

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Suélío Marinho de Queiroz

**Nanopartículas de ouro funcionalizadas aos complexos de Gadolínio e EGF
para detecção precoce do câncer de mama**

São José dos Campos – SP
2021

SUÉLIO MARINHO DE QUEIROZ

**NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS AOS COMPLEXOS DE
GADOLÍNIO E EGF PARA DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Maiara Lima Castilho
Coorientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

São José dos Campos – SP
2021

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Queiroz, Suélio Marinho de
Nanopartículas de ouro funcionalizadas aos complexos de Gadolínio e EGF para detecção precoce do câncer de mama / Suélio Marinho de Queiroz; orientadora, Profa. Dra. Maiara Lima Castilho; co-orientador Prof. Dr. Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2021.
1 CD-ROM, 53 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Câncer. 3. Ressonância Magnética. 4. Nanopartículas. 5. Gadolínio. I. Castilho, Profa. Dra. Maiara Lima, orient. II. Raniero, Prof. Dr. Leandro José, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Suélio Marinho de Queiroz, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 18 de Maio de 2021.

Autor(a) da Obra

SUÉLIO MARINHO DE QUEIROZ

“NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS AOS COMPLEXOS DE
GADOLÍNIO E EGF PARA DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER DE MAMA”.

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª JULIANA FERREIRA STRIXINO _____

PROF.^ª DR.^ª MAIARA LIMA CASTILHO _____

PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO _____

PROF.^ª DR.^ª ANDREA SANTOS LIU - IFSP _____

Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 09 de abril de 2021.

*Dedico este trabalho a minha **família** que sempre me encorajou e acreditou nos meus sonhos. Aos meus filhos que me ensinaram muito do que sei da vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar aqui e ter me dado ânimo, coragem e determinação para realizar este trabalho.

Agradeço também aos meus pais (*in memoriam*) pela eterna inspiração.

A minha orientadora e Prof.^a Dra. Maiara Castilho pela sabedoria e humildade. Sem ela teria sido difícil ou talvez impossível chegar até o fim deste trabalho.

Agradeço a Thaís Veriato, Miller Marques, Carlos Dailton, Letícia Reis e Alessandra Wagatsuma que muito me ajudaram a tornar realidade este sonho.

Por fim meus agradecimentos a todo o staff da Universidade desde os colaboradores menos graduados aos mais graduados.

“Veni, Vidi, Vici”.

“Vim, vi e venci”.

(Júlio César, em 47 a.C.)

RESUMO

O câncer pode ser definido como doença heterogênea vinculada a fatores ambientais, estilo de vida e mutações, representando a segunda causa de morte no Brasil e no Mundo. Dentre os diferentes tipos, destaca-se o câncer de mama, visto ser a maior causa de morte que acometem mulheres, sendo considerado um problema de saúde pública. O carcinoma mamário exibe diferentes vias de sinalização para a sobrevivência, crescimento e tratamento. O subtipo basalóide representa aproximadamente 20% dos casos de carcinoma mamário, sendo conhecido como triplo negativo por apresentar a ausência da expressão de receptores de estrogênio, progesterona e do fator de crescimento epidérmico 2, e superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico. Essas características podem ser associadas ao difícil diagnóstico e pior prognóstico. Neste contexto, o diagnóstico precoce destes tipos de câncer oferece uma possível solução para essa problemática. Assim, a ressonância magnética (RM) associada ao uso de substâncias paramagnéticas, conhecidas como os agentes de contraste, entre eles o Gadolínio (Gd) podem ser utilizados como um método alternativo para o diagnóstico precoce. Embora a RM possua uma alta sensibilidade, esta técnica apresenta baixa especificidade que podem ser superadas com o uso das nanopartículas de ouro, que se destacam como uma opção promissora para diagnóstico direcionado, visto permitir funcionalização de moléculas biológicas como a proteínas, peptídeos entre outros. Assim, o objetivo desta dissertação é desenvolver nanopartículas de ouro transportadoras do agente de contraste à base de Gd com o direcionamento ativo, por meio da proteína do fator de crescimento epidérmico. Este nanocontraste foi sintetizado utilizando a química via carbodiimida para diagnóstico precoce câncer de mama, sendo caracterizado pelas análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, Espectroscopia no UV-visível e Espalhamento Dinâmico de Luz. Os resultados indicaram que o nanocontraste apresentou um diâmetro médio de 43 nm com boa estabilidade coloidal, a eficiência do nanocontraste para diagnóstico do câncer de mama foi determinado pela intensidade relativa de sinal produzida em uma região de interesse em comparação ao contraste comercial. Embora, o nanocontraste tenha mostrado uma intensidade de sinal inferior ao comercial, é importante ressaltar que o mesmo possui uma molécula alvo para o direcionamento o que permitirá uma maior sensibilidade e especificidade para diagnóstico precoce do câncer. A viabilidade celular e atividade mitocondrial em linhagem celular MDA-MB-468, exibiu excelente biocompatibilidade e seletividade do nanocontraste, bem como baixa citotoxicidade, o que evidencia grande potencial para aplicações em diagnóstico.

Palavras-chave: Câncer; Ressonância Magnética; Nanopartículas de ouro; Gadolínio.

ABSTRACT

Cancer can be defined as a heterogeneous disease linked to environmental factors, lifestyle and mutations, representing the second cause of death in Brazil and in the world. Among the different types, breast cancer stands out, as it is the major cause of death that affects women, being considered a public health problem. Breast carcinoma exhibits different signaling pathways for survival, growth and treatment. The basaloid subtype represents approximately 20% of breast carcinoma cases, being known as triple negative because it has no expression of estrogen receptors, progesterone and epidermal growth factor 2, and overexpression of the epidermal growth factor receptor. These characteristics can be associated with difficult diagnosis and worse prognosis. In this context, the early diagnosis of these types of cancer offers a possible solution to this problem. Thus, magnetic resonance imaging (MRI) associated with the use of paramagnetic substances, known as contrast agents, including Gadolinium (Gd) can be used as an alternative method for early diagnosis. Although MRI has a high sensitivity, this technique has low specificity that can be overcome with the use of gold nanoparticles that stand out as a promising option for targeted diagnosis, since it allows functionalization of biological molecules such as proteins, peptides, among others. Thus, the objective of this dissertation is to develop gold nanoparticles that transport the Gd-based contrast agent with active targeting, through the epidermal growth factor protein. These nanocontrast were synthesized using chemistry via carbodiimide for early breast cancer diagnosis, being characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, UV-visible Spectroscopy and Dynamic Light Scattering. The results indicated that the nanocontrast had an average diameter of 43 nm with good colloidal stability, the efficiency of the nanocontrast for diagnosis of breast cancer was determined by the relative intensity of the signal produced in a region of interest in comparison to the commercial contrast. Although the nanocontrast has shown a signal intensity lower than the commercial one, it is important to note that it even has a target molecule for targeting which will allow greater sensitivity and specificity for early cancer diagnosis. Cell viability and mitochondrial activity in cell line MDA-MB-468, exhibited excellent biocompatibility and selectivity of the nanocontrast, as well as low cytotoxicity, which shows great potential for diagnostic applications.

Keywords: Cancer; Magnetic Resonance; Gold nanoparticles; Gadolinium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de carcinogênese.....	19
Figura 2: Tumor triplo negativo.....	21
Figura 3: Equipamento de Ressonância Magnética.....	25
Figura 4: Bobinas da Ressonância Magnética.....	25
Figura 5: Paciente em procedimento de ressonância da mama.....	26
Figura 6: Diluição seriada do Gd-DTPA.....	31
Figura 7: Modificação química do Gd-DTPA.....	32
Figura 8: Processo de diálise do Complexo Gd DTPA-Cisteamina.....	33
Figura 9: Processo de funcionalização do nanocontraste Au@Gd-EGF.....	34
Figura 10: Caracterização do Gadolínio. a) Espectro UV-Visível da diluição seriada (1:2). b) Relação entre a banda de absorção em 273 nm e as concentrações.....	37
Figura 11: Processo de purificação do complexo Gd-DTPA-Cisteamina por Diálise; a) Espectro UV-Visível b) FT-IR.....	38
Figura 12: Espectros de FT-IR a) Gd-DTPA, Cisteamina e Complexo Gd-DTPA-cisteamina; b) Mistura entre Gd-DTPA + Cisteamina e o Complexo Gd-DTPA-Cisteamina.....	40
Figura 13: Espectro UV-Visível das AuNPS e do nanocontraste Au@Gd-EGF.....	41
Figura 14: Diâmetro hidrodinâmico das partículas; a) AuNPs; b) Nanocontraste Au@Gd-EGF.....	42
Figura 15: Espectro de FT-IR do complexo Gd DTPA cisteamina, AuNPs e do nanocontraste Au@Gd-EGF.....	43
Figura 16: Desempenho do Au@Gd-EGF como agente de contraste na RM. a) Imagem; b) Intensidade relativa de sinal.....	44
Figura 17: Citotoxicidade do nanocontraste Au@Gd-EGF na linhagem celular MDA MB-468. a) Atividade Mitocondrial; b) Viabilidade Celular.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos funcionais do espectro do Complexo Gd-DTPA-Cisteamina.....	39
Tabela 2: Análise de Potencial Zeta.	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNPs	Nanopartículas de ouro
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTPA	Ácido dietilenotriamino pentacético
Gd	Gadólínio
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MTT	3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio
PBS	Tampão Fosfato Salino
Cis	Cisteamina
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
TN	Tripló Negativo
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
MMG	Mamografia
USG	Ultrassonografia
RM	Ressonância Magnética
UDLT	Unidade Ducto-Lobular Terminal
QSE	Quadrante Supero-Externo
DCIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
HER2	Fator de Crescimento Epidérmico 2
CK	Citoqueratina
BRCA	Gene, do inglês câncer de mama
ERBB	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
SE	Spin Echo
GRE	Gradiente Echo
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
α -LA	α - Ácido Lipoico
TR	Tempo de Repetição
TE	Tempo de Exposição
MTT	3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVO GERAL	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CÂNCER DE MAMA.....	18
2.1.1	Tripla Negativo	20
2.1.2	Receptor do Fator do Crescimento Epidérmico	21
2.1.3	Fator do Crescimento Epidérmico.....	22
2.2	Diagnóstico.....	22
2.2.1	Mamografia.....	23
2.2.2	Ultrassonografia	23
2.2.3	Ressonância Magnética.....	24
2.3	Gadólíio	26
2.4	Nanotecnologia	28
2.4.1	Nanopartículas de ouro para diagnóstico por imagem.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Preparação do Gadólíio.....	31
3.2	Modificação química carbodiimida do Gd-DTPA	31
3.3	Modificação química EGF- α -ácido lipóico	33
3.4	Síntese do nanocontraste Au@Gd-EGF	33
3.5	Espectroscopia UV – Visível.....	34
3.6	Espalhamento Dinâmico de Luz	35
3.7	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	35
3.8	Aquisição das imagens de RM.....	35
3.9.	Atividade mitocondrial e viabilidade celular.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Caracterização do Gd-DTPA	37
4.2	Complexo Gd-DTPA-Cisteamina	38
4.3	Caracterização do Nanocontraste Au@Gd-EGF	40
4.4	Ressonância Magnética	43
4.5	Citotoxicidade do nanocontraste Au@Gd-EGF	45
5	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS.....	47

ANEXO A: Trabalhos publicados em anais de congresso.	54
ANEXO B: Gold Nanoparticles Conjugated with EGF And Gadolinium-DTPA for Targeted Delivery of a Contrast Agent in MRI.....	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea vinculada a fatores ambientais, estilo de vida e mutações. Trata-se do tipo de câncer que mais acometem mulheres, sendo a segunda principal causa de morte. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima em 66.280 casos novos da doença para o triênio 2020-2022, por esta razão, o câncer de mama é considerado um problema de saúde pública (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020).

