitela diminuiu de forma acentuada (Tabela 4).

**Tabela 4 – Avaliação da estabilidade das NP com e sem 1-metilpireno, em água e soro de vitela a 37°C.** As partículas foram incubadas por 1, 3, e 6 horas em água pura Milli-Q ou em soro de vitela. As análises foram feitas no Zetasizer em cada um dos intervalos referidos.

	NP		NP-MEPI	
	Diâmetro (nm)	PDI	Diâmetro (nm)	PDI
<b>H<sub>2</sub>O (37 °C)</b>				
<b>0 h</b>	148,6	0,185	139,9	0,248
<b>1 h</b>	23,77	0,506	313,2	0,372
<b>3 h</b>	48,64	0,382	387,4	0,565
<b>6 h</b>	172,7	0,606	400,3	0,255
<b>Soro de vitela (37 °C)</b>				
<b>1 h</b>	21,09	0,440	21,25	0,452
<b>3 h</b>	21,03	0,414	31,50	0,628
<b>6 h</b>	20,93	0,430	23,70	0,665

## 2.2. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NPs, NP-MEPI E NP-MEPI-SM3 EM DMEM

Adicionou-se 450 µl de DMEM em 9 microtubos de centrifugação. Em cada

3 microtubos foi adicionado 50 µl de suspensão de NPs, NP-MEPI e NP-MEPI-SM3. Os microtubos de centrifugação foram colocados em incubação a 37 °C, por 1, 3 e 6 horas. As medições revelaram em relação ao diâmetro inicial, um aumento do diâmetro para as NPs e NP-MEPI e uma diminuição para as NP-MEPI-SM3, todos em relação ao diâmetro inicial (Tabela 5).

**Tabela 5 – Avaliação da estabilidade das NPs, NP-MEPI e NP-MEPI-SM3, em DMEM a 37 °C.** O diâmetro inicial das NPs foi de 228,9 nm e PDI de 0,237. O diâmetro inicial da NP-MEPI foi de 203,8 nm e PDI de 0,286 e o diâmetro das NP-MEPI-SM3 foi de 497,1 e PDI de 0,763. As partículas foram incubadas por 1, 3, e 6 horas em DMEM (meio de cultura celular com 10% FBS). As análises foram feitas no Zetasizer em cada um dos intervalos referidos.

	DMEM		37 °C			
	NPs		NP-MEPI		NP-MEPI-SM3	
	DIÂMETRO	PDI	DIÂMETRO	PDI	DIÂMETRO	PDI
<b>DIÂMETRO INICIAL</b>	<b>228,9</b>	<b>0,237</b>	<b>203,8</b>	<b>0,286</b>	<b>497,1</b>	<b>0,763</b>
<b>1 HORA</b>	<b>200,6</b>	<b>0,535</b>	<b>255,9</b>	<b>0,774</b>	<b>110,9</b>	<b>1</b>
<b>3 HORAS</b>	<b>276,8</b>	<b>0,72</b>	<b>54,02</b>	<b>0,748</b>	<b>291,9</b>	<b>1</b>
<b>6 HORAS</b>	<b>335,3</b>	<b>0,65</b>	<b>244,5</b>	<b>0,554</b>	<b>132</b>	<b>1</b>

### 2.3. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NPs EM ÁGUA À TEMPERATURA AMBIENTE E EM ÁGUA E SORO DE VITELA A 37 °C

Com base nas experiências anteriores, alteramos alguns itens no planeamento deste tipo de experiências. Por exemplo, utilizámos somente as nanopartículas simples sem 1-metilpireno (NPs). Em dois microtubos foram adicionados 450 µl de água pura Milli-Q e em um terceiro foi adicionado 450 µl de soro de vitela. A seguir foi adicionado 50 µl de NPs em cada um dos três microtubos. Um dos microtubos com água foi a incubar à temperatura ambiente. Os outros dois microtubos com água e soro de vitela, respectivamente, foram a incubar a 37 °C. O diâmetro inicial da solução de partículas foi medido ao longo de 1, 3 e 6 horas. Novamente, foi possível observar que o diâmetro das NPs em água, a temperatura ambiente e a 37 °C, após 6 horas, aumentou ao longo do tempo, enquanto que o diâmetro das NPs em soro de vitela diminuiu de forma acentuada (Tabela 6).

**Tabela 6 – Avaliação da estabilidade das NPs em água a temperatura ambiente e em água e soro de vitela à 37 °C.** As partículas foram incubadas por 1, 3, e 6 horas em água Milli-Q e em soro de vitela. As medições foram feitas no Zetasizer em cada um dos intervalos referidos.

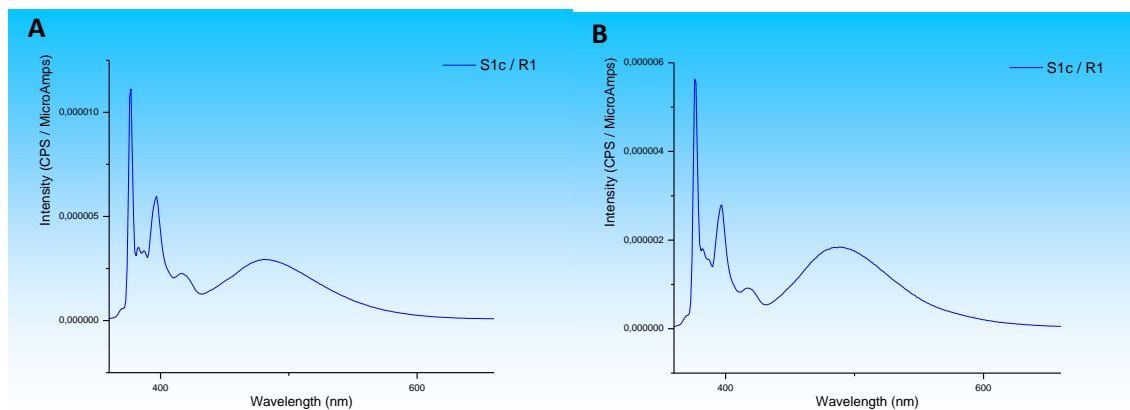
	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O 37°C		Soro de vitela 37°C	
	Diâmetro (nm)	PDI	Diâmetro (nm)	PDI	Diâmetro (nm)	PDI
<b>0 h</b>	<b>161,6</b>	<b>0,453</b>	<b>161,6</b>	<b>0,453</b>	<b>161,6</b>	<b>0,453</b>
<b>1 h</b>	<b>248,1</b>	<b>0,493</b>	<b>229,9</b>	<b>0,230</b>	<b>58,47</b>	<b>0,280</b>
<b>3 h</b>	<b>243,8</b>	<b>0,183</b>	<b>270,6</b>	<b>0,574</b>	<b>22,0</b>	<b>0,464</b>
<b>6 h</b>	<b>205,2</b>	<b>0,188</b>	<b>495,0</b>	<b>0,786</b>	<b>23,73</b>	<b>0,439</b>

#### 2.4. RESULTADO DA ANÁLISE FLUORIMÉTRICA PARA VERIFICAR A ENCAPSULAÇÃO DO MONÓMERO

Para poder funcionar como um meio de transporte eficaz, a nanopartícula precisa encapsular no seu interior o agente terapêutico ou de diagnóstico. Afim de poder verificar a eficácia desta encapsulação e a presença ou não do monómero 1-metilpireno, seja na forma livre ou encapsulado, procedeu-se a análise fluorimétrica das nanopartículas poliméricas em água e em DMEM. O 1-metilpireno sob forma monomérica emite fluorescência com pico a 375 nm enquanto que em forma agregada, ou excímeros, emite fluorescência com pico a 480 nm. Podemos assim detetar 1-metilpireno encapsulado sob forma de excímeros através de fluorimetria.

O resultado da primeira experiência de análise de suspensão de NP-MEPI, onde foi adicionado 800 µl de água Milli-Q mais 200 µl de solução de NP-MEPI na cuvete, revelou a presença do excímero, com pico nos 480 nm e monómero com pico nos 375 nm (Figura 5A).

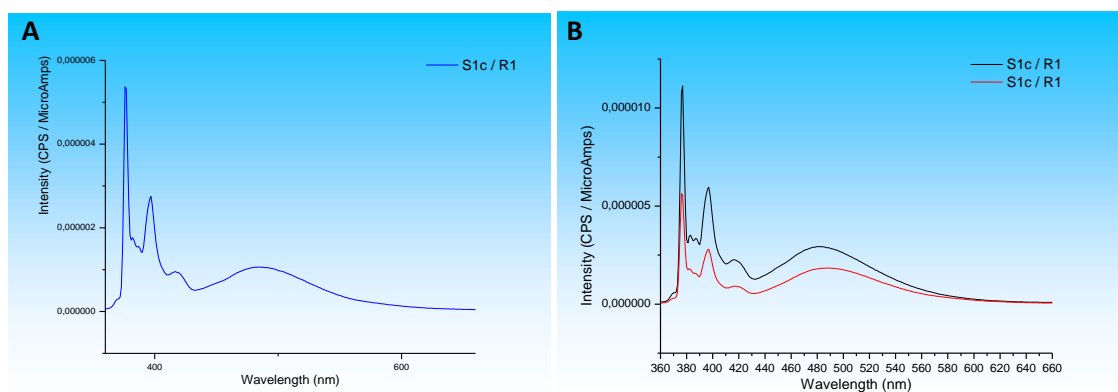
Na segunda experiência, os procedimentos foram os mesmos, com exceção da adição de DMEM em vez de água Milli-Q na cuvete. Novamente, foi possível observar a presença tanto de excímero como de monómero (Figura 5B).



**Figura 5 – Espectro da intensidade de fluorescência das NP-MEPI.** Em água (A) e em DMEM (B)

Numa terceira experiência, foi adicionado na cuvete DMEM e NP-MEPI conjugado com mAb SM3. Foi possível observar a presença de monómero e excímero, sendo que a intensidade de fluorescência do monómero permaneceu idêntica enquanto que o excímero teve uma redução na intensidade em comparação com a fluorescência das NP-MEPI analisadas nas mesmas condições, isto é em DMEM (Figura 6A).

Quando colocamos os dois gráficos sobrepostos das Figuras 5A e 5B foi possível observar uma redução da intensidade de fluorescência do monómero e do excímero quando incubados em DMEM (Figura 6B). Esta redução de intensidade foi proporcional ao monómero e ao excímero e possivelmente, poderia estar relacionado com uma menor quantidade de NPs presentes na suspensão que foi adicionada em DMEM.



**Figura 6 – Espectro da intensidade de fluorescência das NP-MEPI-SM3.** Em DMEM (A) e imagem sobreposta dos gráficos das figuras 5A e 5B (B)

### 3. ANÁLISE DA DIMENSÃO DAS NANOPARTÍCULAS

O tamanho das NPs é extremamente importante para possibilitar que agentes terapêuticos ou de diagnóstico possam chegar ao local de destino através da circulação sanguínea. Ao longo do projecto foram preparadas nanopartículas com 1-metilpireno (NP-MEPI) e sem 1-metilpireno (NPs). Além destas, preparamos nanopartículas com 1-metilpireno conjugadas com mAb C595 (NP-MEPI-C595) ou com SM3 (NP-MEPI-SM3). Todas as preparações foram feitas de acordo com os procedimentos descritos no capítulo Materiais e Métodos.

Conforme foi possível observar (Tabela 7), os resultados das múltiplas preparações ao longo dos meses resultaram em uma variedade de diâmetros medidos por dispersão dinâmica de luz, sendo que na sua maioria os diâmetros estavam muito acima do diâmetro ideal de 100 nm para aplicação biomédica (Elsabahy & Wooley, 2012; Yih & Al-Fandi, 2006). Foram obtidas partículas com diâmetros entre os 200 e os 9000 nm, aproximadamente.