O carcinoma mamário exhibe diferentes vias de sinalização para a sobrevivência, crescimento, bem como resposta à terapia (PENAULT-LLORCA; RADOSEVIC-ROBIN, 2016). Deste modo, o câncer de mama é subdividido em seis subtipos, sendo referente à sua expressão molecular. O subtipo basalóide representa de 10 a 20% dos casos de carcinoma mamário, indicando uma tendência infiltrativa e disseminação para os linfonodos (DAI *et al.*, 2015). Este subtipo molecular também é conhecido como triplo negativo (TN) por apresentar a ausência da expressão de receptores de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), sendo estes os principais receptores para o câncer de mama (REY-VARGAS *et al.*, 2020). Além disso, este fenótipo apresenta relação com a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (STENEHJEM *et al.*, 2014). Assim, explicitando a associação com o pior prognóstico para o câncer de mama, visto que não respondem a hormônio terapias com drogas antiestrogênicas, tão pouco a imunoterapia com o anticorpo monoclonal anti-HER2 Trastuzumabe (IQBAL; IQBAL, 2014).

O prognóstico ruim do câncer de mama está relacionado à elevada taxa de proliferação celular. Neste cenário, vale reforçar o papel do receptor do fator de crescimento epidérmico, visto que é expressa em mais de 60% dos tumores do subtipo basalóides, sendo relacionada ao caráter mais agressivo, maior diferenciação celular e alto risco de metástases (CHONG; JÄNNE, 2013; MARINE; DAWSON; DAWSON; DAWSON, 2020). O EGFR é um receptor do tipo tirosina quinase, concernindo uma glicoproteína transmembranar composta por uma única cadeia polipeptídica, servindo de sinalização celular principalmente para proliferação celular, mas também está relacionada à ativação e sobrevivência celular (BURR *et al.*, 2019).

O diagnóstico do câncer de mama atualmente é realizado através de exames clínicos por meio das técnicas de Mamografia (MMG), Ultrassonografia (USG) e

Ressonância Magnética (RM), as quais apresentam baixa especificidade não superior a 30% (KLARENBACH *et al.*, 2018). Em RM esta problemática pode ser solucionada com o uso de substâncias paramagnéticas, conhecidas como os agentes de contraste. O Gadolínio (Gd) é a base dos agentes de contraste mais utilizados em RM, em sua forma Gd^{3+} possui um tempo de relaxamento eletrônico elevado por apresentar sete elétrons desemparelhados, este efeito faz com que seja amplamente utilizado nos diagnósticos por imagem (SHAHID, 2020). No entanto, a intensidade relativa dos sinais (brilho) destes agentes de contraste permanece muito baixa devido a sua biodistribuição uniforme no meio e pela rápida depuração por meio do sistema renal (LU *et al.*, 2020).

A nanotecnologia associada ao diagnóstico, destaca-se como uma opção promissora para detectar precisamente as células de câncer (AIOUB; EL-SAYED, 2016). Estudos mostraram o desenvolvimento e aplicação de nanopartículas de ouro (AuNPs) com diâmetro de aproximadamente 10 e 20 nanômetros como meio de contraste médico, sendo utilizadas no diagnóstico por imagem com alta especificidade. Uma grande vantagem das AuNPs em relação aos contrastes moleculares é o fato de reunir no mesmo objeto propriedades óticas e eletrônicas diferenciadas do material na forma de “bulk”, possibilitando o desenvolvimento de nanopartículas multifuncionais que podem ser detectadas por técnicas de diagnóstico por imagem com maior sensibilidade e resolução espacial (ALRIC *et al.*, 2008). Assim, a funcionalização das nanopartículas de ouro a moléculas biológicas, tais como peptídeos, proteínas, ou pequenas moléculas ligantes, serve como um agente facilitador no processo de absorção destes nanocontrastes (HOSEN *et al.*, 2019).

O direcionamento ativo das nanopartículas de ouro vem se tornando um conceito fundamental no diagnóstico precoce do câncer, o qual se baseia na utilização de ligantes periféricos que se ligam especificamente a biomoléculas expressas na superfície das células malignas, oferecendo uma melhor farmacocinética. O EGFR é um receptor propício para o direcionamento ativo, visto ser uma molécula biológica frequentemente superexpresso em tecidos malignos como o câncer de mama, câncer do ovário, câncer da próstata, câncer da bexiga, câncer colorretal, câncer do pulmão, câncer da cabeça e pescoço (ACHARYA; DILNAWAZ; SAHOO, 2009; GROBMYER *et al.*, 2011; NEAL *et al.*, 1990; PERALDO-NEIA *et al.*, 2011; ROGERS *et al.*, 2005; SHENG; LIU, 2011; SPANO *et al.*, 2005; VEALE *et al.*, 1989; ZHAN *et al.*, 2019).

Visando a necessidade de aprimorar as técnicas de diagnóstico por imagem do câncer de mama com melhor sensibilidade e especificidade, a presente dissertação propôs o desenvolvimento de um nanocontraste. Assim, as AuNPs transportadoras do agente de contraste a base de gadolínio com direcionamento ativo por meio da proteína do fator de crescimento epidérmico (EGF) foram utilizados como um método alternativo para a detecção precoce de câncer de mama por meio da RM.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um nanocontraste a base de gadolínio com direcionamento ativo, capaz de realizar um diagnóstico precoce de células tumorais por ressonância magnética.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as alterações espectrais da modificação química do complexo Gadolínio-Cisteamina por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).
- Sintetizar o nanocontraste e sua caracterização por Espectroscopia UV-Visível, FT-IR e Espalhamento Dinâmico de Luz.
- Avaliar a intensidade relativa do sinal do nanocontraste produzido por Ressonância Magnética.
- Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade do nanocontraste em células mamárias malignas da linhagem MDA-MB-468 pela atividade mitocondrial (MTT) e viabilidade celular (Azul de Tripán).

2 REVISÃO DE LITERATURA

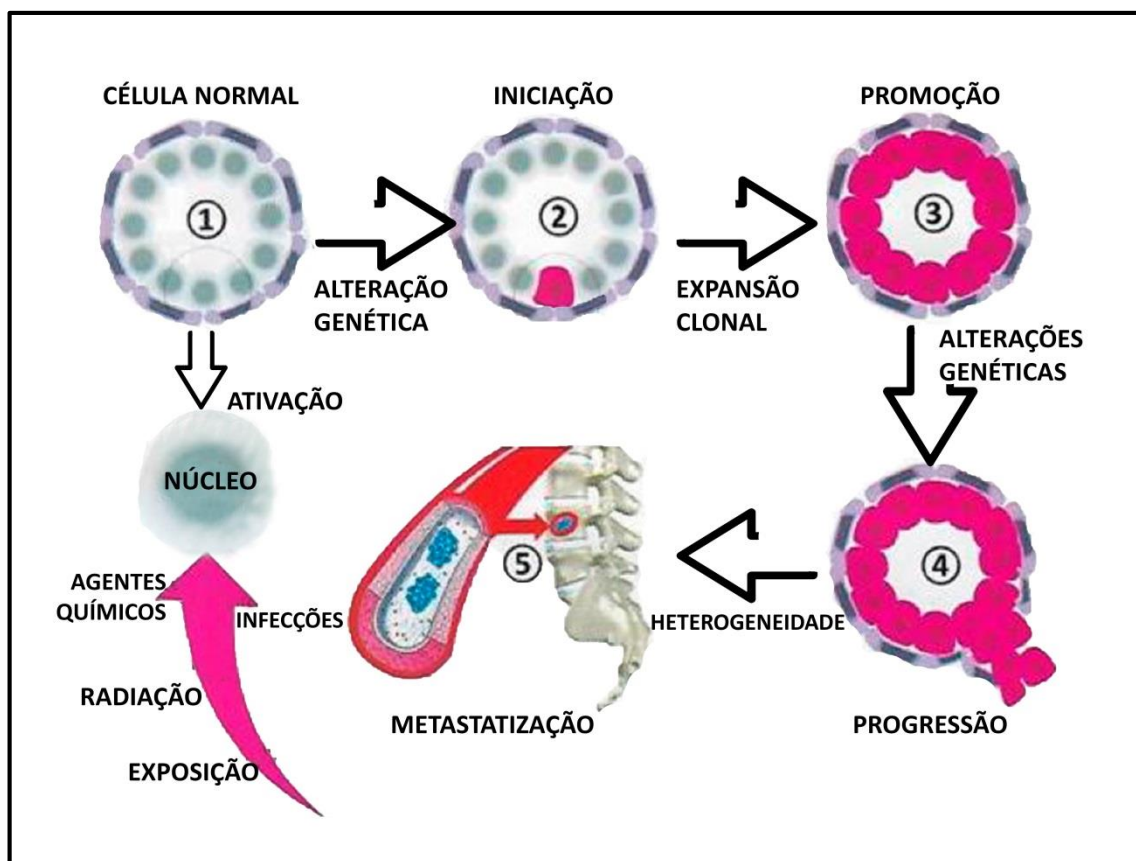
2.1 CÂNCER DE MAMA

Para o Brasil, estima-se que 66.280 casos novos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022 e esse valor correspondem a um risco estimado de 61,61 novos casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020). O câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa, na sua vigência são observadas mutações decorrentes da instabilidade genética, que gera uma população multiclonal de células que se reflete em manifestações clínicas, com a possibilidade de metastatizar e apresentar respostas aos receptores hormonais, como a progesterona e o estrogênio (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020; RUSSO; RUSSO, 2004).

A doença origina-se no complexo ducto-lobular terminal, sendo ductais os cânceres que se originam nos ductos e lobulares os que originam nos lóbulos. O ducto é formado por uma membrana basal, revestida internamente por células epiteliais e externamente por células mioepiteliais. A unidade básica anatômica e fisiológica da mama é a Unidade Ducto-Lobular Terminal (UDLT), que é responsável pela maioria do volume mamário que se localiza no quadrante supero-externo (QSE) da mama. A metade dos cânceres de mama ocorre nesta área (QSE) e a UDLT é sede do câncer ductal e lobular. A anatomia do ducto consiste em uma estrutura circular com células secretoras revestindo o ducto internamente (células luminais produtoras de leite) e externamente o ducto é envolvido por células mioepiteliais, responsáveis pela contração e ejeção do leite (RUSSO *et al.*, 1999).