**Tabela 7 (parte 1) – Tamanho das nanopartículas (NPs) preparadas e medidas ao longo de meses.** As letras e a numeração após as abreviações das nanopartículas, referem-se a mesma preparação, repartidas por microtubos. Medição feita através do aparelho Zetasizer. (PDI) *polydispersity index*.

<b>Preparações de 31/10/11</b>	<b>NP-MEPI I</b>	<b>NP-MEPI II</b>			
DIÂMETRO (nm)	343.9	342.7			
PDI	0.191	0.223			
<b>Preparações de 09/01/12</b>	<b>NP I</b>				
DIÂMETRO (nm)	495.0				
PDI	0.347				
<b>Preparações de 18/01/12</b>	<b>NP-MEPI I</b>	<b>NP-MEPI I</b>	<b>NP-MEPI SM3 I</b>	<b>NP-MEPI SM3 II</b>	
DIÂMETRO (nm)	275.8	5755	771.6	439.5	
PDI	0.284	0.097	0.787	0.276	
<b>Preparações de 24/01/12</b>	<b>NP-MEPI C595 I</b>	<b>NP-MEPI C595 II</b>	<b>NP-MEPI SM3 I</b>	<b>NP-MEPI SM3 II</b>	
DIÂMETRO (nm)	6292	3554	6033	3661	
PDI	1.000	0.822	1.000	0.146	

**Tabela 7 (parte 2) – Tamanho das nanopartículas (NPs) preparadas e medidas ao longo dos meses.** As letras e a numeração, após as abreviações das nanopartículas, referem-se a mesma preparação, repartidas por microtubos. Medição feita através do aparelho Zetasizer.

<b>Preparações de 28/02/12</b>	<b>NP-MEPI C595 I</b>	<b>NP-MEPI C595 II</b>	<b>NP-MEPI SM3 I</b>	<b>NP-MEPI SM3 II</b>	
DIÂMETRO (nm)	5857	2919	2128	2551	
PDI	1.000	0.701	0.899	0.651	
<b>Preparações de 26/04/12</b>	<b>NP-MEPI A</b>	<b>NP-MEPI B</b>	<b>NP-MEPI C</b>	<b>NP-MEPI D</b>	
DIÂMETRO (nm)	519.1	406.1	375.7	614.5	
PDI	0.276	0.335	0.259	0.288	
<b>Preparações de 27/04/12</b>	<b>NP-MEPI-SM3</b>	<b>NP-MEPI-SM3 A</b>	<b>NP-MEPI C595</b>	<b>NP-MEPI C595 A</b>	
DIÂMETRO (nm)	9284	1770	998	5627	
PDI	1.000	0.973	0.786	1.000	
<b>Preparações de 24/7 /12</b>	<b>NP-MEPI A</b>	<b>NP-MEPI B</b>	<b>NP-MEPI SM3 A</b>	<b>NP-MEPI SM3 B</b>	<b>NP-MEPI SM3 C</b>
DIÂMETRO (nm)	949.5	1440	1737	1061	302.2
PDI	0.802	0.916	1.000	0.848	0.404

Esta variabilidade de diâmetros pode criar muitos obstáculos, quando queremos produzir nanopartículas para serem introduzidas na circulação

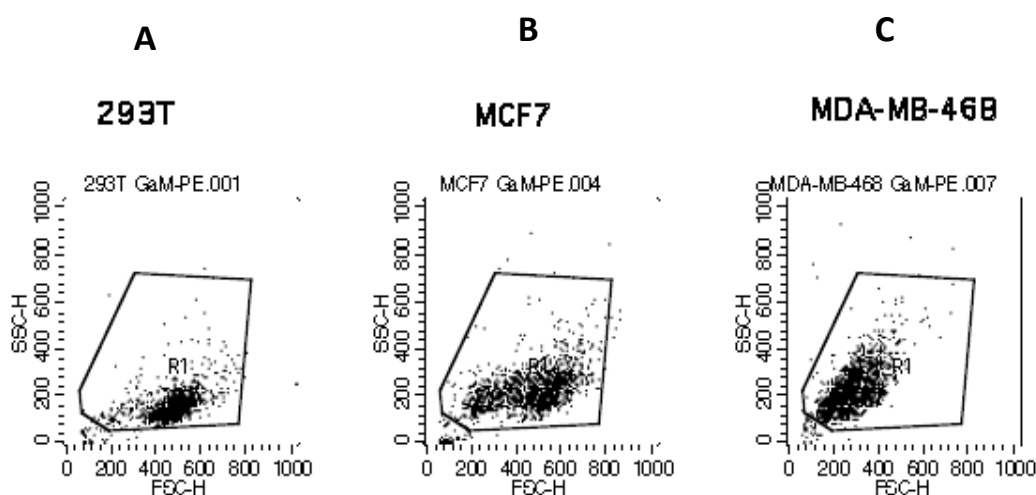
sanguínea com o objectivo de atingir um alvo específico e detetar patologias como o cancro.

#### 4. VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO mAb SM3 PARA A PROTEÍNA MUC1

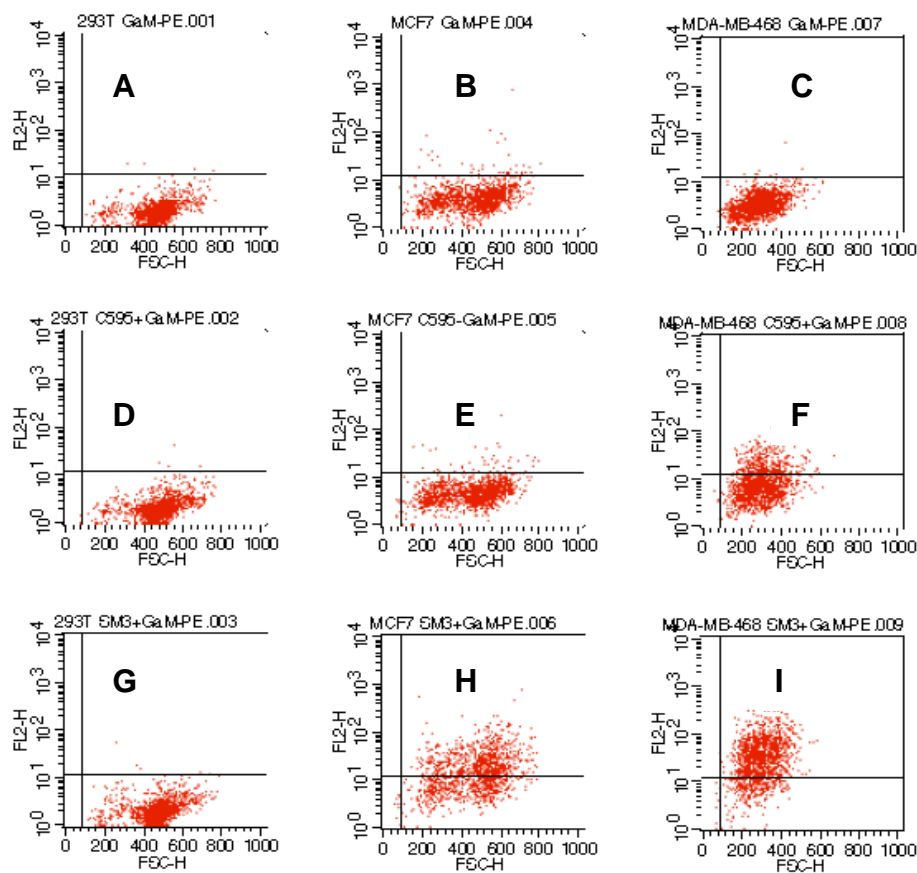
##### 4.1. ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DO mAb SM3 PARA A PROTEÍNA MUC1 ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

O objetivo desta experiência foi verificar se o mAb SM3 era capaz de facilitar a internalização de NPs conjugadas com ele. Assim, incubou-se células MDA-MB-468, MCF7 e 293T, com anticorpos mAb SM3 e mAb C595 e seguidamente, anticorpo secundário conjugado a ficoeritrina.

As linhas celulares 293T, MCF7 e MDA-MB-468 (Figuras 7) foram caracterizadas em termos de volume celular (FSC-H) e complexidade interna (SSC-H). Na figura 8 (H e I), observou-se que o anticorpo SM3 possui uma maior afinidade para a proteína MUC1 em comparação com o mAb C595, a qual se expressa de forma aberrante na superfície da membrana das células de cancro de mama, MCF7 e MDA-MB-468.



**Figura 7 – Análise do volume celular (FSC-H) e complexidade interna (SSC-H) das células MDA-MB-468, MCF7 e 293T por citometria de fluxo.** No eixo Y é apresentado o SSC (*side scatter intensity*) proporcional a quantidade de estruturas granulares dentro das células, e no eixo X, o FSC (*forward scatter intensity*) proporcional ao diâmetro/volume das células.



**Figura 8 – Análise de expressão de MUC-1 à superfície das células MDA-MB-468, MCF7 e 293T através do receptor da membrana celular MUC1 usando os mAbs C595 e SM3 por citometria de fluxo..** No histograma é possível observar uma maior intensidade de fluorescência (FL2-H) em células MDA-MB-468 para o mAb SM3 (8I) em relação ao mAb C595 (8F).

O anticorpo mAb SM3 apresentou maior sensibilidade para detetar o recetor de membrana MUC1 nas células MCF7 e MDA-MB-468 em comparação com o mAb C595, tal como também foi possível observar, nos gráficos da Figura 9 (B e C).

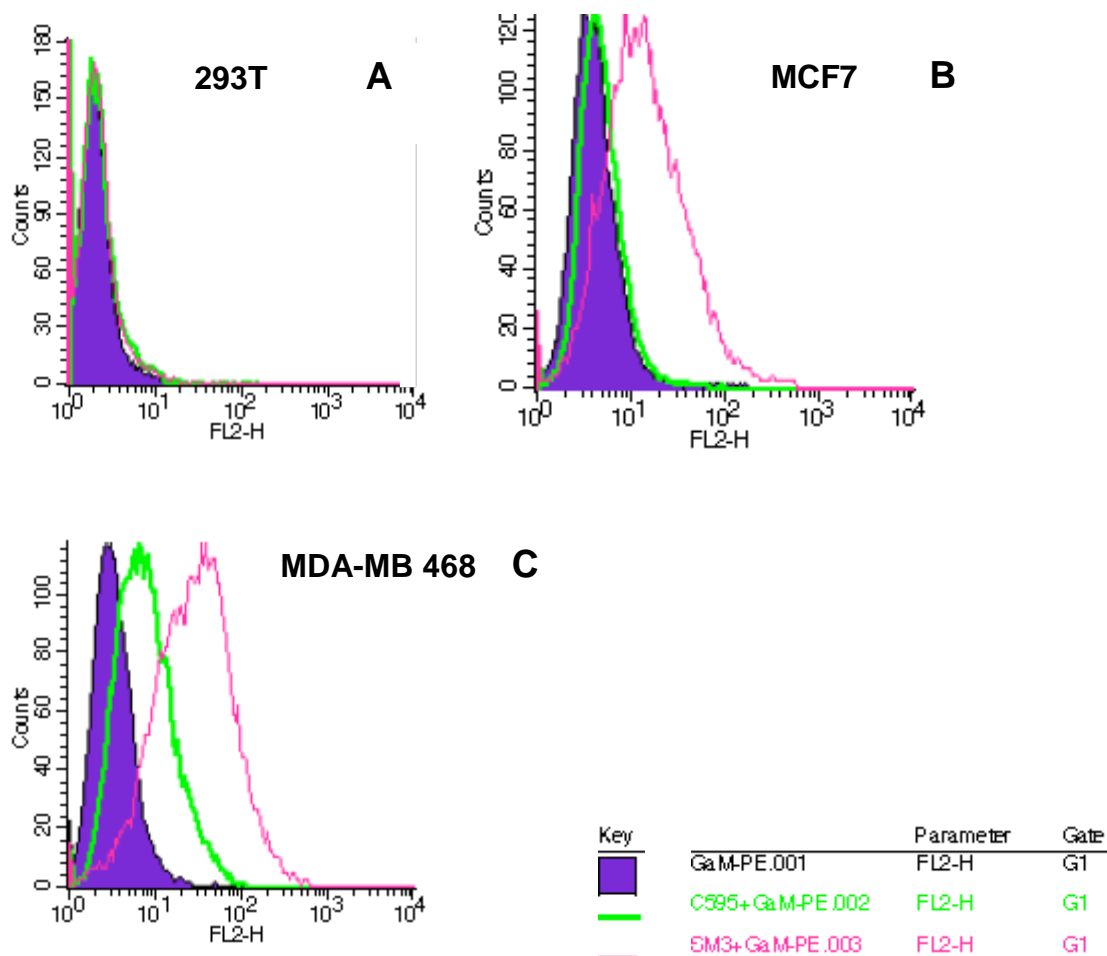


Figura 9 – Análise da capacidade dos mAbs C595 e SM3 detetarem por citometria de fluxo o receptor da membrana celular MUC1 em células MCF7 e MDA-MB-468. Em A verificou-se que os anticorpos C595 e SM3 não detetaram MUC1.

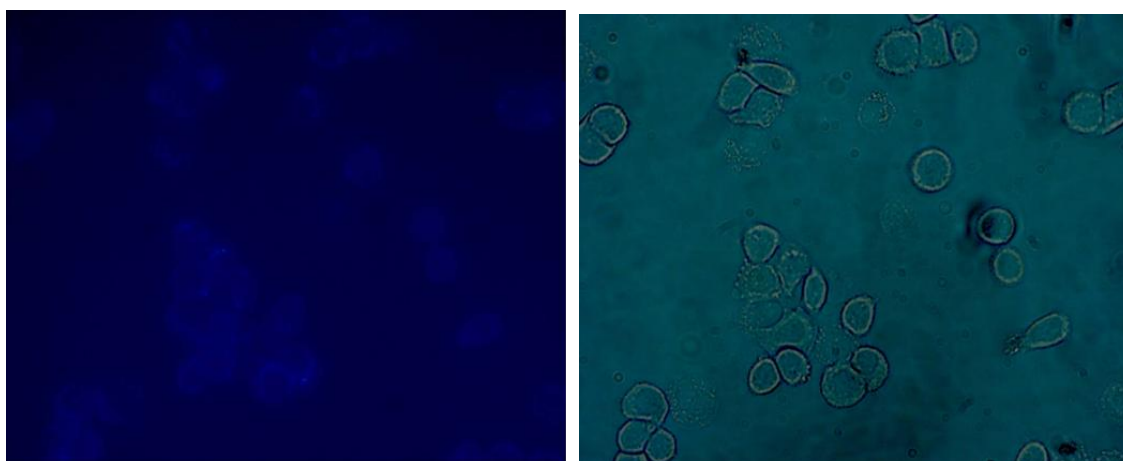
#### 4.2. – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA NA INTERNALIZAÇÃO DAS NPS COM mAb SM3 NAS CÉLULAS MDA-MB-468 ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA

Tal como verificado acima e por outros investigadores, as células MDA-MB-468 de cancro de mama sobre-expressam a proteína MUC1 na sua superfície celular (Singh & Bandyopadhyay, 2007). Com o objectivo de verificar se o mAb SM3 facilitava a internalização das NPs nas células MDA-MB-468, quando conjugadas com ele, preparam-se NPs carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com mAb SM3.

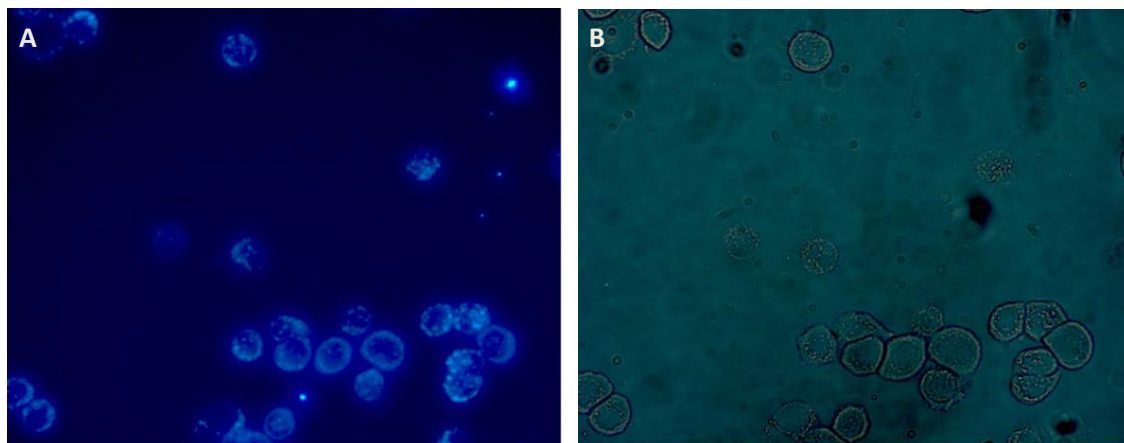
De modo a comparar o grau de internalização, preparou-se também, NPs carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o mAb C595, como também NPs carregadas com 1-metilpireno sem conjugação com anticorpos. Assim, nos poços da placa com células, foi adicionado 200  $\mu$ l NPs com e sem metilpireno, 200  $\mu$ l de NPs conjugadas com anticorpo SM3 e 200  $\mu$ l NPs conjugadas com anticorpo C595.

As células foram incubadas por 1 hora e depois lavadas com PBS para retirar impurezas e depois observadas.

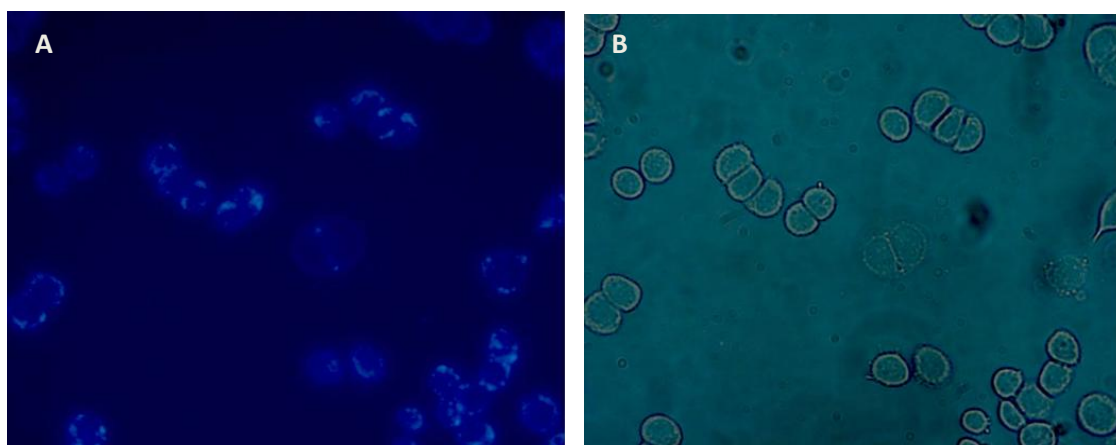
Assim, as células MDA-MB-468, incubadas com NP-MEPI-C595 apresentaram fluorescência mais intensa do que as células incubadas com NP-MEPI-SM3 ou NP-MEPI (Figuras 10-12).



**Figura 10 – Células MDA-MB-468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno (NP-MEPI).** A) Internalização das NPs nas células MDA-MB-468: imagem com filtro de excitação ultravioleta.. B) As mesmas células visualizadas com luz branca. Objectiva de 40X.



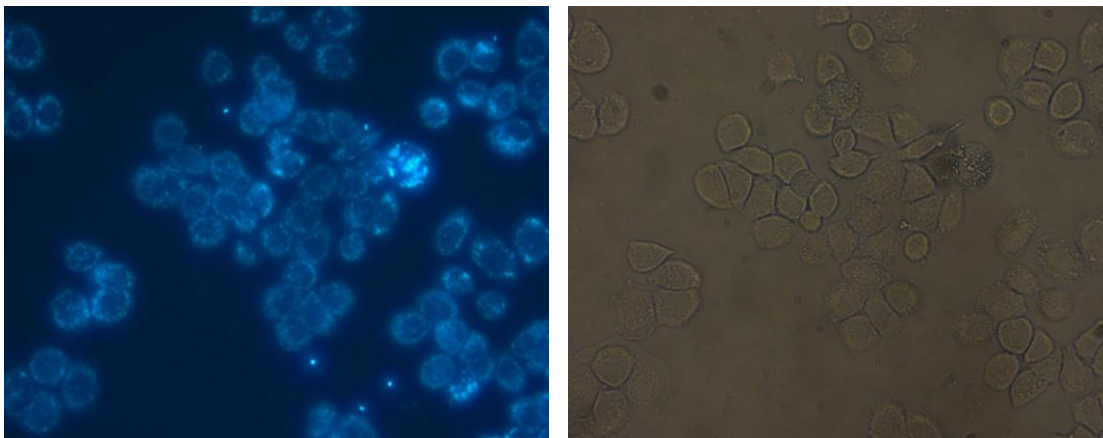
**Figura 11 – Células MDA-MB-468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo C595 (NP-MEPI-C-595).** A) Internalização das nanopartículas (NPMEPI-C595) nas células MDA-MB 468; imagem com filtro de excitação ultravioleta. B) As mesmas células visualizadas com luz branca. Objectiva de 40X.



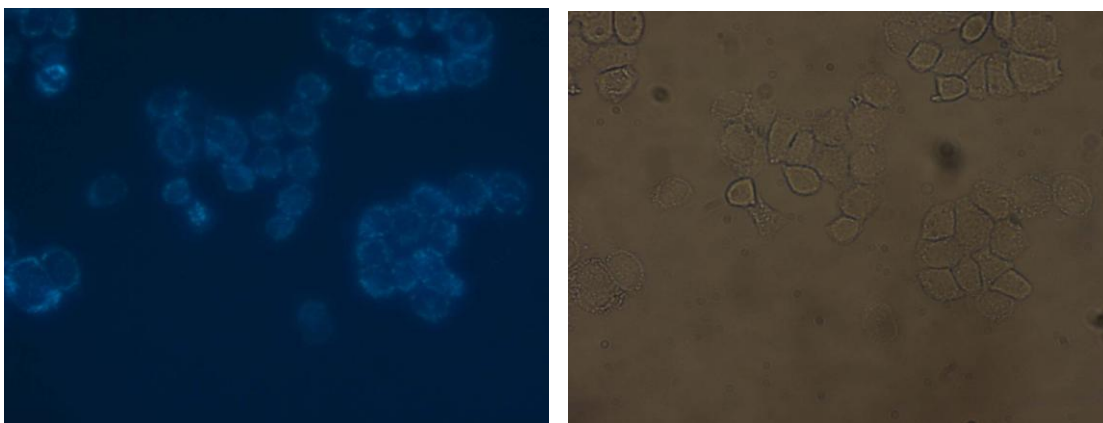
**Figura 12 – Células MDA-MB 468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo SM3 (NPMEPI-SM3).** A) Internalização das nanopartículas (NPMEPI-SM3) nas células MDA-MB 468: imagem com filtro de excitação ultravioleta. B) As mesmas células visualizadas com luz branca. Objectiva de 40X.