O desenvolvimento do câncer de mama dar-se pela carcinogênese que consta das seguintes etapas: iniciação, promoção, progressão e metastatização. A iniciação envolve a alteração, mudança ou mutação de genes que surgem espontaneamente ou induzidos por exposição a um agente cancerígeno. Enquanto a promoção é o processo em que as células pré-neoplásicas proliferam ativamente e se acumulam, e a progressão é o estágio final da transformação neoplásica. Por fim, a metastatização ou metástase envolve a disseminação de células cancerosas do local primário para outras partes do corpo através da corrente sanguínea ou do sistema linfático (RUSSO; RUSSO, 2004). Na Figura 1, são ilustradas estas etapas.

Figura 1: Processo de carcinogênese.



Fonte: Urban, Chala e Mello (2019).

Com a incorporação de fatores biológicos na prática clínica ficaram evidentes para o mesmo estadiamento, as pacientes evoluem de formas diferentes na dependência da biologia tumoral. Assim, cada tumor da mama tem um estadiamento prognóstico e anatômico (LEE *et al.*, 2014). O estadiamento prognóstico do tumor é clínico e patológico e são analisados por: grau histológico do tumor (g): variando de 1 a 3; status do HER2: positivo (superexpresso) ou negativo (não superexpresso); status do receptor de progesterona (RP) positivo ou negativo; status do receptor de estrogênio (RE) positivo ou negativo.

Enquanto, o estadiamento anatômico do tumor é baseado no formato do tumor e no grau de invasão loco-regional, que inclui envolvimento da pele, mamilo e parede torácica. O tumor é medido em três dimensões ortogonais, a maior servindo para fins de estadiamento (LEE *et al.*, 2014). O estadiamento é dividido em: TIS (DCIS) carcinoma ductal *in situ*. O câncer lobular *in situ* é caracterizado como lesão benigna; T1 - Tumores com dimensões menores ou iguais a 2,0 cm; T2 - Tumor maior que 2,0 cm e menor ou igual a 5,0 cm; T3 - Tumor mede mais que 5,0 cm; T4 - Qualquer

tamanho em extensão para a parede torácica e pele (ZANETTI; RIBEIRO-SILVA, 2010; SOPIK; SUN; NAROD, 2018).

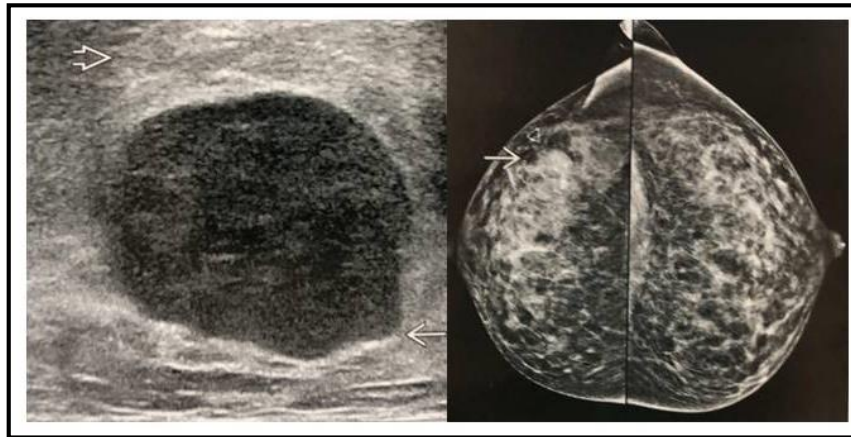
Existem mais de 100 tipos de cânceres de mama e podem ser classificados de acordo com a histologia nos seguintes tipos:

- Luminal A: Receptor dos hormônios femininos. Beneficia-se com tratamento por quimioterapia, radioterapia e tamoxifeno. O tamoxifeno induz uma menopausa química e este cresce lentamente. Ocorre em 50-60% dos casos.
- Luminal B: Ocorre em 10-20% dos casos (VAN STEENHOVEN, 2018).
- HER2: Definidos pela hiperexpressão do gene ERBB2, da família do fator de crescimento epidérmico. Tem alta taxa de crescimento tumoral e um curso muito agressivo. São tumores com grau histológico II ou III e da metástase para o cérebro e não tem expressão de receptores hormonais femininos. Beneficia-se com o medicamento Trastuzumabe (DI COSIMO *et al.*, 2018).
- Basaloide: Tumor de alto grau histológico corresponde a 10-20% dos casos. Apresenta alto grau histológico resultando em câncer ductal infiltrante. São tumores com ausência dos três receptores habituais do câncer de mama, trata-se de tumor triplo negativo (ZENG *et al.*, 2017).
- Normal-Like: Corresponde a 5-10% dos casos, com grau histologia II na maior parte das vezes. Apresenta ausência dos receptores (RE, RP e HER2) negativos para EGFR e CK5. Trata-se de tumor que ocorre em mulheres mais jovens e é o mais agressivo de todos (ZENG *et al.*, 2017).
- Claudin-Low: Corresponde a 12-14% dos casos, frequentemente invasivos. São tumores com diferenciação metaplásica e de mau prognóstico. Padrão imunohistoquímico TTN não basaloide (ZENG *et al.*, 2017; PLASILOVA *et al.*, 2016; DENT *et al.*, 2009).

2.1.1 Triplo Negativo

O tumor triplo-negativo (TN) é aquele desprovido da expressão do receptor de estrogênio, progesterona e receptor 2 (HER2). O câncer de mama do tipo basaloide tem forte expressão de citoqueratina de alto peso molecular (Exemplo: CK5/6, CK14 e CK17/EGFR) (ZENG *et al.*, 2017; PLASILOVA *et al.*, 2016; DENT *et al.*, 2009). Em 70 a 80%, classificado em grau nuclear 3 (80%), como observado na Figura 2.

Figura 2: Tumor triplo negativo.



Fonte: Zeng *et al.* (2017).

É caracterizado como uma massa redonda, ovalada ou lobulada com bordos indistintos, angulados, vista nos 3 métodos básicos do diagnóstico mamário por imagem MMG, USG e RM. O TN atinge de 15 a 20% dos carcinomas, proporcionando o comportamento clínico agressivo e mau prognóstico (ZENG *et al.*, 2017). O tumor apresenta grande volume e margens anguladas, 70 a 77% do tumor são do tipo basaloide e 80% do TN classifica-se no grau 3. O diagnóstico do TTN é difícil porque lesão assume aspecto benigno, no diagnóstico diferencial é definido como carcinoma mucinoso, carcinoma papilífero, sarcoma e metástases. Pode ocorrer junto com BRCA1, BRCA2. Enquanto, o diagnóstico radiológico é caracterizado por lesão nodular polilobulada com margens indistintas verificada no exame de MMG, USG e RM. O tratamento é realizado por quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgia e as metástases podem ser direcionadas para o pulmão, cérebro e fígado (ISMAIL-KHAN; BUI, 2010; ZENG *et al.*, 2017; PRASILOVA *et. al.*, 2016).

2.1.2 Receptor do Fator do Crescimento Epidérmico

Trata-se de uma glicoproteína do tipo tirosina-quinase, superexpressa em metade dos cânceres. É uma proteína transmembrana que participa da proliferação, diferenciação, mobilidade e de sobrevivência celulares. Esta glicoproteína faz parte da família dos receptores ERBB, sendo seus componentes: ERBB2, ERBB3, ERBB4. O mais conhecido deles é o HER2 (ERBB2) presente em subtipos do câncer de mama. O EGFR é derivado do oncogene presente no cromossomo 7p12 e apresenta quatro

domínios: extracelular, transmembranar, intracelular e c-terminal. Estudos indicam que EGFR é superexpresso em tumor TTN sugerindo que o EGFR poderia ser usado como biomarcador e alvo no câncer de mama (CARPENTER; COHEN, 1979).

2.1.3 Fator do Crescimento Epidérmico

O fator de crescimento epidérmico (EGF) regula a proliferação e diferenciação celular, ao se ligar com o receptor de EGF (EGFR) região extracelular, compreendendo os domínios de 1 a 4 com a resultante dimerização do receptor tirosinoquinase os domínios do EGFR I-III são dispostos numa configuração em C e o EGF é ancorado entre os domínios I e III. O complexo EGF EGFR dimeriza atrás de uma direta interação receptor - receptor na qual uma alça saliente de cada domínio abraça o corpo da outra. A única dimerização media por receptor é verificada pela mutação de EGFR (SIGISMUND; AVANZATO; LANZETTI, 2018). O EGF é o fator que foi primeiro isolado das glândulas submaxilares de um rato masculino, estimula a proliferação de um número de tecidos epiteliais tanto in vivo como in vitro. A EGF humana é uma cadeia única de polipeptídeo consistindo de 53 aminoácidos, com cerca de 6 kDa e tem como já foi dito tem a função de promover a proliferação e diferenciação de vários tecidos (KOVACS *et al.*, 2015).

2.2 Diagnóstico

O diagnóstico do câncer de mama é realizado da seguinte forma: autoexame da paciente; exame clínico palpatório do médico a partir de 20 anos; exame mamográfico em pacientes a partir de 40 anos ou abaixo desta idade com histórico familiar; exame ultrassonográfico complementando o exame mamográfico realizado a qualquer tempo geralmente a partir de 20 anos; exame de Ressonância Magnética realizado sempre seguindo ao estudo Mamográfico/Ultrassonográfico. É utilizado como estadiamento pré-operatório e também é padrão ouro para avaliação do implante mamário. As lesões mamárias detectadas pelas técnicas de diagnóstico citadas são classificadas, assim estabelecendo o tratamento e prognóstico (SPAK *et al.*, 2017).

2.2.1 Mamografia

O exame mamográfico pode ser de dois tipos: diagnóstico e rastreamento. Na mamografia diagnóstica, a mama é estudada em função dos sintomas e da presença de anormalidades clínicas como nódulos, áreas palpáveis, secreção sanguinolentas ou linfonodos palpáveis. Entretanto, a mamografia de rastreamento estuda a mama aparentemente normal de mulheres assintomáticas e o exame tem a realização periódica geralmente a partir dos 40 anos (CARDENOSA, 2011).

A doença é rara antes dos 25 anos e tem seu pico de incidência entre 55 e 60 anos. O uso apropriado da mamografia reduz a mortalidade devido ao câncer de mama entre 30 e 50%. O exame padrão da mama consta de 4 radiografias: 2 crânio cauda e 2 médio lateral oblíquo, outras incidências podem ser necessárias: Lateral 90°, compressão focal, magnificação, rolada, tangencial. Recentemente, foi introduzido a tomosíntese (do inglês, Digital Breast Tomo Synthesis - DBT) que é um exame adicional em 3D, que consiste em radiografar a mama em cerca de 50 fatias com espessura de 1 mm, proporcionando maior sensibilidade diagnóstica. O exame deve ser lido pelo radiologista com experiência de pelo menos três meses em diagnóstico mamário (IKEDA; MIYAKE, 2016).