Na experiência anterior foi utilizado 30  $\mu$ l de mAb C595 e 5  $\mu$ l de mAb SM3 para conjugar com as NPs. Em experiências posteriores, aumentou-se o volume do mAb SM3 para 30  $\mu$ l, mantendo assim, iguais os volumes dos dois anticorpos utilizados na conjugação com as nanopartículas. A microscopia de fluorescência revelou maior intensidade de fluorescência das células incubadas com NP-MEPI-SM3 quando comparadas com as células incubadas com NP-MEPI-C595 (Figuras 13 e 14). Todas as imagens foram obtidas com o mesmo tempo de exposição. Este resultado está de acordo

com a observação de que o anticorpo SM3 se ligava em maior quantidade às células MDA-MB-468 (figuras 8 e 9).



**Figura 13 – Células MDA-MB 468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo SM3 (NP-MEPI-SM3) com volume igual ao mAb C595. A) Internalização das nanopartículas nas células MDA-MB-468: imagem com filtro de excitação ultravioleta. B) As mesmas células visualizadas com luz branca. Objectiva de 40X.**



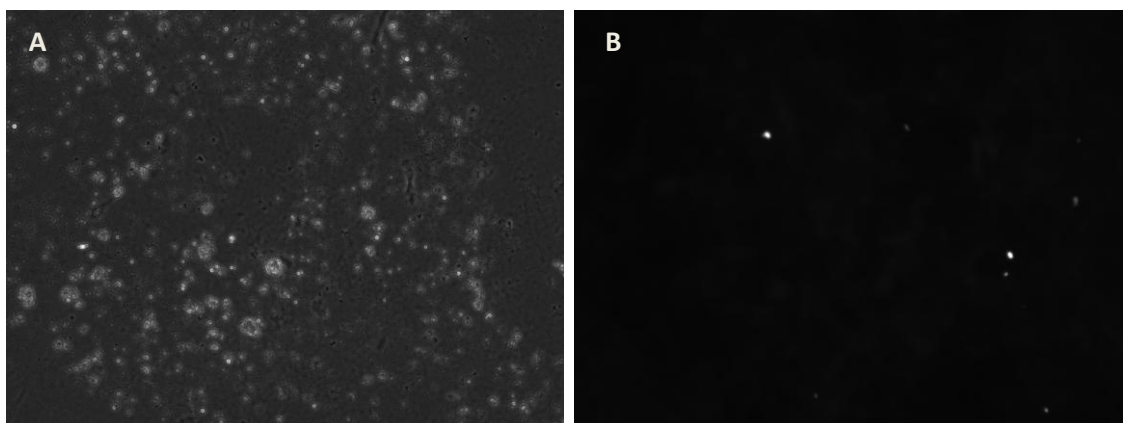
**Figura 14 – Células MDA-MB-468 incubadas com nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com o anticorpo C595 (NP-MEPY-C595). A) Internalização das nanopartículas nas células MDA-MB-468: imagem com filtro de excitação ultravioleta. B) As mesmas células visualizadas com luz branca. Objectiva de 40X.**

## 5. BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS *IN VIVO*

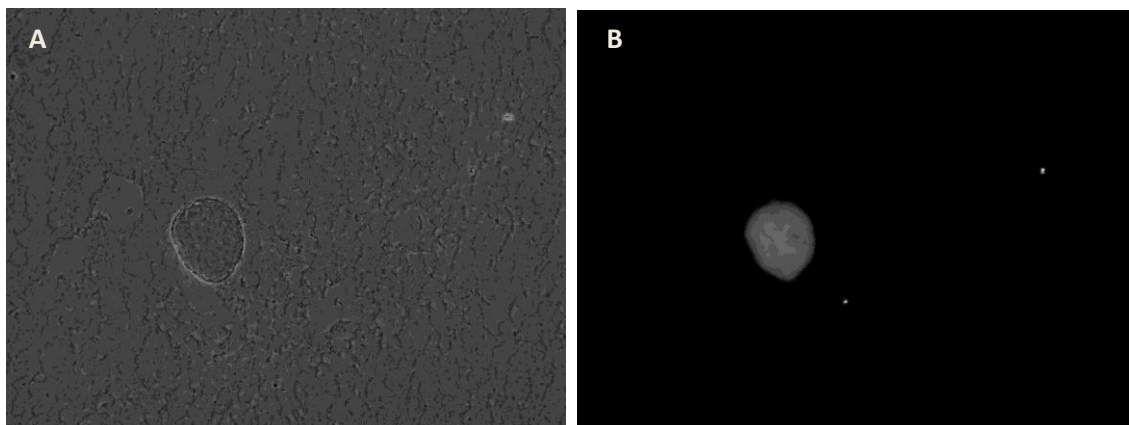
### 5.1. ANÁLISE DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NPs INJETADAS NA VEIA DA CAUDA DE RATINHOS SWISS NUDE

A análise da biodistribuição é de extrema importância para a validação de nanopartículas como meio de transporte e de entrega de drogas ou agentes de contraste, para diagnóstico e tratamento do cancro. Com o propósito de detetar nos tecidos do fígado e do baço a presença do fluoróforo 1-metilpireno, foi injectado em um ratinho 100  $\mu$ l de nanopartículas carregadas com 1-metilpireno (NP-MEPI) através da veia da cauda. Noutro ratinho foram injectados 200  $\mu$ l de NP-MEPI diluídas em PBS na proporção de 1/1. Um terceiro ratinho serviu como controlo. Após 1 hora, os ratinhos foram sacrificados, foi recolhido o fígado e o baço e secções destes órgãos foram observadas em microscopia de fluorescência.

Nos tecidos do ratinho que foram injectados 200  $\mu$ l de NP-MEPI não foi observada fluorescência específica que indicasse presença do fluoróforo, sendo que no baço observou-se apenas um ou dois pontos com pouca fluorescência (Figura 15B). Foi possível observar a presença de um grande agregado fluorescente no tecido do fígado do ratinho (Figura 16B) que foi injectado com 200  $\mu$ l de NPs diluídas.



**Figura 15 – Detecção da presença de NPs nos tecidos do baço do ratinho após injeção de NP-MEPY.** A) Imagem com luz branca do corte do tecido do baço do ratinho, injectado com 200  $\mu$ l de NP-MEPY sem anticorpo conjugado. O tecido foi obtido 1 hora após a injeção da NP-MEPY. Objectiva de 20X.



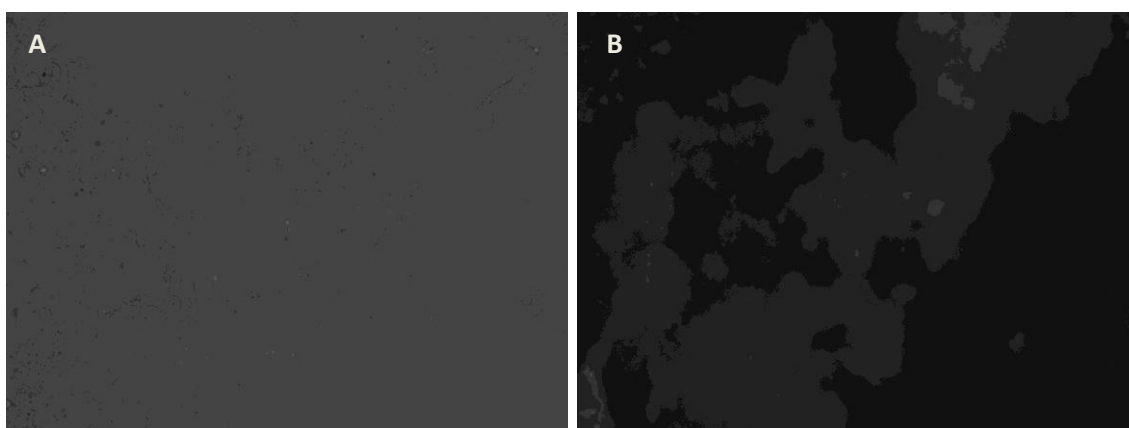
**Figura 16 – Detecção da presença de NPs nos tecidos do fígado do ratinho após injeção de NP-MEPI.** A) Imagem com luz branca (TL) do corte do tecido do fígado do ratinho onde foi injetado 200  $\mu$ l de NP-MEPI sem anticorpo conjugado e diluído em 200  $\mu$ l de PBS. B) Imagem do mesmo tecido obtida com filtro ultravioleta. Objetiva de 20X.

## 5.2. ANÁLISE DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NPS INJETADAS EM TUMORES INDUZIDOS EM RATINHOS SWISS NUDE

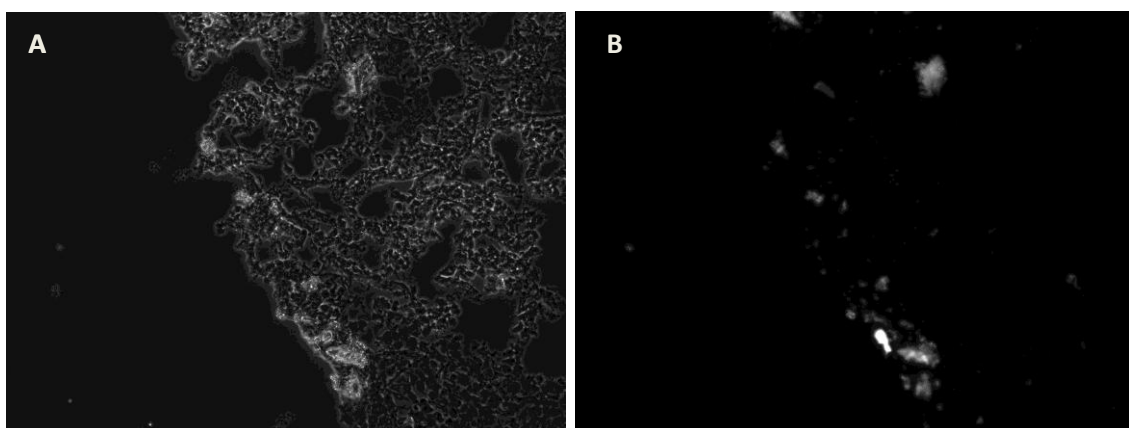
Nesta experiência foram seleccionados 6 ratinhos Swiss Nude, nos quais células MDA-MB-468 foram injectadas subcutaneamente na parte dorsal dos ratinhos, (Apêndice B - Figuras 26 e 27). Quando o tumor se desenvolveu, foi injectado nos tumores água (controlo negativo), suspensão de NP-MEPI ou solução de NP-MEPI-SM3. Após 1 hora, os ratinhos foram sacrificados para obter secções dos tumores. Ao observar o tecido tumoral onde foram injectadas as NP-MEPI-SM3, verificou-se a presença de fluorescência difundida por uma área significativa do tecido (Figura 17A). O tecido tumoral (Figuras 18-20) apresentava uma morfologia diferente em relação ao tecido tumoral da Figura 17, significando que estes cortes representam a parte mais externa do tumor (Figuras 18-20) e a parte mais interna do tumor (Figura 17).

O corte do tecido tumoral onde foi injectado as NP-MEPI (Figura 18A) apresenta uma morfologia condizente com a pele que recobria o tumor. É possível observar vários pontos com fluorescência (Figura 18B) indicando presença do fluoróforo ao longo da extensão do tecido tumoral.

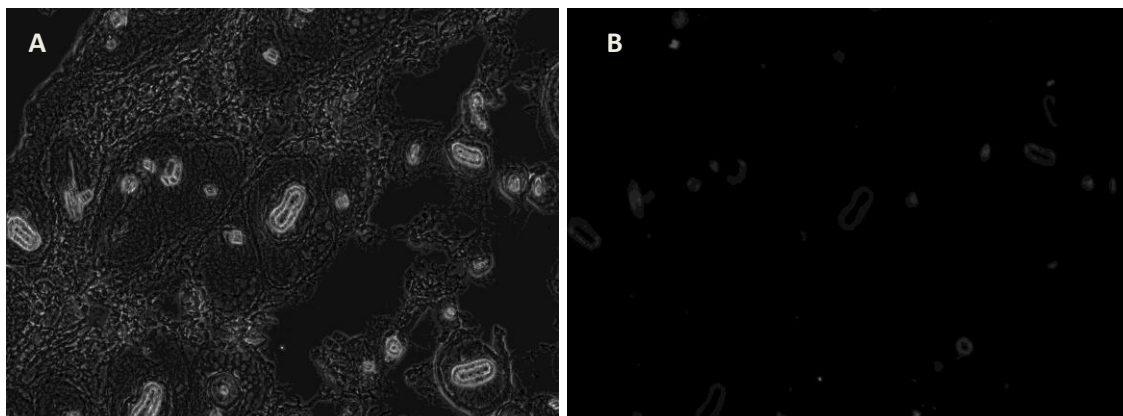
A fim de poder comparar de forma qualitativa o grau de internalização entre as diferentes composições de nanopartículas foram injectadas partículas sem anticorpo (NPMEPI) e partículas sem 1-metilpireno (NPs) no tecido tumoral. As NP-MEPI-SM3 (Figura 18) apresentam níveis maiores de intensidade de fluorescência em comparação com as NP-MEPI (Figura 19) e NPs (Figura 20), sendo que esta comparação foi feita com cortes de tecido com a mesma morfologia.



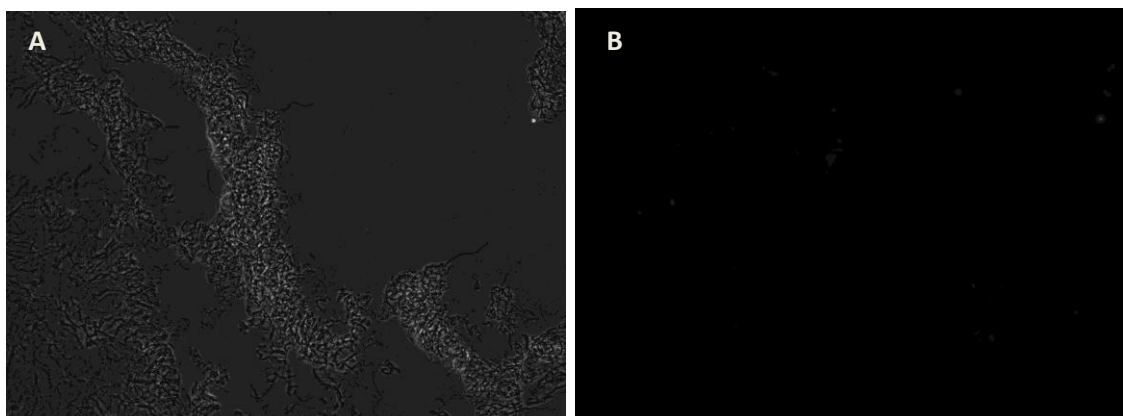
**Figura 17 – Análise da biodistribuição das NP-MEPI-SM3 injectadas nos tumores induzidos em ratinhos swiss nude – corte interno do tecido tumoral** A) Corte do tecido tumoral onde foi injetado 30 µl de NP-MEPI-SM3. Imagem em *bright field*. B) Imagem do mesmo tecido obtida com filtro ultravioleta. Objetiva de 63X.



**Figura 18 - Análise da biodistribuição das NP-MEPI-SM3 injectadas nos tumores induzidos em ratinhos Swiss Nude – corte externo do tecido tumoral** A) Corte do tecido tumoral onde foi injetado 30 µl de NP-MEPI-SM3. Imagem com luz branca. B) Imagem do mesmo tecido obtida com filtro ultravioleta. Objetiva de 20X.



**Figura 19 - Análise da biodistribuição das NP-MEPI injectadas nos tumores induzidos em ratinhos Swiss Nude - corte externo do tecido tumoral** A) Corte do tecido tumoral onde foi injetado 30  $\mu$ l de NP-MEPI. Imagem com luz branca. B) Imagem do mesmo tecido obtida com filtro ultravioleta. Objetiva de 20X.



**Figura 20 - Análise da biodistribuição da água injectada nos tumores induzidos em ratinhos Swiss Nude - corte externo do tecido tumoral** A) Corte do tecido tumoral onde foi injetado 50  $\mu$ l de água. Imagem com luz branca. B) Imagem do mesmo tecido obtida com filtro ultravioleta. Objetiva de 20X.

## CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO

O cancro é uma das doenças com maior incidência em todo o mundo, sendo também uma das maiores causas de morte (Anand et al., 2008). Quando o cancro é detectado precocemente, a taxa de mortalidade diminui e como consequência, a esperança de vida aumenta (Vickers et al, 2012). A utilização da nanotecnologia na área da medicina é uma das muitas

ferramentas disponíveis para deteção e tratamento do cancro (Navalakhe & Nandedkar, 2007).

O desenvolvimento de nanopartículas como veículo para transporte de agentes terapêuticos e de contraste é uma das áreas da nanotecnologia em grande expansão (Monsky et al, 2011). Quando conjugadas com anticorpos, as nanopartículas carregadas com agente terapêutico ou de contraste, podem atingir o tecido-alvo com muito mais eficácia (Fay & Scott, 2011).

Com o objetivo de desenvolver e otimizar nanopartículas para transporte de agentes de contraste e deteção específica de cancro, preparamos micelas poliméricas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com anticorpos que reconhecem a proteína MUC1 nas superfícies das células epiteliais de cancro.

## **1. TESTE DE CITOTOXICIDADE IN VITRO**

Os possíveis efeitos de toxicidade das nanopartículas no corpo humano têm recebido muita atenção por parte dos investigadores. Muitos aspectos da estrutura e composição das nanopartículas influenciam a ocorrência ou não de toxicidade sistémica (Faraji & Wipf, 2009). De acordo com resultados do teste de citotoxicidade das NPs in vitro utilizando a linha celular Jurkat (Figura 4), foi possível observar que as células incubadas com a maior concentração de NPs (1,36 mg/ml) não perderam significativamente a sua viabilidade, em comparação com as células não tratadas. Com concentrações inferiores de NPs, não houve redução da viabilidade celular. O tempo de incubação de 3 dias permitiu que as células ficassem expostas às NPs por um período suficiente para permitir qualquer dano potencial na cultura de células. As partículas utilizadas não continham 1-metilpireno no seu núcleo, sendo que o que foi analisado nesta experiência foi as micelas poliméricas como um polímero di-bloco, composto por PEG e Poli(metacrilato), que deveriam, em teoria, manter a sua estabilidade estrutural intacta. Como as NPs devem manter as suas estruturas estáveis quando em circulação na corrente sanguínea e não devem libertar os compostos encapsulados no seu interior, a

opção de fazer testes somente com as NPs revelou-se acertada. Trabalhos anteriores do laboratório verificaram que NPs encapsuladas com um complexo tóxico de gadolínio também não eram tóxicas para as células Jurkat *in vitro*. De acordo com os resultados obtidos, fica demonstrado que as NP não são tóxicas para as células analisadas nesta experiência.

## 2. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS mAbs PARA MUC1

Como o objetivo de obter NPs específicas para alvejar células de cancro da mama, construímos NPs conjugadas a anticorpos monoclonais contra a proteína MUC1, que se encontra frequentemente sobre-expressa naquela neoplasia (Park & Seo, 2009). Afim de testar a especificidade destes anticorpos contra a proteína MUC1 e ao mesmo tempo verificar se estes anticorpos reconhecem e se ligam à linha celular MDA-MB-468, nosso modelo de estudo, realizámos experiências de imunofluorescência seguida de citometria de fluxo utilizando os mAbs SM3 e C595. Em uma experiência realizada por investigadores, o mAb SM3 foi testado contra a proteína parcialmente glicosilada MUC1 do cancro de mama, e demonstrou-se uma alta especificidade do mAb SM3 para esta proteína (Moller et al., 2002). Assim, com base nos resultados da citometria de fluxo da nossa experiência, foi possível observar que as células MDA-MB-468 expressam a proteína MUC1 e que o mAb SM3 possui uma maior especificidade para esta proteína do que o mAb C595 (Figuras 8 e 9).

Ao realizarmos algumas experiências de imunofluorescências com células MDA-MB-468 incubadas com NPs conjugadas com mAb SM3 e mAb C595 não conseguimos obter os mesmos resultados concordantes com a análise feita através da citometria de fluxo. Nesta experiência, não quantitativa, as nanopartículas NP-MEPI-C595 apresentaram níveis de fluorescência maiores do que NP-MEPI-SM3 e NP-MEPI (Figuras 10-12). Segundo a literatura, o mAb SM3 tem mais afinidade para a MUC1 sub-glicosilada, o qual se encontra sobre-expressa no cancro de mama (Hatstrup & Gendler, 2006), entretanto, nestes primeiros ensaios, obtivemos resultados opostos. Na

preparação para conjugar mAb SM3 e C595 utilizamos 30 µl de mAb C595 e 6 µl de mAb SM3 (segundo o fabricante o mAb SM3 está 5 vezes mais concentrado do mAb C595). Está pode ter sido uma das razões para que, nas imagens o mAb C595 esteja com níveis de fluorescência maiores. Poderia ter havido uma desnaturação parcial do mAb SM3 no momento da preparação ou não ficar bem ligado a superfície do polímero, assim explicando porque as NP-MEPI-SM3 não conferiram tanta fluorescência às células MDA-MB-468.

Nas experiências posteriores, passamos a conjugar os anticorpos com as NPs adicionando o mesmo volume de mAb SM3 e C595 ou seja, 30 µl. Os resultados obtidos pela análise das imagens de microscopia de fluorescência (Figuras 13 e 14), demonstraram haver maior intensidade de fluorescência das células MDA-MB-468 incubadas com NP-MEPI-SM3 do que com as células incubadas com NP-MEPI-C595. Estes resultados vêm corroborar os resultados obtidos na experiência realizada para determinar o grau de especificidade do mAb para o MUC1 através da citometria de fluxo.