2.2.2 Ultrassonografia

O diagnóstico ultrassonográfico consiste na utilização de um transdutor piezelétrico para criar uma série de pulsos curtos de feixes sonoros entre 12 e 18 MHz. O transdutor é colocado na mama com auxílio de um gel condutor e durante o exame ocorre a emissão e recebimento de pulsos para formar a imagem (BERG *et al.*, 2012a).

O ultrassom mamário é um procedimento imagiológico complementar à mamografia. Atualmente, praticamente todo exame mamográfico é complementado com ultrassonografia de alta resolução. Toda vez que o parênquima mamário é denso, é indicado à ultrassonografia. Estatisticamente, se obtém 2,8 cânceres por mil mulheres ultrassonografadas, enquanto que pela mamografia esse é de aproximadamente número 3 a 4 cânceres por mil mulheres radiografadas (BERG *et al.*, 2012b) O ultrassom é indicado para: exame de eleição para avaliação de nódulo palpável em mulheres abaixo de 30 anos, em grávidas e lactantes; método auxiliar e

complementar para investigar um achado clínico ou mamográfico; avaliação da extensão de uma lesão maligna, incluindo a axila; distinção entre lesões císticas e sólidas e na categorização de malignidade; pesquisa de adenocarcinoma primário desconhecido; avaliação de fluxo papilar serossanguinolento espontâneo; avaliação da integridade de implante mamário; orientação de procedimentos intervencionistas em tempo real (D'ORSI *et al.*, 2003).

2.2.3 Ressonância Magnética

A RM com a utilização do contraste paramagnético possibilita diferenciar os tipos de tecidos e permite o estudo minucioso da mama e das axilas. Esta tecnologia presta-se para o diagnóstico inicial do câncer em pacientes com alto risco de desenvolver a doença (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018). A RM mamária é indicada para análise de um tumor maligno conhecido, triagem de pacientes com alto risco, avaliação da resposta tumoral à quimioterapia neoadjuvante, avaliação de achado mamográfico ou ultrassonográfico duvidoso e para avaliação da mama com implante (BAZZOCCHI *et al.*, 2006).

A Ressonância Magnética é um método de diagnóstico de alta sensibilidade e baixa especificidade. Como a mamografia, a imagem característica de lesão maligna é um nódulo que apresenta forma irregular, não circunscrita, espiculada com realce periférico e heterogêneo. Outra forma de se apresentar a doença maligna na RM é através de um realce não nodular. Tipos de realce: focal, linear, segmentar, regional, múltiplas regiões e difuso. Outra forma de avaliar o comportamento de um nódulo é através da análise cinética (tempo x densidade) (LIBERMAN *et al.*, 2003).

A RM foi desenvolvida nos anos 40 por Paul Felix e Edward Purcell, porém só entrou em funcionamento a partir do final dos anos 80. Trata-se de um equipamento que funciona envolvendo campos magnéticos, elétricos e física quântica. A formação da imagem neste equipamento é baseada na densidade de prótons de hidrogênio e realiza excelentes exames das partes moles, articulações e neuroeixo (KUHL *et al.*, 2007).

A física da RM é complexa e extensa, consiste em duas sequências básicas spin echo (SE) e gradiente echo (GRE), todas as demais derivam destas, como a T1, T2, DP, FLAIR, STIR, TR, TE e TI. O equipamento de RM é composto por uma mesa e um túnel denominado gantry, e o revestimento interno do gantry correspondem a uma

bobina. O exame é realizado com a região de interesse colocado dentro do túnel, como mostrado na Figura 3 (D'ORSI et al., 2003).

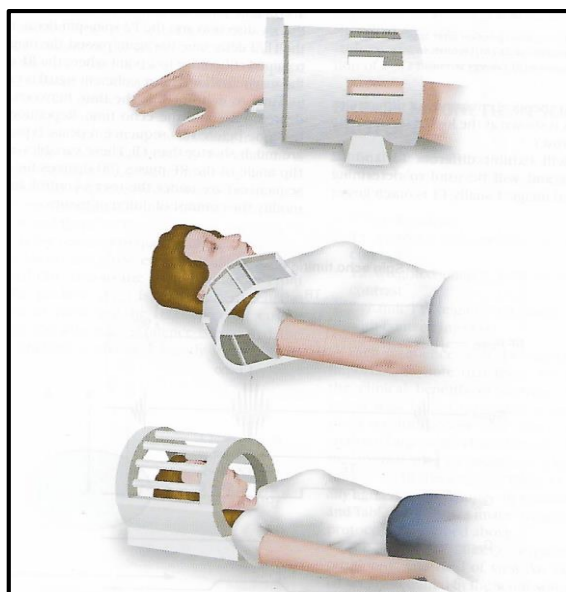
Figura 3: Equipamento de Ressonância Magnética.



Fonte: TESLA (2020).

As diferentes partes do corpo a serem examinadas ficam conectadas a diferentes tipos de bobinas, estas captam o sinal de radio frequência da mesa de comando e do paciente e reenvia para o monitor para formar a imagem (KUHL *et al.*, 2007). Na Figura 4, são ilustrados os tipos de bobinas utilizadas para o exame.

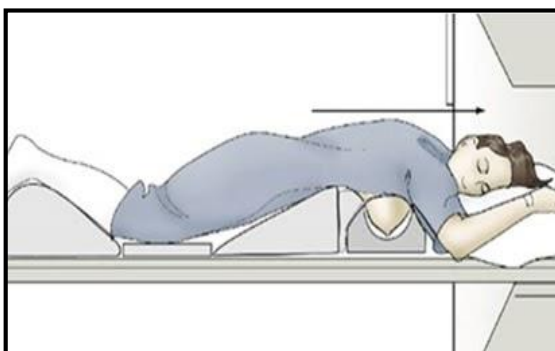
Figura 4: Bobinas da Ressonância Magnética.



Fonte: Kuhl *et al.* (2007).

O exame de ressonância da mama é um procedimento moderno que demora em torno de 30 minutos e utiliza-se geralmente equipamento de 1.5 a 3.0 Tesla. As instruções são dadas à paciente para que a mesma permaneça imóvel durante todo o exame. A paciente é convidada a se deitar na mesa de exames em decúbito ventral com as mamas apoiadas em um par de bobinas. Quando a paciente se deita na mesa de procedimento a veia antecubital já está puncionada e é usado uma bomba de infusão com o meio de contraste gadolínio durante os 5 primeiros minutos do exame (KUHL *et al.*, 2007). Na Figura 5, é ilustrado o posicionamento da paciente para o exame.

Figura 5: Paciente em procedimento de ressonância da mama.



Fonte: Andreato (2017).

A neoangiogênese que corresponde a microvascularização tortuosa e porosa forma-se na intimidade do tumor. Os microvasos da angiogênese são tortuosos e apresentam paredes porosas. Ao aplicar o meio de contraste gadolínio no tumor por via vascular, nota-se o encurtamento tanto em T1 quanto T2. Portanto, o T1 dos tecidos aparecerá mais branco no exame (HAMILTON *et al.*, 2011)

2.3 Gadolínio

O gadolínio (Gd) é um elemento químico, terra rara, tóxico, que precisa ser quelado para uso intravascular. Os quelantes mais utilizados são os complexos poliaminocarboxílicos lineares ou macrocíclicos. Estes apresentam osmolalidade e viscosidade compatível ao sangue. O uso deste tipo de contraste pode resultar numa chamada fibrose sistêmica nefrogênica para pacientes com histórico de problemas renais (SANTOS, 2013).

Os meios de contraste utilizados em ressonância magnética (RM) são à base de quelatos do íon paramagnético gadolínio (Gd), este elemento químico é considerado de terra rara e em temperatura ambiente apresenta propriedades ferromagnéticas. A sua aplicação na medicina diagnóstica é datada desde o fim dos anos 80, com o objetivo de realçar as áreas de estudo e assim concluir uma hipótese diagnóstica (DE HAËN, 2001; SINHA *et al.*, 2017).

O Gd^{3+} é um metal paramagnético com sete elétrons desemparelhados, o que contribuiu para um alto momento magnético, e seu estado fundamental fornecem tempos de relaxamento de elétrons relativamente longos. Essas características tornam o íon gadolínio um componente favorável para a ressonância magnética, além de realizar ligações íon-dipolo, aumento a taxa de relaxamento com o solvente, ou seja, água ou outra unidade quelante. Devido a sua natureza, o raio iônico do Gd^{3+} é próximo ao raio iônico do Ca^{2+} , desta maneira o organismo ficaria sujeito as ligações errôneas entre os canais de Ca^{2+} com o íon Gd^{3+} além de outros mecanismos que precisam do cálcio iônico. Os contrastes de gadolínio à base de quelatos derivam-se do óxido de gadolínio, no entanto a administração sistêmica do Gd^{3+} requer que este metal pesado seja ligado a um quelato para reduzir sua toxicidade permitindo sua excreção. Esse quelato circunda o íon gadolínio, podendo ser divididos em duas categorias: extracelular inespecífico e intracelular específico, do qual a principal diferença é o quelato associado (CAO *et al.*, 2017; NI *et al.*, 2017). O ácido 1,4,7,10-tetraaza ciclododecano-1,4,7,10-tetracético (DOTA), 10-(2-Hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetato) (HP-DO3A) e o DTPA-BMA são alguns quelatos utilizados com o Gd^{3+} , no entanto o quelato mais utilizado é o ácido dietil triamino pentacético (DTPA), que se liga a oito dos nove locais de ligação do íon do Gd, facilitando a ligação de moléculas de água para que o mesmo possa ser filtrado e excretado pelo sistema urinário. A quelação do gadolínio possibilita aumento de até 500 vezes na taxa de excreção renal do composto, alterando a farmacocinética, acelerando sua depuração e, portanto, reduzindo acentuadamente a sua toxicidade (KNOPP *et al.*, 2003, ELIAS JUNIOR *et al.*, 2008; GOMES, CARNEIRO, 2019). Porém, para pacientes com insuficiência renal aguda ou crônica, o uso do contraste é vetado para que não haja risco de intoxicação devido a sua não eliminação. O uso do contraste em RM via intravenosa varia entre 10 mL e 20 mL, dependendo do porte físico do paciente, se comparado com a quantidade dos contrastes iodados da tomografia computadorizada, é aproximadamente 5 a 15 volumes menor, desta

maneira o seu uso é menos prejudicial a saúde em quesitos de volume (CARAVAN, 2006; DE ABREU PAULINO, 2018).

Clinicamente, a RM aprimorada com Gd-DTPA (ácido gadopentético) pode ser usada em conjunto com a mamografia de raios-X, para rastrear mulheres que estão em alto risco de desenvolver câncer de mama. Além disso, pode ser utilizado para delinear a vasculatura e a extensão do tumor. (ALHAMAMI *et al.*, 2018). Em segundo lugar, destaca a discriminação precisa dos limites da lesão e o uso de imagens de RM aprimoradas com Gd-DTPA torna estável a segmentação e o estudo detalhado da lesão maligna para o diagnóstico (CHEN *et al.*, 2019).

O principal objetivo dos meios de contraste à base de Gd é diminuir o tempo de relaxamento em T1 e em T2, a fim de aumentar a diferença entre tecidos adjacentes ou evidenciar anormalidades, como o caso de tumores, áreas com infecção, infarto ou lesões pós-traumáticas (CORR; RAKOVICH; GUN'KO, 2008).