### 3. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS PARTÍCULAS

O objectivo da realização desta experiência foi observar o comportamento da NPs em diferentes condições de meio envolvente, como temperatura e contato com a água ou soro de vitela. Visto que o objectivo final é de injectar as NPs no organismo, procuramos mimetizar algumas das condições fisiológicas. As partículas analisadas em água e em temperatura ambiente (RT) e em temperatura de 37 °C apresentaram algumas diferenças no seu diâmetro. As partículas em soro de vitela apresentaram uma quase uniformidade ao longo das 6 horas em que foram submetidas à temperatura de 37 °C. Foram feitos 2 ensaios: no primeiro (Tabela 4), as partículas tinham composição diferente; eram NPs (sem 1-metilpireno) ou NP-MEPI (com 1-metilpireno). Foram adicionadas em água a temperatura ambiente e em soro de vitela à 37°C. O diâmetro inicial da solução de partículas foi medido e ao longo da 1, 3 e 6 horas, foram retiradas as amostras para novas medições. O diâmetro das partículas NPs e NP-MEPI em água após 6 horas aumentou

ao longo do tempo enquanto o diâmetro das partículas em soro de vitela diminuiu de forma acentuada. No segundo ensaio (Tabela 6) foi usado somente NPs sem 1-metilpireno e as partículas foram adicionadas em soro de vitela, água a temperatura ambiente e a 37°C. Os resultados foram semelhantes aos da experiência anterior. Uma hipótese para este resultado seria que as partículas em água tenham formado agregados e as partículas em soro de vitela tenham se desagregado. Em outra experiência realizada, as nanopartículas foram imersas em meio de cultura DMEM (com 10% de FBS) à temperatura de 37°C por 1, 3 e 6 horas. Após 6 horas de incubação, as NPs e as NP-MEPI, tiveram um aumento de diâmetro em relação ao diâmetro inicial, enquanto as NP-MEPI-SM3 tiveram também uma diminuição de diâmetro em relação ao seu diâmetro inicial (Tabela 5). Foi possível observar que o índice de polidispersão (PDI) para as NP-MEPI-SM3 foi muito alto, o que inviabilizou uma análise mais correta do resultado. Quanto mais alto o PDI, índice que representa o desvio do diâmetro da partícula em relação a média, menos uniforme é o diâmetro das nanopartículas na suspensão.

#### **4 . ANÁLISE DO DIÂMETRO DAS NANOPARTÍCULAS**

O controle das dimensão das NPs é um factor importante para a estabilidade da partículas ao longo do seu trajeto em direcção ao tecido alvo (Elsabahy & Wooley, 2012). As etapas de preparação das NPs, incluindo pesar, dissolver, misturar, juntar, dialisar, são factores que têm influência no resultado final. Ao longo do nosso trabalho realizamos diversas preparações de nanopartículas poliméricas. Todas as preparações de nanopartículas de alguma forma mostraram uma grande variabilidade de tamanho entre elas (Tabela 7). O procedimento seguido para medir o diâmetro das nanopartículas no aparelho zetasizer foi sensivelmente o mesmo para todas as medições realizadas. Os diâmetros das partículas variaram em média na ordem dos 200 nm até os 5 µm. A agregação das nanopartículas é um fenómeno comum e complexo, que dificulta a exploração de suas propriedades e aplicações (Li & Kaner, 2006). É possível que as nanopartículas se tenham

agregado no momento em que foram sendo formadas, por isso serão precisos mais estudos para identificar quais os factores que contribuíram para estes resultados. Com o objectivo de confirmar visualmente por microscopia os resultados que obtivemos no zetasizer (visto que muitas NPs formadas estavam na casa dos micrómetros) resolvemos pipetar algumas gotas das amostras de NPs, NP-MEPI e NP-MEPI-SM3 sobre uma lamina de vidro e observar no microscópio fluorescente. Os resultados apresentaram partículas com diâmetros na escala dos micrometros (Apêndice A, Figuras 21-25).

## 5. AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS IN VIVO

Embora tenha havido grande progresso no campo da nanotecnologia e no controle das propriedades físicas, químicas e biológicas dos nanomateriais, ainda há muito por ser feito em relação a estabilidade desses materiais na circulação sanguínea, bem como a sua biodistribuição (Elsabahy & Wooley 2012). Certas características fisico-químicas dos nanomateriais tais como, o diâmetro, o potencial eléctrico e a hidrofobicidade da superfície podem afetar a sua interacção com as proteínas do plasma e outros elementos do sangue e influenciar assim a sua biodistribuição (Xiao et al., 2011). Em relação às experiência *in vivo*, observamos alguma fluorescência nos órgãos e tecidos examinados (Figuras 16-19) indicando presença do fluoróforo nestes locais. Não foi possível concluir se as nanopartículas estiveram nestes tecidos, mas é possível inferir que o fluoróforo 1-metilpireno, esteve presente nestas áreas do tecido do ratinho. As nanopartículas quando entram na circulação sanguínea, estão sujeitas a remoção pelos rins e fígado, desestabilização, agregação, opsonização e RES (Elsabahy & Wooley, 2012). Não é possível saber, com os equipamentos e técnicas que foram usadas neste projeto, qual ou quais os caminhos que as partículas injectadas seguiram, após entrarem na circulação sanguínea e qual foi o seu destino. As amostras de nanopartículas usadas para injectar na corrente sanguínea e no local do tumor tinham diâmetros acima dos 500

nm. As partículas maiores que 200 nm são opsonizadas e captadas pelo sistema RES (Albanese et al., 2012). Os resultados obtidos indicam que são precisos mais estudos e ensaios para otimizar os procedimentos e os materiais usados nas experiências com biodistribuição.

## **CAPÍTULO V – CONCLUSÃO**

Através deste projecto conseguimos determinar que as nanopartículas poliméricas não são tóxicas para as células, que o anticorpo SM3 foi mais sensível para a proteína MUC1, a qual está sobre-expressa nas células MDA-MB-468 do cancro de mama. Verificamos que as nanopartículas quando foram imersas em diferentes meios, por determinado período de tempo e a temperatura controlada, alteraram o seu diâmetro.

Verificamos que as NP-MEPI e NP-MEPI-SM3 quando diluídas em meio de cultura celular, mantiveram a sua integridade conforme foi observado no espectro de fluorescência do 1-metilpireno na forma de monómero e de excímero. Nas experiências *in vivo*, não conseguimos comprovar a presença das nanopartículas nos tecidos alvo examinados mas, foi possível detetar presença do fluoróforo que foi encapsulado nas mesmas.

A preparação de micelas poliméricas é uma das muitas estratégias usadas na área da nanotecnologia médica para desenvolvimento de sistemas de entrega de agentes terapêuticos ou de contraste para diagnóstico e tratamento de patologias como o cancro.

As experiências *in vitro* realizadas, indicam que existe um longo caminho a percorrer na área da preparação de nanopartículas poliméricas, em que o foco deverá estar no melhoramento das técnicas de preparação das partículas e no controle das muitas variáveis que fazem parte deste processo.

Em relação as experiências *in vivo*, entendemos ser necessário aperfeiçoar e testar outros métodos para a obtenção de resultados mais esclarecedores sobre o que acontece com as partículas quando entram na corrente sanguínea.

As nanopartículas carregadas com 1-metilpireno e conjugadas com anticorpo específico para marcadores tumorais pode ser uma alternativa viável para detectar o cancro numa fase precoce, entretanto será preciso muito mais tempo para entender e controlar todos os factores que influenciam as características óptimas das nanopartículas como sistemas de transporte dirigido a um alvo específico.

Em termos de perspectivas futuras, será preciso encontrar novos meios para controlar o tamanho das nanopartículas nas suas diversas etapas de preparação, procurando diminuir o seu tamanho para um diâmetro abaixo dos 100 nanómetros. Em relação a substância de encapsulamento, propomos que se façam experiências *in vivo* com o gadolínio Gd(III), para que assim se possa testar o produto final, que são nanopartículas com gadolínio como agentes de contraste.

## REFERÊNCIAS

Albanese , A., Tang , P., & Chan, W. (2012). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*,14:1-16.

Anand, P., Kunnumakara, A., Sundaram, C., Harikumar, K., Tharakan, S., Lai, O., et al (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9): 2097–2116.

Anderson, S., Rader, R., Westlin, W., Null, C., Jackson, D., Lanza, G. et all. (2000) Magnetic Resonance Contrast Enhancement of Neovasculature With avb3-Targeted Nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine*, 44:433–439.

Bae, Y., Nishiyama, N., Kataoka, K. (2007). In Vivo Antitumor Activity of the Folate-Conjugated pH-Sensitive Polymeric Micelle Selectively Releasing Adriamycin in the Intracellular Acidic Compartments. *Bioconjugate Chemistry*, 18: 1131-1139.

Bhang, H., Gabrielson, K., Lattera, J., Fisher, P., Pomper, M.. (2011) Tumor-specific imaging through progression elevated gene-3 promoter-driven gene expression. *Nature Medicine*, 17 (1): 123-130.

Bhaskar, S., Tian, F., Tobias, S., Kreyling, W., de la Fuente, J., Grazú, V., et al. (2010). Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Particle and Fibre Toxicology*, 7:(3)

Blixt, O., Bueti, D., Burford, B., Allen, D., Julien, S., Hollingsworth, M., et al. (2011). Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast Cancer Research*, 13(2): R25.

Borbás, K., Ferreira, C., Perkins A., Bruce, J., & Missailidis, S. (2007) Design and Synthesis of Mono- and Multimeric Targeted Radiopharmaceuticals Based on Novel Cyclen Ligands Coupled to Anti-MUC1 Aptamers for the Diagnostic Imaging and Targeted Radiotherapy of Cancer. *Bioconjugate Chemistry*, 18(4):1205-12

Bridot, J., Faure, A., Laurent, S., Rivière, C., Billotey C. , Hiba, B., et al (2007) Hybrid Gadolinium Oxide Nanoparticles: Multimodal Contrast Agents for in Vivo Imaging. *Journal of American Chemical Society*, 129: 5076-5084

Brinkhuis, R., Stojanov, K., Laverman, P., J, Eilander., Zuhorn, I., Rutjes , F., et al.,(2012). Size Dependent Biodistribution and SPECT Imaging of <sup>111</sup>In-

Labeled Polymersomes. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, (23): 958–965.

Burchell, J., Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Girling, A., Lewis, A., Millis, R., Lampert, D. (1987). Development and Characterization of Breast Cancer Reactive Monoclonal Antibodies Directed to the Core Protein of the Human Milk Mucin. *Cancer Research*, 47: 5476-5482.

Caldorera-Moore, M., Guimard, N., Shi, L., Roy, K., (2010). Designer nanoparticles: Incorporating size, shape, and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opinion Drug Delivery*, 7(4): 479–495

Carter, P. (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, (1): 118–129

Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., Shin, D. (2008). Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14:(5)

Constantinou, P., Danysh, B., Dharmaraj, N., Carso, D. (2011). Transmembrane mucins as novel therapeutic targets. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 6(6): 835–848.

Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P. & Speiser, P. (1979), Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 31: 331–332.

Danysh, B., Constantinou, P., Lukianova-Hleb, E., Lapotko, D., Carson, D. (2012). The MUC1 Ectodomain: A Novel and Efficient Target for Gold Nanoparticle Clustering and Vapor Nanobubble Generation. *Theranostics*, 2(8):777-787.

Dey, S., & Maiti, T. (2012) Superparamagnetic Nanoparticles and RNAi-Mediated Gene Silencing: Evolving Class of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Journal of Nanomaterials*, 2012 -ID 129107

Elsabahy, M., Wooley, K. (2012). Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews*, 41 (7): 2521–3012.

Faraji, A., Wipf, P. (2009) Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 17(8):2950–62.

Fassa, L. (2008) Imaging and cancer: A review. *molecular oncology*, 2:115 – 152

Fay, F., Scott, C. (2011). Antibody-targeted Nanoparticles for Cancer Therapy. *Immunotherapy*, 3(3):381-394.

Ferreira, C., Cheung, M., Missailidis, S., Bisland, S., & Gariépy, Jean. (2009).

Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 37 (3): 866-876

Frangioni, J. (2008). New Technologies for Human Cancer Imaging. *Journal of clinical oncology*, 26 (24): 4012-4021

Garg, A., Kokkoli, E. (2011). pH-Sensitive PEGylated Liposomes Functionalized With a Fibronectin Mimetic Peptide Show Enhanced Intracellular Delivery to Colon Cancer Cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12: 1135-1143.