O tempo de relaxamento T1, também conhecido como tempo de relaxamento longitudinal, representa o tempo necessário para que o vetor de magnetização na direção do campo magnético seja restaurado em 63% após ter sido exposto a um pulso de 90°. Além disso, em consequência da presença de moléculas consideradas grandes, como proteínas e o próprio contraste, para padronização dos valores, os tempos mais curtos são aqueles obtidos para a água pura, de modo que o T1 também varia de acordo com o valor da intensidade do campo magnético. O tempo de relaxamento T2 representa o tempo necessário para que o vetor de magnetização no plano transversal ao campo magnético diminua em 37% da magnetização inicial. O T1 é usado para aumentar a intensidade do sinal de modo a dar um realce positivo ao contraste, enquanto que o T2 diminui a intensidade do sinal, resultando em um realce negativo do contraste (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; WESTBROOK; ROTH; TALBOT, 2000;).

2.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que integra conhecimentos de Engenharia associados à Química, Biologia e Física. Nos últimos anos, um grande número de produtos de consumo começou a conter nanomateriais na sua composição e neste contexto, esta ciência vem proporcionando avanços promissores em áreas tão diversas como Eletrônica, Medicina e Saúde, Biotecnologia, indústria alimentar e

entre outras (HUANG; NOTTEN; RASTER, 2011). Em 1959, o físico norte-americano Richard Feynman introduziu o conceito de nanotecnologia. Já em 1974, o professor Norio Taniguchi descreve as tecnologias que permitem a construção de matérias à escala nanométrica. Para um material ser considerado numa escala nanométrica deve ter pelo menos uma das dimensões externas com o tamanho igual ou inferior a 100 nanômetros (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

O nanomaterial mostra-se interessante para o uso em diagnóstico de doenças, em virtude do direcionamento ativo ancorado a biomoléculas, aumentando assim a seletividade e sensibilidade (AIOUB; EL-SAYED, 2016). Além disso, as nanopartículas apresentam propriedades químicas e físicas que oferecem novas possibilidades (JU *et al.*, 2019). Recentemente, nanopartículas metálicas, como as de ouro, vem sendo testadas como agentes de contraste em imagem de RM por apresentarem melhor contraste, além da segurança no seu uso (HOSSSEN *et al.*, 2019).

2.4.1 Nanopartículas de ouro para diagnóstico por imagem

As características intrínsecas únicas das nanopartículas são fundamentais para as principais aplicações biomédicas. Destaque-se as propriedades ópticas, eletrônico e qualidades distintivas físico-químicas que fornecem uma situação apropriada para síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs), levando a aplicações de detecção, imagem e terapêuticas biomédicas (IZZI *et al.*, 2020). A aplicabilidade das AuNPs está relacionada à sua morfologia, sendo associada à óptica, ou seja, alterar o tamanho afeta a cor das nanopartículas, no qual, este traço utiliza os fundamentos para as formas de detecção colorimétrica (YANG *et al.*, 2017).

A aquisição de diagnóstico por imagem usando agente de contraste para ressonância magnética, tomográfica computadorizada, raio-X, demonstra-se ser uma área em ascensão da nanotecnologia para aplicação biomédica. Os nanocristais revestidos com quelatos de Gd (III) apresenta vantagem, como um núcleo rígido que minimiza graus internos de liberdade, bem como a alta densidade de elétrons, elemento primordial para o campo de diagnóstico por imagem (LI *et al.*, 2017). Com relação à RM, é concebível que o núcleo metálico da nanopartícula revestida com gadolínio, podendo contribuir para a relaxividade, além de favorecer o mecanismo do elétron spin dos íons Gd (III) (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018).

Sabe-se que as nanopartículas podem ser absorvidas por tecidos malignos. Entretanto, alinhando o direcionamento ativo para obter o diagnóstico por imagem de uma lesão tumoral, torna em destaque este processo, o qual pode melhorar a detecção da célula alvo a fim do diagnóstico.

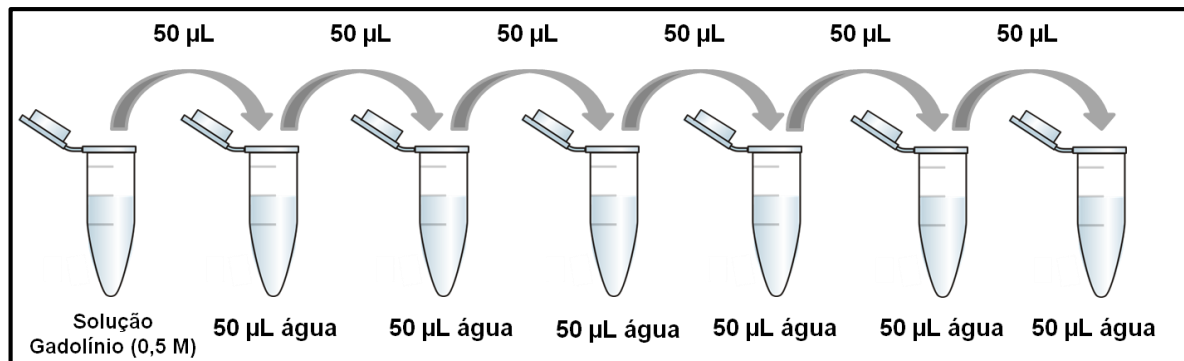
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bionanotecnologia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). A modificação do agente de contraste foi realizada via química carbodiimida, sendo produzido o nanocontraste Au@Gd-EGF e sua eficiência avaliada de intensidade relativa de sinal.

3.1 Preparação do Gadolínio

O agente de contraste Gadolínio (Gd) com o ligante ácido dietil triamino pentacético (DTPA) (Gd-DTPA, Sigma Aldrich) foram previamente diluídos em água ultrapura para uma concentração final de 0,5 M. A partir desta concentração uma diluição seriada foi realizada na proporção de 1:2 (como mostrada na Figura 6). Posteriormente, as amostras foram caracterizadas pela Espectroscopia UV-Visível.

Figura 6: Diluição seriada do Gd-DTPA.

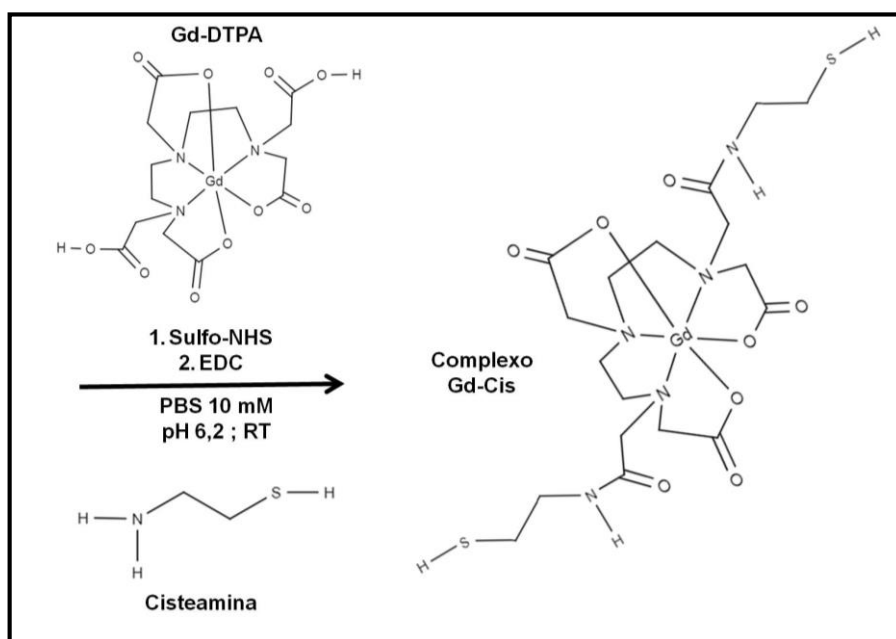


Fonte: O autor.

3.2 Modificação química carbodiimida do Gd-DTPA

A química carbodiimida foi utilizada para a modificação do Gd-DTPA o qual apresenta dois grupos carboxílicos que foram ativados por meio da adição do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para a formação do complexo Gd-DTPA-Cisteamina, como ilustrado na Figura 7.

Figura 7: Modificação química do Gd-DTPA.



Fonte: O autor.

A formação do complexo Gd-DTPA-Cisteamina foi realizado utilizando a razão molar de 1 Gd-DTPA (14 mM) : 25 Sulfo-NHS : 10 EDC : 6 Cisteamina (9 mM). Primeiramente, os reagentes EDC (Sigma Aldrich) e sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide, Thermo Scientific) foram previamente solubilizados em solução Tampão Fosfato Salino (PBS) a 10 mM e o agente de contraste Gd-DTPA foi diluído em água ultrapura. A reação via carbodiimida se iniciou pela adição de 192 μ L de Gd-DTPA em um frasco âmbar, seguido da adição de 600 μ L de EDC e 660 μ L de sulfo-NHS. A solução durante 30 minutos foi homogeneizada por baixa agitação e após este período foi adicionada 1920 μ L de Cisteamina. A fim de aumentar a eficiência da ativação foi realizado o aumento do pH da solução adicionando 100 μ L de hidróxido de sódio (NaOH, 0,1 M) e a mesma foi novamente levada a agitação por 2 horas para a formação do complexo. Após este período, foi adicionado 500 μ L de NaOH para o aumento do pH para >9,0 com intuito de reduzir a reatividade de reagentes em excesso e a solução agitada por mais 30 minutos.

Em virtude da produção de subprodutos para a formação do complexo Gd-DTPA-Cisteamina, a amostra foi purificada por meio do processo de diálise, utilizando uma membrana com porosidade 0,5 kDa (Repligen 131090T) como mostrado na Figura 8. Após a purificação, o complexo foi quantificado e caracterizado

pela Espectroscopia UV-Visível e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.

Figura 8: Processo de diálise do Complexo Gd DTPA-Cisteamina.



Fonte: O autor.

3.3 Modificação química EGF- α -ácido lipóico

A síntese do complexo EGF- α -ácido lipóico foi baseada na metodologia descrita por Lucas e colaboradores (2015), a qual a ligação entre a EGF e o ácido lipóico é dada pela reação química carbodiimida (LUCAS *et al.*, 2015). Em resumo, o grupo carboxílico presente no α -ácido lipóico foi ativado pelo EDC para a formação da ligação amida com grupos aminos presente na proteína EGF. A razão molar dos reagentes utilizados foi de 120 α -LA (7,8 mM) : 3200 Sulfo-NHS (187,5 mM) : 1300 EDC (83,5 mM) : 1 EGF (16 μ M) e a caracterização do complexo foi confirmada por FT-IR, conforme descrito por Castilho, Hewitt e Raniero (2017).