Goel, R., Shah, N., Visaria, R., Paciotti, G., Bischof, J. (2009). Biodistribution of TNF- $\alpha$ -coated gold nanoparticles in an in vivo model system. *Nanomedicine (Lond)*, 4(4): 401–410.

Gonçalves, C., Ferreira, M., Santos, A., Prata, M., Gerales, C., Martins, Gama, F. (2010) Studies on the biodistribution of dextrin nanoparticles. *Nanotechnology*, 21 295103 (pp 1-9). 2010 IOP Publishing Ltd U.K

Gratton S., Ropp P., Pohlhaus P., Luft J., Madden V., Napier M., et al. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings National Academy Science*, 105 (33):11613–8.

Gunasekera, U., Pankhurst, Q., Douek, M. (2009). Imaging applications of nanotechnology in cancer. *Target Oncology*, 4 (3): 169 – 181

He, C., Hua, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31: 3657–3666

He, Xi., Wang, K., & Cheng, Z. (2010). In vivo near-infrared fluorescence imaging of cancer with nanoparticle-based probes. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2:349-366

Hedlund, A., Ahrén, M., gustafsson, H., Abrikossova, N., Warntjes, M., Jönsson, J. et al. (2011) gd2O3 nanoparticles in hematopoietic cells for Mri contrast enhancement. *International Journal of Nanomedicine*, 6: 3233–3240

Huang, J., Zhong, X., Wang, L., Yang, L & Mao, H. (2012). Improving the Magnetic Resonance Imaging Contrast and Detection Methods with Engineered Magnetic Nanoparticles. *Theranostics.*, 2(1):86-102

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. (2010). Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60 (5): 277-300.

Jones, E., Semsarilar, M., Blanazs, A., Armes, S. (2012). Efficient Synthesis of Amine-Functional Diblock Copolymer Nanoparticles via RAFT Dispersion

Polymerization of Benzyl Methacrylate in Alcoholic Media. *Macromolecules*, 45 : 5091–5098

Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C., Ha, T. (2008). Advances in Single-Molecule Fluorescence Methods for Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 77:51-76

Koolen, B., Vogel, W., Peeters, M., Loo, C., Rutgers, E., & Olmos, R. (2012). Molecular Imaging in Breast Cancer: From Whole-Body PET/CT to Dedicated Breast PET. *Journal of Oncology*, Vol. 2012, Article ID 438647

Kosma, P., S, Muller-loennies.,(2012) Anticarbohydrate antibodies. Em Agostino, M., Farrugia, W., Sandrin, M., Scott, A., Yuriev, E., Ramsland, P. *Structural glycobiology of antibody recognition in xenotransplantation and cancer immunotherapy* (pp. 203-228). New York : Springer

Langer, R. & Folkman, J. (1976). Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*, 263: 797 – 800

Lee, E., Gao, Z., Bae, Y. (2008). Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. *Journal of Controlled Release*, 132: 164–170)

Lee, M., Veiseh, O., Bhattarai, N., Sun, C., Hansen, S., Ditzler, S. et al. (2010). Rapid Pharmacokinetic and Biodistribution Studies Using Chlorotoxin-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles: A Novel Non-Radioactive Method. *PLoS ONE*, 5 (3): 1-8, e9536.

Li, D. & Kaner, R. (2006). Shape and Aggregation Control of Nanoparticles: Not Shaken, Not Stirred. *Journal American Chemistry Society*, 128: 968-975

Li, S. & Huang, L. (2008). Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Molecular pharmaceuticals*, 5 (4): 496–504

Lopez, D., Sekharam, M., Coppola, D., & Carter, W. (2008). Purified human chorionic gonadotropin induces apoptosis in breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9):2837-2844

Maeda, H., Wua, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *Journal of Controlled Release*, 65 : 271–284.

Mahoney, B., Raghunand, N., Baggett, B., Gillies, R. (2003). Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 66 :1207–1218).

Makovitzki, Arik., Fink, Avner., and Shai, Yechiel. (2009). Suppression of Human Solid Tumor Growth in Mice by Intratumor and Systemic Inoculation of

Histidine-Rich and pH-Dependent Host Defense-like Lytic Peptides. *Cancer Research*, 49. 4.173-4384.

Medarova, Z., Rashkovetsky, L., Pantazopoulos, P., Moore, A. (2009). Multiparametric Monitoring of Tumor Response to Chemotherapy by Noninvasive Imaging. *Cancer Research*, 69 (3):1182-1189.

Menon, S. & Das, S., (2012). A photoresponsive fluorescent glycopolymer. *Polymer Chemistry*, (3): 2619–2624.

Moller, H., Serttas, N., Paulsen H. , Burchell,, J., Taylor-Papadimitriou, J., Bernd, M. (2002). NMR-based determination of the binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3. *European Journal. Biochemistry*, (269,):1444 -1455

Monsky, W., Vien, D., Link, D. (2011). Nanotechnology Development and Utilization: A Primer for Diagnostic and Interventional Radiologists. *RadioGraphics*, 31:1449–1462.

Moore, A., Medarova, Z., Potthast, A., & Dai, G. (2004). In Vivo Targeting of Underglycosylated MUC-1 Tumor Antigen Using a Multimodal Imaging Probe. *Cancer Research* , 64: 1821–1827.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, (1–2): 55–63.

Mouffouk, F., Rosa da Costa, A., Martins, J., Zourob M., Abu-Salah, K., Alrokayan, S. (2011). Development of a highly sensitive bacteria detection assay using fluorescent pH-responsive polymeric micelles. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 3517–3523

Mulder, W., Cormode, D., Hak, S., Lobatto, M., Silvera ,S. and Fayad, Z. (2008) Multimodality nanotracers for cardiovascular applications. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, (5) S103-S111.

Navalakhe R., Nandedkar T. (2007). Application of nanotechnology in biomedicine. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(2):160-165

Nie, S., Xing, Y., Kim, G., Simons, J. (2007). Nanotechnology Applications in Cancer. *Annual Review of Biomedical Engineering.*, 9:257-288

Noh, T., Kook, Y., Park, C. , Youn, H., Kim, H. , Oh. (2008) E. Block Copolymer Micelles Conjugated with anti-EGFR Antibody for Targeted Delivery of Anticancer Drug. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 46: 7321-7331.

Ntziachristos, V.(2006) Fluorescence Molecular Imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering.*, 8:1-33.

Oerlemans, C., Bult, W., Mariska, B., Storm, G., Nijsen, F, J., Hennink, W. et al (2010). Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release. *Pharmaceutical Research*, 27(12): 2569–2589.

Owen, S., Chan, D., Shoichet, M.(2012). Polymeric micelle stability . *Nano Today*, 7: 53—65.

Park, H. & Seo, U. (2009). MUC1 from the Mucin Family as Potential Tools in Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*, 12(3): 125-33.

Potineni, A., Lynn, D., Langer, R., Amiji, M. (2003) Poly(ethylene oxide)-modified poly(b-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive biodegradable system for paclitaxel delivery. *Journal of Controlled Release*, 86: 223–234.

Riggio, C., Pagni, E., Raffa, V., Cuschieri, A.,(2011). Nano-Oncology: Clinical Application for Cancer Therapy and Future Perspectives. *Journal of Nanomaterials*, vol. 2011, Article ID 164506

Ross, J., S., Pietrusko, R., Rolfe, M., Linette, G., Stec, J. (2004). Targeted Therapies for Cancer 2004. *American Journal of Clinical Pathology*, 122 (4):598-609

Sahay, Gaurav., Kim, Jong O., Kabanov, Alexander V., Bronich, Tatiana K. (2010). The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials*, 31: 923–933

Sahu, S. & Prusty, A.(2010). Toxicological and Regulatory Consideration of Pharmaceutically Important Nanoparticles. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(1): 08-12

Sawant, R., Sawant, R., Gultepe, E., Nagesha, D., Papahadjopoulos-Sternberg, B., Sridhar, S. et al (2009). Nanosized cancer cell-targeted polymeric immunomicelles loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 11 (7): 1777-1785.

Schwoppe, C., Kessler, T., Persigehl T., Liersch, R., Hintelmann, H., Dreischaluck, J. (2010). Tissue-factor fusion proteins induce occlusion of tumor vessels. *Thrombosis Research*, 125(S2): S143–S150.

Semete, B., Booyesen, L., Lemmer, Y., Kalombo, L., Katata, L., Verschoor, J., et al. (2010). In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA

nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6: 662–671

Severino, P., Santana, M., Malmonge, S., Souto, E. (2011). Polímeros Usados como Sistemas de Transporte de Princípios Ativos. *Polímeros*, 21 (5): 361-368.

Shah, N., Vercellotti, G., White, J., Fegan, A., Wagner, C., Bischof, J. (2012). Blood–Nanoparticle Interactions and in Vivo Biodistribution: Impact of Surface PEG and Ligand Properties. *Molecular Pharmaceutics*, 9: 2146–2155.

Shankar., L. Hoffman, J., Bacharach, S., Graham, M., Karp, J., Lammertsma, A., et al., (2006). *The journal of nuclear medicine*, 47 (6): 1059-1066.

Shanker, M., Jin, J., Branch, C., Miyamoto, S., Grimm, E., Roth, J. (2011). Tumor Suppressor Gene-Based Nanotherapy: From Test Tube to the Clinic. *Journal of Drug Delivery*, 2011: 465845

Singh, R., & Bandyopadhyay, D. (2007). A Target Molecule for Cancer Therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 6 (4): 481-486.

Song, E., Qu, C., Rizvi, S., Raja, C., Beretov, J., Morgenstern, A. et al., (2008). Bismuth-213 radioimmunotherapy with C595 anti-MUC1 monoclonal antibody in an ovarian cancer ascites model. *Cancer Biology & Therapy*, 7:(1) 76-69.

Su, J., Chen, F., Cryns, V., Messersmith, P., (2011). Catechol Polymers for pH-Responsive, Targeted Drug Delivery to Cancer Cells. *Journal of The American Chemical Society*. 133 (31): 11850–11853

Tabakovic, A., Kester, M., & Adair, J. (2012). Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications. *WIREs Nanomed Nanobiotechnology*, 4:96–112.

Torres, E., Mainini, F., Napolitano, R., Fedeli, F., Cavalli, R., Aime, S. (2011). Improved paramagnetic liposomes for MRI visualization of pH triggered release. *Journal of Controlled Release*. 154 (2): 196-202.

Tsien, R. (2005). Building and breeding molecules to spy on cells and tumors. *FEBS Letters*. 579:927–32.

Vickers, A., Roobol, M., Lilja, H. (2012). Screening for Prostate Cancer: Early Detection or Overdetection? *Annual Review of Medicine*, 63:161–70.

Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J., Xiao, W., Gonik, A., et al. (2011). The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, 32: 3435 – 3446.

Yang, E., Hu, X. & Xing, P. (2007). Advances of MUC1 as a target for breast cancer immunotherapy. *Histology & Histopathology*, 22: 905-922.

Yih, T. & Al-Fandi, M. (2006). Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97:1184–1190.

Zarabi, B., Nan, A., Jiachen, Z., Gullapalli, R., Ghandehari, H. (2008). HEMA Copolymer–Doxorubicin–Gadolinium Conjugates: Synthesis, Characterization, and in vitro Evaluation. *Macromolecular Bioscience*, 8: 741–748.