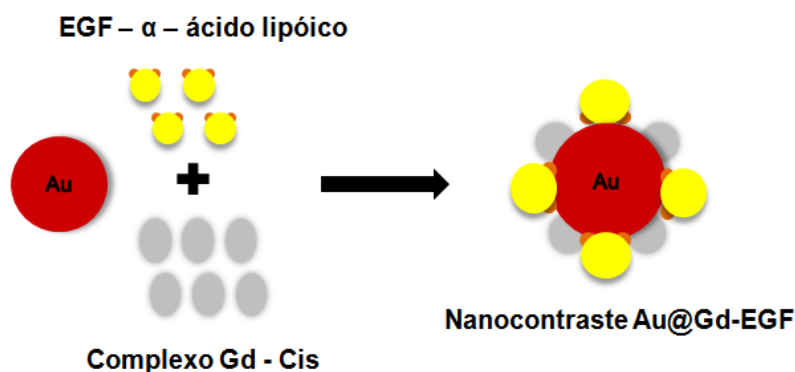
3.4 Síntese do nanocontraste Au@Gd-EGF

A síntese do nanocontraste utilizou nanopartículas de ouro (AuNPs) com diâmetro médio de aproximadamente 24 nm, as quais foram produzidas com base na metodologia descrita por Lee e Meisel (1982). Na síntese o cloreto de ouro (III) trihidratado é reduzido e estabilizado pelo citrato de sódio em aproximadamente 100°C

sob agitação constante por 1h para a formação da solução coloidal. Subsequente, as AuNPs foram funcionalizadas com os complexos EGF- α -ácido lipóico e Gd-DTPA-Cisteamina com o recobrimento de área na proporção de 1:1, baseando-se no procedimento descrito por Castilho, Hewitt e Raniero (2017). No cálculo para o recobrimento total área superficial das AuNPs foi utilizado o diâmetro médio das nanopartículas e os dados teóricos dos tamanhos da EGF e do Gd-DTPA.

Determinado o número de moléculas para o recobrimento das AuNPs, se iniciou o processo de funcionalização (Figura 9), em que um volume de 5 mL de nanopartículas ($3,53 \times 10^{12}$ AuNPs/mL) foi incubada ao complexo EGF- α -LA e mantido em agitação constante por 24 horas. Após este período foi adicionado o complexo Gd-DTPA-Cisteamina a $2,36 \times 10^{-5}$ M e incubados por mais 24 horas sob agitação constante. Decorrido as 48 horas de funcionalização o nanocontraste Au@Gd-EGF foi purificado por centrifugação, e depois quantificado e caracterizado pela Espectroscopia UV-visível, Espalhamento Dinâmico da Luz e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.

Figura 9: Processo de funcionalização do nanocontraste Au@Gd-EGF.



Fonte: O autor.

3.5 Espectroscopia UV – Visível

As análises de espectroscopia UV-Visível foram realizadas por meio do Espectrofotômetro DeNovix DS-11, utilizando um volume de 2 μ L depositados no pedestal do equipamento sendo analisada na região de 190-840 nm. Os dados adquiridos foram plotados no programa OriginPro versão 8.5.1.

3.6 Espalhamento Dinâmico de Luz

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi utilizada a fim de determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas, o índice de polidispersão e o Potencial Zeta. Utilizando o equipamento ZetaSizer nano – ZS90 da Malvern, no modo “Size”, um volume de 200 μL da solução foi adicionado a uma cubeta de poliestireno (Modelo ZEN0118) para a caracterização do tamanho da solução. O resultado do diâmetro hidrodinâmico foi obtido por meio de uma média de três análises da amostra, a qual foi plotada no programa OriginPro versão 8.5.1.

A análise de Potencial Zeta foi realizada utilizando o mesmo equipamento no modo “Zeta”, em que um volume de 1 mL foi analisado em uma cubeta capilar com eletrodo (modelo DTS1070, Malvern) para determinação da estabilidade química da amostra visto que o Potencial Zeta é o potencial elétrico gerado entre a superfície da partícula e o meio líquido, designando a estabilidade elétrica da solução. O resultado da diferença de potencial foi obtido por uma média de três análises da solução.

3.7 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

As análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) foram realizadas no Espectrofotômetro FT-IR Spectrum 400 (Perkin-Elmer) da Central Analítica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP. Primeiramente, as amostras foram depositadas em janelas de Fluoreto de Cálcio (CaF_2) e liofilizadas à vácuo por aproximadamente 30 minutos. O background foi realizado por meio de 64 varreduras na janela de CaF_2 sem a presença de qualquer substância e os parâmetros utilizados para a aquisição dos espectros foram de 32 varreduras com intervalo de 4000 a 900 cm^{-1} e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

3.8 Aquisição das imagens de RM

As imagens do nanocontraste Au@Gd-EGF e do contraste comercial Optimark (Guerbet) foram adquiridas com aparelho de ressonância magnética (RM) Sigma HDXT de 1.5 T (GE), do Centro de Diagnóstico Por Imagem – Tomovale, utilizando uma bobina de crânio com sequência de pulso fast spin eco em T1 e saturação de

gordura, TR = 417 e TE = 12, matriz 256 x 256 pixels, espessura de corte 3 mm e FOV = 21. A análise da intensidade do sinal emitido foi realizada utilizando a região de interesse (do inglês, *region of interest* – ROI) em formato circular com diâmetro de aproximadamente 6 mm.

3.9 Atividade mitocondrial e viabilidade celular

A citotoxicidade do nanocontraste Au@Gd-EGF foi avaliada pela atividade mitocondrial por meio do ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio, Sigma Aldrich) e pela viabilidade celular, o qual é determinado pelo método de exclusão utilizando o corante Azul de Tripán (3,3'-(3,3'-dimetil[1,1'-bifenil] -4,4'-diyl) bis(azo)) bis [5-amino-4-hidroxynaphthaleno-2,7disulfonato, Sigma Aldrich), testados na linhagem celular de carcinoma mamário humano MDA-MB-468 (células provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro).

No ensaio colorimétrico MTT, o nanocontraste Au@Gd-EGF foi aplicado nas concentrações de 0,1 mg/mL; 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL em 1×10^5 células/poço por 24 horas. Após este período 50 μ L da solução de MTT (2 mg/mL) foi adicionado nos poços da placa de cultura contendo 150 μ L do meio de cultura completo. A placa foi incubada por 4 horas a 37°C para a formação dos cristais de formazan, que posteriormente foram solubilizados em 150 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO, Dinâmica). A leitura da absorção foi realizada no Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (UNIVAP).

No método de exclusão utilizaram-se as mesmas concentrações do nanocontraste Au@Gd-EGF em 1×10^5 células/poço por 24 horas. O corante Azul de Tripán foi adicionado nos poços após este período de incubação utilizando um volume de 40 μ L. Os poços corados foram lavados com PBS e a aquisição das imagens das células foram tiradas utilizando o programa Future WinJoe versão 1.0.7.9 por meio do microscópio invertido NIB-100 (Bel Equipamentos Analíticos). A contagem celular foi realizada utilizando o software ImageJ para a determinação da viabilidade celular.

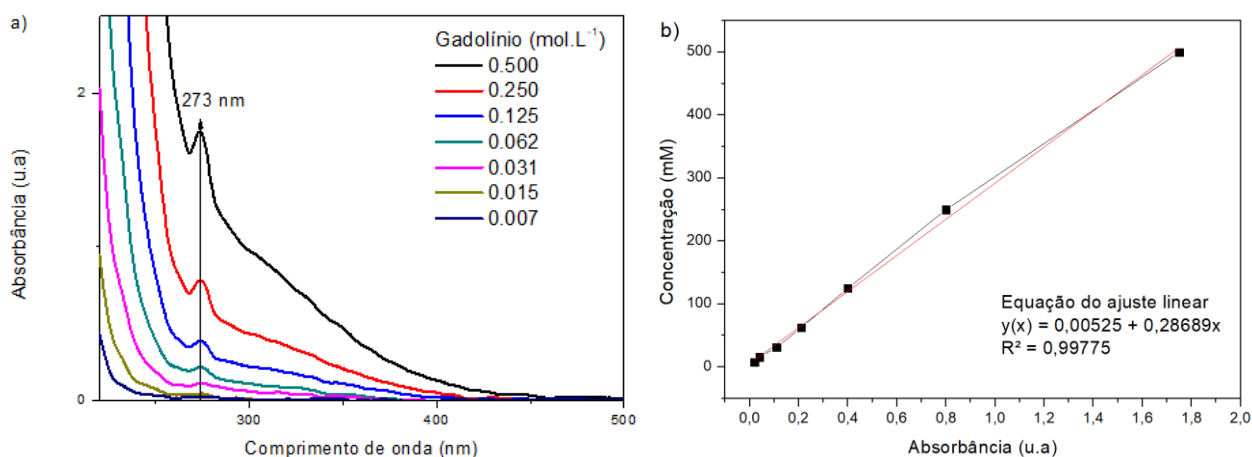
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são abordados os resultados obtidos neste estudo, desde a caracterização do Gadolínio, como também do complexo Gd-DTPA-Cisteamina e do nanocontraste Au@Gd-EGF desenvolvidos. A determinação da intensidade relativa do sinal do nanocontraste na ressonância magnética e a avaliação da citotoxicidade foram avaliadas para futuras aplicações *in vivo*.

4.1 Caracterização do Gd-DTPA

A Espectroscopia UV-Visível foi utilizada para caracterizar e analisar a integridade do Gd-DTPA, observando uma banda de absorção característica deste composto em aproximadamente 273 nm, como mostrado na Figura 10a. Moutiez e colaboradores (1997) demonstram a absorção do Gd na região de 274 nm e Chellquist e Searle (1993) também encontram um espectro característico do Gd com absorção em 272 nm, corroborando com o espectro coletado, uma vez que o DTPA não apresenta absorção nesta região (MOUTIEZ *et al.* 1997; CHELLQUIST; SEARLE, 1993). A diluição seriada do Gadolínio possibilitou determinar uma equação pelo ajuste linear dos pontos experimentais obtidos por meio da relação diretamente proporcional entre a banda absorção e a concentração (Figura 10b), a qual foi utilizada para determinar a concentração de Gadolínio na área superficial do nanocontraste para as aplicações biológicas.

Figura 10: Caracterização do Gadolínio. a) Espectro UV-Visível da diluição seriada (1:2). b) Relação entre a banda de absorção em 273 nm e as concentrações.

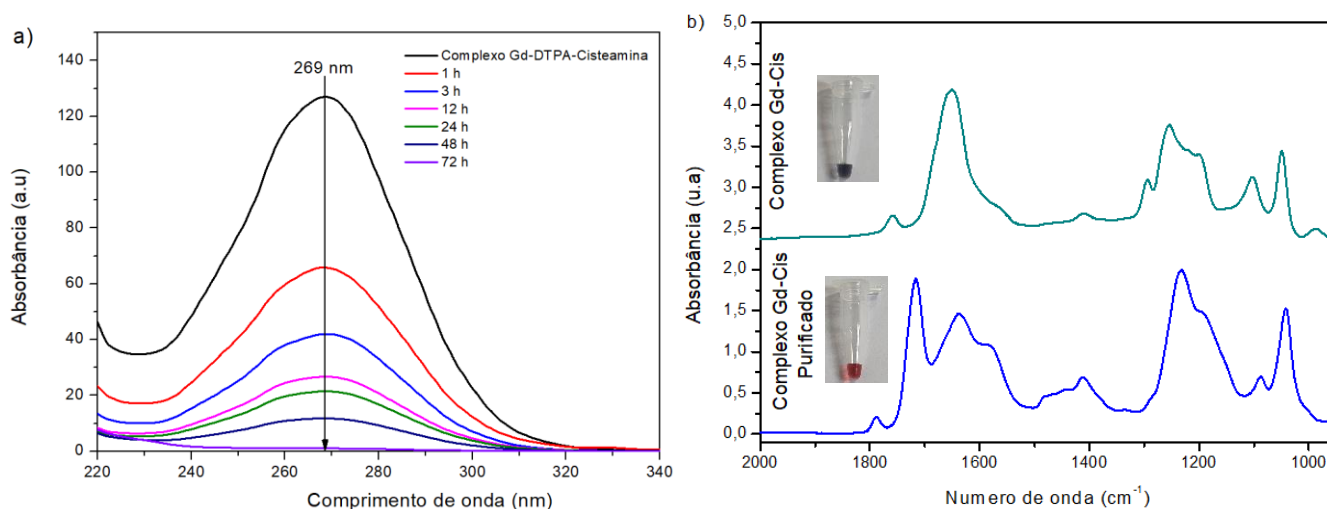


Fonte: O autor.

4.2 Complexo Gd-DTPA-Cisteamina

A modificação química via carbodiimida foi utilizada para a produção do complexo Gd-DTPA-Cisteamina, no qual se faz necessário a purificação do mesmo para a remoção dos subprodutos de reação por meio do método de diálise. Na Figura 11a, são mostrados os espectros UV-Visível durante a realização da diálise, em que se observa a redução da banda de absorção em 269 nm correspondente aos subprodutos da reação. As análises de FT-IR exibem diferenças espectrais entre o complexo produzido e o complexo purificado (Figura 11b), em que os subprodutos de reação mascaram as reais bandas características da formação do complexo Gd-DTPA-Cisteamina purificado, corroborando com as análises de espectroscopia UV-Visível. Além disso, este processo de purificação pelo método de diálise se faz necessário para garantir a funcionalização do complexo com as AuNPs, uma vez que na presença dos subprodutos de reação as nanopartículas se aglomeram (tubo com coloração azul) impedindo a formação do nanocontraste. No entanto, após a purificação a coloração da nanopartícula se mantém estável (tubo com coloração avermelhada), como mostrado na Figura 11b.

Figura 11: Processo de purificação do complexo Gd-DTPA-Cisteamina por Diálise; a) Espectro UV-Visível b) FT-IR.



Fonte: O autor.

Na Figura 12 são mostrados os espectros de FT-IR do complexo Gd-DTPA-Cisteamina e seus derivados, o Gd-DTPA e a Cisteamina. O espectro característico do complexo purificado basicamente é composto pela sobreposição das bandas de

absorção do gadolínio e a cisteamina (Figura 12a), entretanto quando comparado com a mistura (Gadolínio + Cisteamina) é observado a formação da ligação amida, identificada pela presença dos modos vibracionais das bandas em 930 cm^{-1} , 1042 cm^{-1} , 1232 cm^{-1} , 1588 cm^{-1} , 1716 cm^{-1} , atribuídos na Tabela 1, confirmando efetivamente a modificação química do Gd-DTPA (Figura 12b).

Tabela 1: Grupos funcionais do espectro do Complexo Gd-DTPA-Cisteamina.

Número de onda (cm^{-1})	Modo Vibracional
1716	$\delta(\text{C}=\text{O})$
1588	$\nu(\text{C}-\text{N})$
1232	$\nu(\text{C}-\text{N})$
1042	$\nu(\text{C}-\text{N})$
930	$\delta(\text{COOH})$

Fonte: O autor.

As vibrações de flexão de ácido carboxílico são encontradas em regiões $<1000\text{ cm}^{-1}$, desta forma é possível perceber que no espectro da mistura entre o Gd-DTPA+Cisteamina temos a presença dos grupos funcionais de ácidos carboxílicos provenientes do gadolínio a 930 cm^{-1} . Esse modo vibracional é perdido após a formação de uma ligação amida, que ocorre na reação de modificação do complexo Gd-DTPA-Cisteamina (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017).

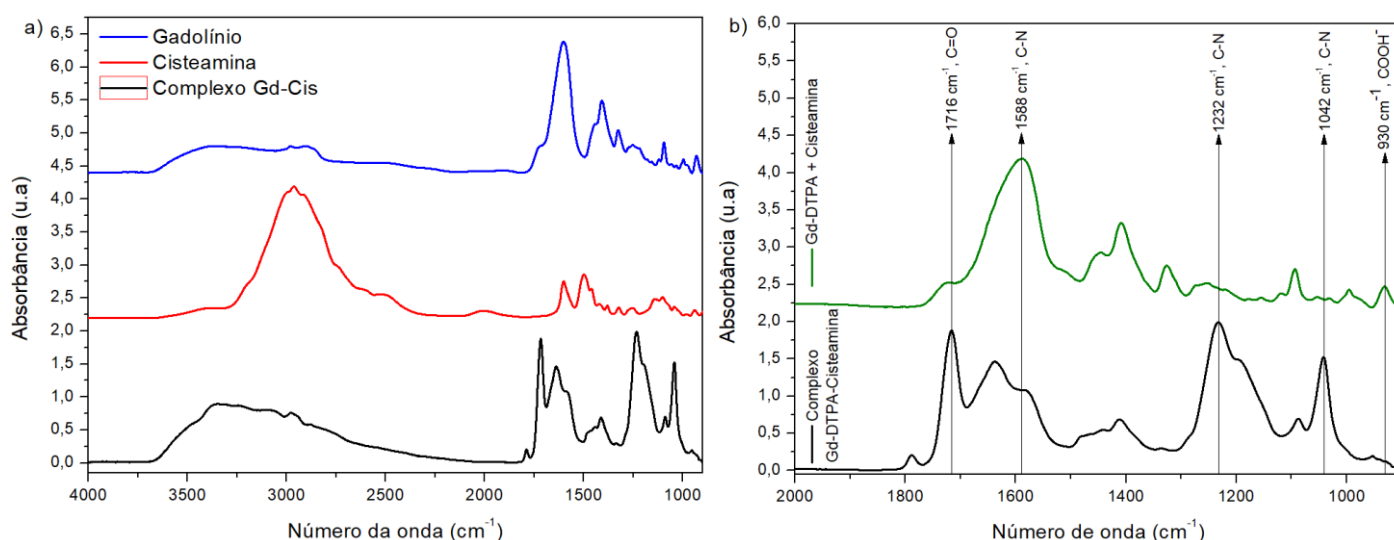
A região entre $1020\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ se refere a formação da ligação amida, correspondendo a vibração de estiramento de C-N, em que o um aumento de intensidade das bandas de 1042 cm^{-1} e 1232 cm^{-1} no espectro do complexo era esperado, pois evidência a ligação entre as moléculas para a formação do mesmo. O aumento da intensidade destas bandas proveniente da modificação via carbodiimida corrobora com Castilho e colaboradores (2017), em que utilizam uma metodologia semelhante para a modificação de um fotossensibilizador (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017).

Considerando a mistura Gd-DTPA+Cisteamina serem a somatória das bandas referente as moléculas, se observa uma banda de alta intensidade em 1588 cm^{-1} . Este modo vibracional está atribuído ao estiramento C-N originadas do Gd-DTPA (ZHOU *et al.*, 2021), em que após a formação da ligação amida entre o agente de contraste e

a Cisteamina duas novas bandas de menor intensidade se formam em 1637 cm^{-1} e 1578 cm^{-1} evidenciando a presença do gadolínio (C-N) e a ligação N-H proveniente da via carbodiimida, respectivamente (COATES, 2006; LU *et al.*, 2020).

O grupo carbonil (C=O) é modificado com a ligação amida proveniente da modificação química realizada na molécula do Gd-DTPA. Assim, o modo vibracional forte visto em 1716 cm^{-1} no complexo Gd-DTPA-Cisteamina provavelmente se refere ao enfraquecimento da ligação C=O resultando em um maior momento dipolo. Este enfraquecimento da ligação também é visto por Castilho e colaboradores (2017), quando usam a química carbodiimida (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017).

Figura 12: Espectros de FT-IR a) Gd-DTPA, Cisteamina e Complexo Gd-DTPA-cisteamina; b) Mistura entre Gd-DTPA + Cisteamina e o Complexo Gd-DTPA-Cisteamina.



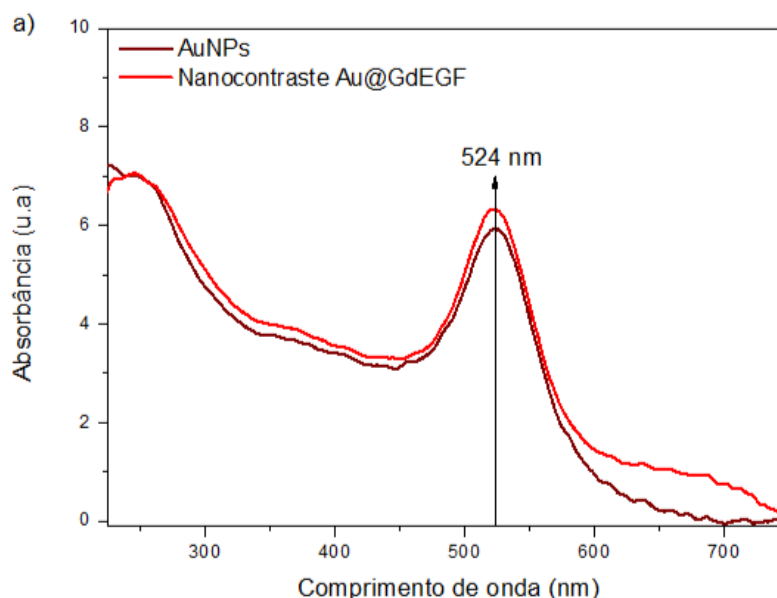
Fonte: O autor.

4.3 Caracterização do Nanocontraste Au@Gd-EGF

O nanocontraste Au@Gd-EGF foi produzido por meio da funcionalização do complexo Gd-DTPA-Cisteamina e do complexo EGF- α -ácido lipóico a AuNPs. A Figura 13 mostra as análises de Espectroscopia UV-Visível, no qual o nanocontraste apresentou uma banda de Ressonância Plasmônica centrada em 524 nm, característico das AuNPs produzidas. Observa-se também uma pequena mudança de absorção na região de 250 nm, o qual pode estar relacionado ao processo de funcionalização das AuNPs. Li e colaboradores (2013), relatam o desenvolvimento de uma nanopartícula de ouro multifuncional à base de dendrímero como um agente de

contraste, o gadolínio, em que seu espectro de UV-visível mostra uma absorção em 520 nm referente às AuNPs com uma pequena banda em aproximadamente 260nm, corroborando com os dados encontrados (LI *et al.*, 2013).