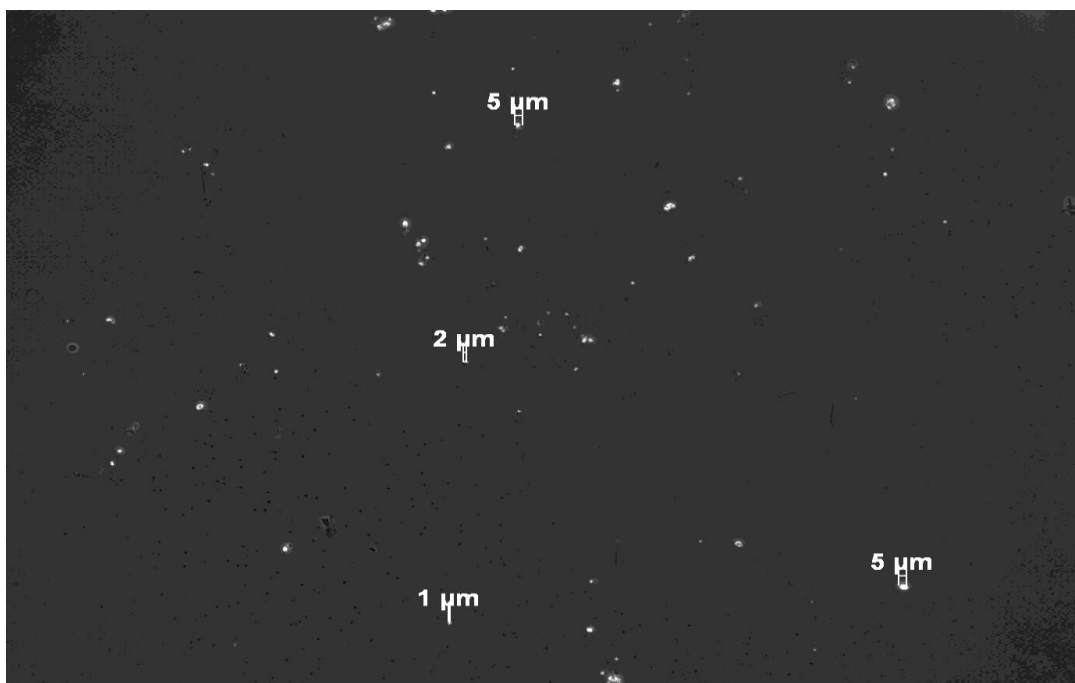
Zaretsky, J., Barnea, I., Aylon, Y., Gorivodsky, M., Wreschner, D., Keydar, I. (2006). MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1 promoter and role of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) in regulation of the MUC1 gene expression. *Molecular Cancer*, 5 (57):1-14

Zhang, L., Gu, F., Chan, J., Wang, A., Langerand, R., Farokhzad, O. (2008). Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 83 ( 5): 761–769.

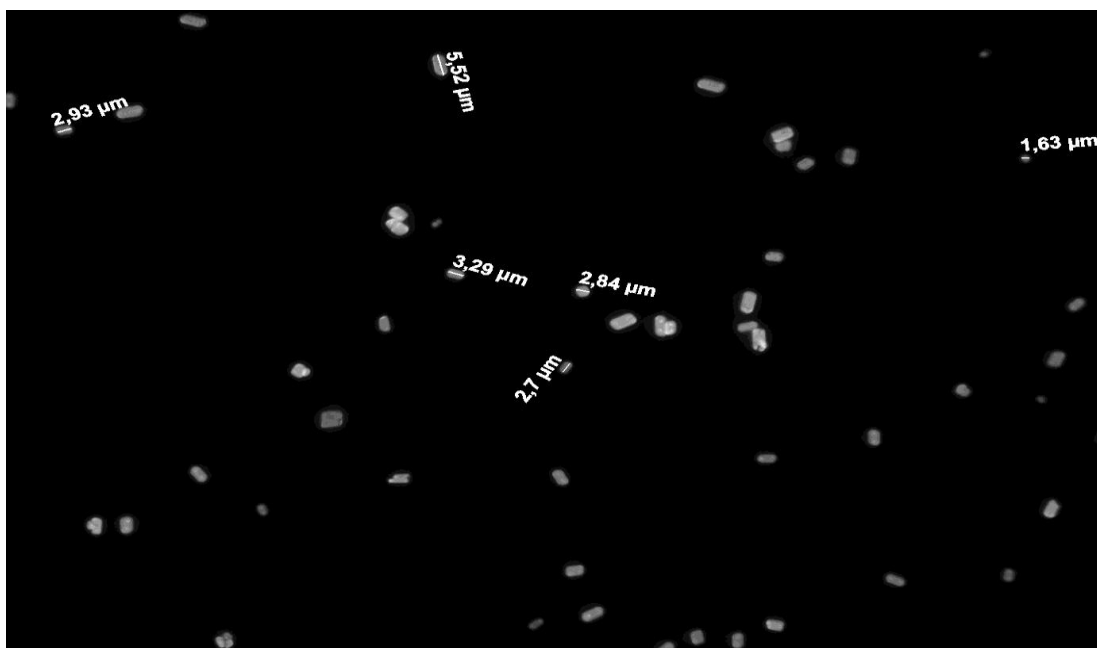
## APENDICE A



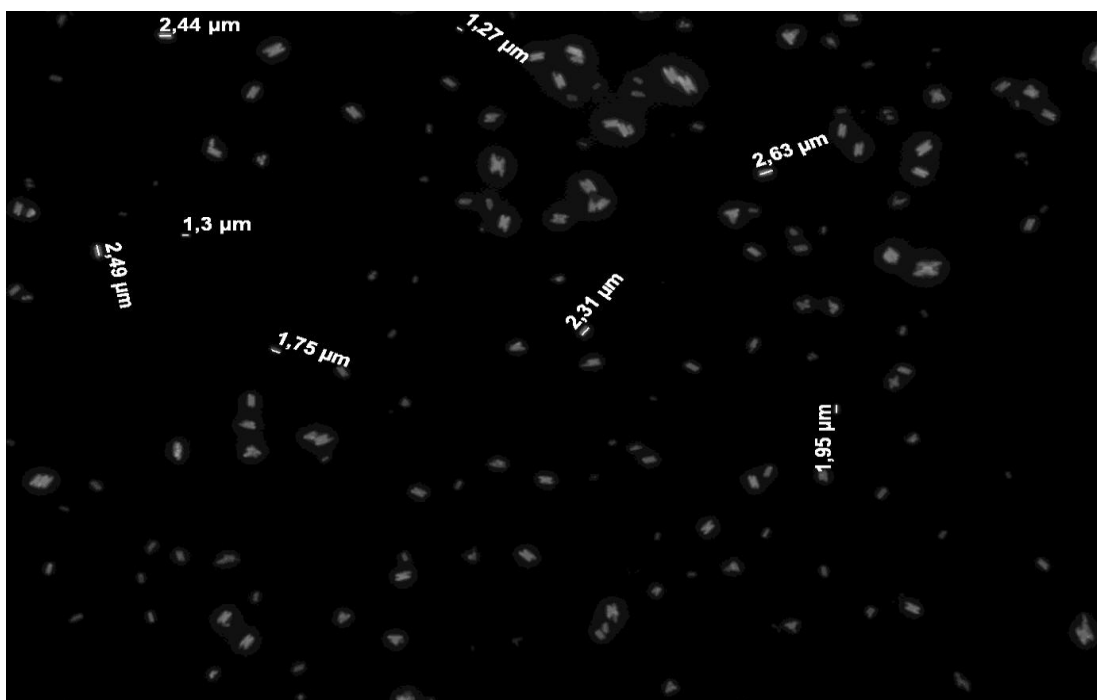
**Figura 21 - Gota de NP-MEPI pipetada sobre uma lamina de vidro.** Foi seca em temperatura ambiente na camara de fluxo laminar. Imagem observada através de microscópio Fluorescente. Com Objectiva 20X



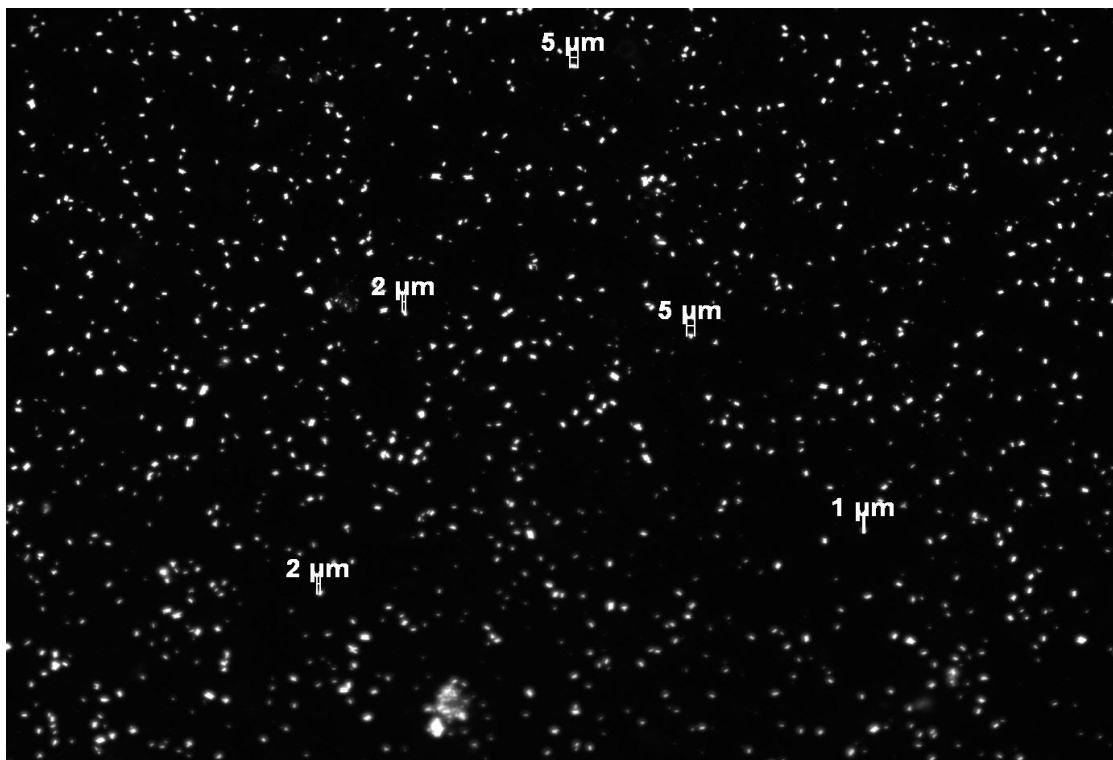
**Figura 22 - Gota de NP-MEPI pipetada sobre uma lamina de vidro.** Foi seca em temperatura ambiente na camara de fluxo laminar. Imagem observada através de microscópio Fluorescente. Objectiva com ampliação 20X.



**Figura 23** - Gota de NP-MEPI-C595 pipetada sobre uma lamina de vidro. Foi seca em temperatura ambiente na camara de fluxo laminar. Imagem observada através de microscópio Fluorescente Objectiva de 20X.



**Figura 24** - Gota de NP-MEPI-SM3 pipetada sobre uma lamina de vidro. Foi seca em temperatura ambiente na camara de fluxo laminar. Imagem observada através de microscópio Fluorescente Objectiva de 20X.



**Figura 25 - Gota de NP-MEPI-SM3 pipetada sobre uma lamina de vidro.** Foi seca em temperatura ambiente na camara de fluxo laminar. Imagem observada através de microscópio Fluorescente Objectiva com ampliação 20X.

## APENDICE B



**Figura 26 – Ratinho Swiss Nude usado nas experiências de biodistribuição.**  
Os ratinhos tinham idade compreendidas entre 2 e 3 meses



**Figura 27 – Ratinho Swiss Nude usado nas experiências de biodistribuição.**  
Os ratinhos tinham idade compreendidas entre 2 e 3 meses