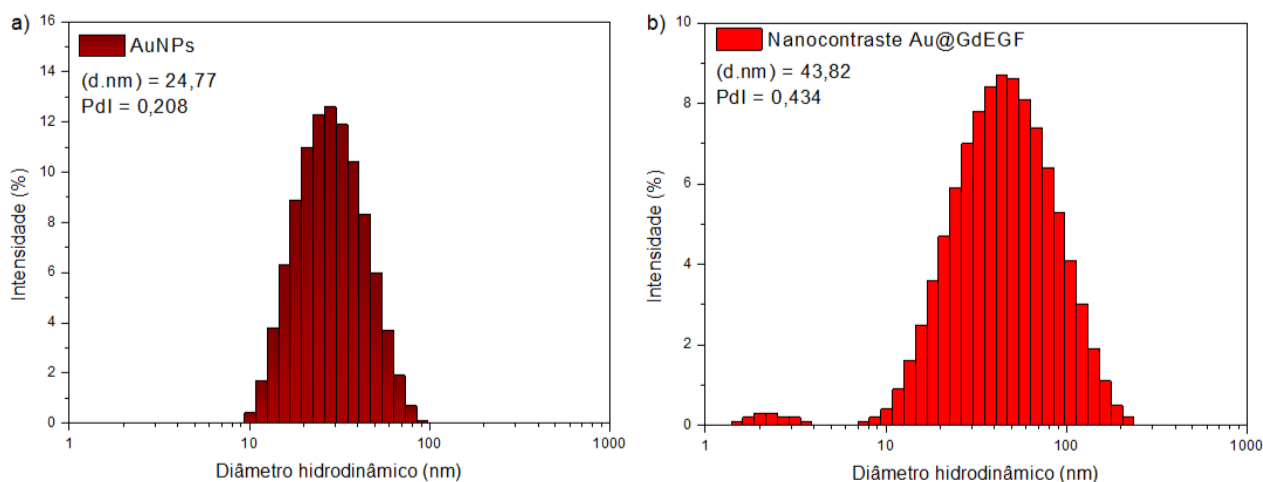
Figura 13: Espectro UV-Visível das AuNPS e do nanocontraste Au@Gd-EGF.



Fonte: O autor.

A análise pelo Espalhamento Dinâmico da Luz proporcionou caracterizar o diâmetro hidrodinâmico das partículas produzidas, como mostrado na Figura 14. Assim, as AuNPs sintetizadas apresentaram uma distribuição homogênea com um diâmetro médio de 24,77 nm e baixo índice de polidispersividade (Pdl) 0,208 (Figura 14a), enquanto no nanocontraste Au@Gd-EGF é observado um diâmetro médio de 43,82 nm com Pdl de 0,434, confirmando o processo de funcionalização. O aumento do diâmetro hidrodinâmico da partícula está relacionado com a adsorção dos complexos na área superficial da AuNPs, em que a molécula do Gd-DTPA apresenta uma área topológica 2,32 nm², enquanto a EGF apresenta uma área de 9,94nm², corroborando com o aumento de aproximadamente 19 nm encontrado para o nanocontraste (Figura 14b).

Figura 14: Diâmetro hidrodinâmico das partículas; a) AuNPs; b) Nanocontraste Au@Gd-EGF.



Fonte: O autor.

A estabilidade coloidal das partículas é mostrada na Tabela 2, em que é possível observar que pela análise de Potencial Zeta, tanto o nanocontraste Au@Gd-EGF como as AuNPs encontram-se estáveis, visto que os valores da análise estão abaixo de -30 mV (ANDRADE, 2008; EVERTT, 1989). A estabilidade das partículas está relacionada à carga superficial, em que as AuNPs estão carregadas negativamente (-39,2 mV) devido ao citrato de sódio utilizado com agente estabilizador, sendo este fato descrito também por Cho *et al.* (2014). Ao funcionalizar as AuNPs esta carga muda devido as moléculas adsorvidas em sua superfície, portanto o nanocontraste apresentou um potencial zeta de -33,3 mV sendo considerado estável para aplicações *in vitro* ou *in vivo*.

Tabela 2: Análise de Potencial Zeta.

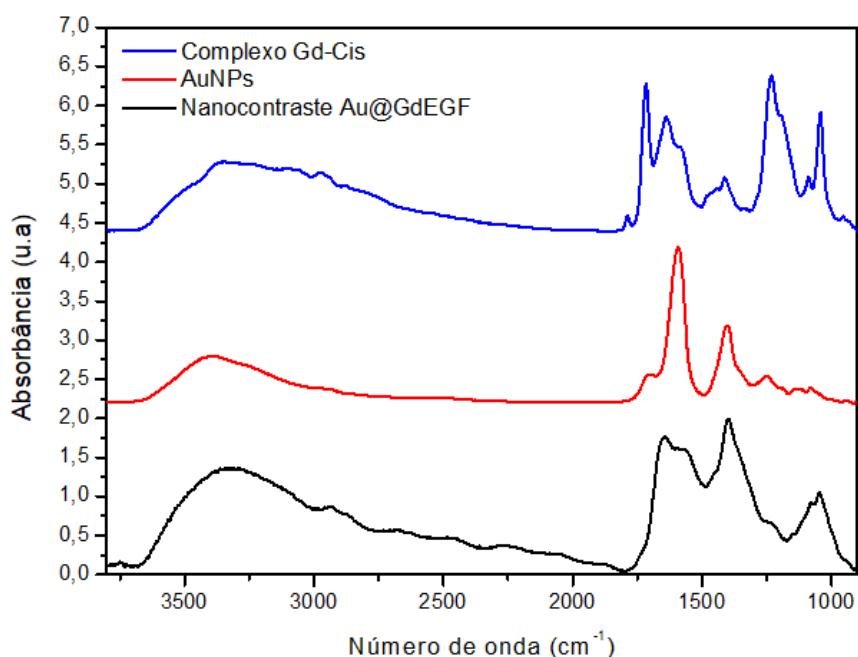
	Potencial Zeta (mV)	Condução (mS/cm)
Au@Gd-EGF	-33,3	0,292
AuNPs	-39,2	1,02

Fonte: O autor.

Na Figura 15 é mostrado os espectros característicos de FT-IR do complexo Gd-DTPA-Cisteamina, das AuNPs e do nanocontraste Au@Gd-EGF. Esta análise permite confirmar a funcionalização do complexo com as nanopartículas, no qual se

nota que no espectro do nanocontraste apresenta a contribuição de ambos componentes, corroborando com os dados obtidos no DLS. No espectro do nanocontraste encontra-se na região de 1043 cm^{-1} e 1081 cm^{-1} bandas provenientes do complexo Gd-DTPA-Cisteamina, em 1400 cm^{-1} se observa uma banda de alta intensidade características das AuNPs. O complexo de EGF- α -ácido lipóico exibe uma banda da absorção em 1650 cm^{-1} (dados não apresentados), os quais estão descritos por Castilho e colaboradores (2017), sendo uma região de grande interação no espectro do nanocontraste, evidenciando a presença da molécula alvo a qual permitirá a entrega direcionada do agente de contraste (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017).

Figura 15: Espectro de FT-IR do complexo Gd DTPA cisteamina, AuNPs e do nanocontraste Au@Gd-EGF.



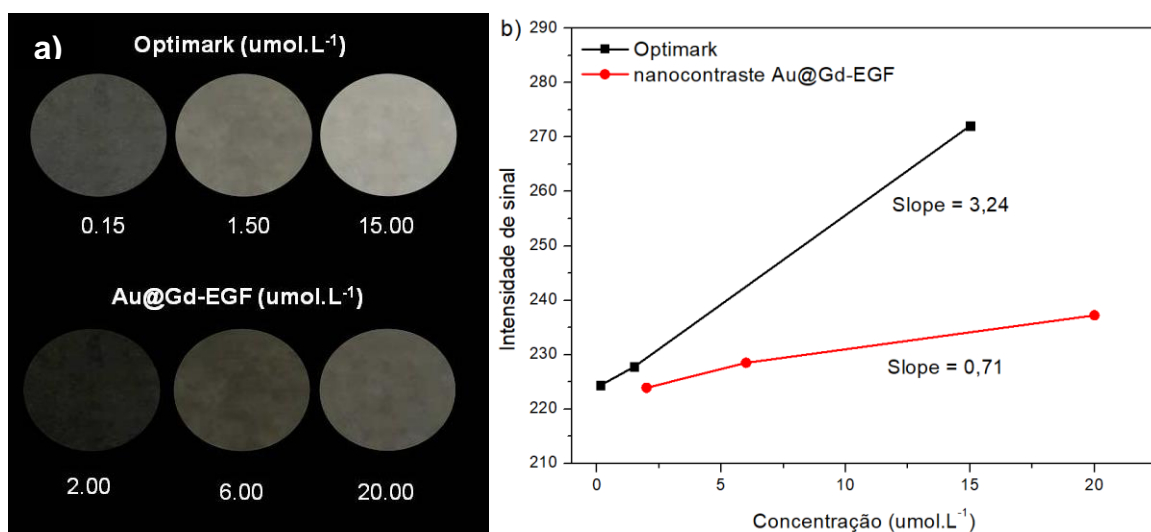
Fonte: O autor.

4.4 Ressonância Magnética

O desempenho do Au@Gd-EGF como agente de contraste para RM foi avaliado por meio da medida da intensidade relativa de sinal produzida em uma determinada região de interesse (ROI). Assim, diferentes concentrações do nanocontraste e de um agente de contraste comercial a base de gadolínio (Optimark) foram analisados como mostrado na Figura 16. As imagens mostram qualitativamente um aumento da

intensidade do brilho com o aumento da concentração do Au@Gd-EGF, o que também ocorre para o agente de contraste comercial (Figura 16a). Na Figura 16b são mostradas as medidas de ROI de acordo com a concentração do agente de contraste a fim de determinar uma comparação quantitativa. Observa-se um aumento da intensidade do sinal de acordo com a concentração do agente de contraste, o nanocontraste Au@Gd-EGF mostra uma taxa de variação de 0,77 enquanto o contraste comercial de 3,23 corroborando com a intensidade de brilho das imagens obtidas. Silva e coautores (2015) mostram uma análise de intensidade de sinal do gadolínio em diferentes concentrações e formulações, em que houve uma diminuição de 18,52% do contraste iodado em relação ao agente de contraste puro e uma redução de 29,26% da intensidade do sinal do contraste diluído com xilocaína também em relação ao Gd (SILVA *et al.*, 2015). Embora as modificações realizadas para a formação do complexo Gd-DTPA-Cisteamina não sejam semelhantes às formulações mostradas por Silva e colaboradores (2015), é possível observar uma perda da intensidade de sinal do Gd modificado em relação à formulação comercial, sendo importante ressaltar que a biodistribuição deste contraste comercial é homogêneo, enquanto o nanocontraste desenvolvido possui uma molécula alvo para o direcionamento da entrega até a região de interesse, o que permitirá uma maior sensibilidade e especificidade da técnica de RM no diagnóstico precoce de tumores mamários.

Figura 16: Desempenho do Au@Gd-EGF como agente de contraste na RM. a) Imagem; b) Intensidade relativa de sinal.



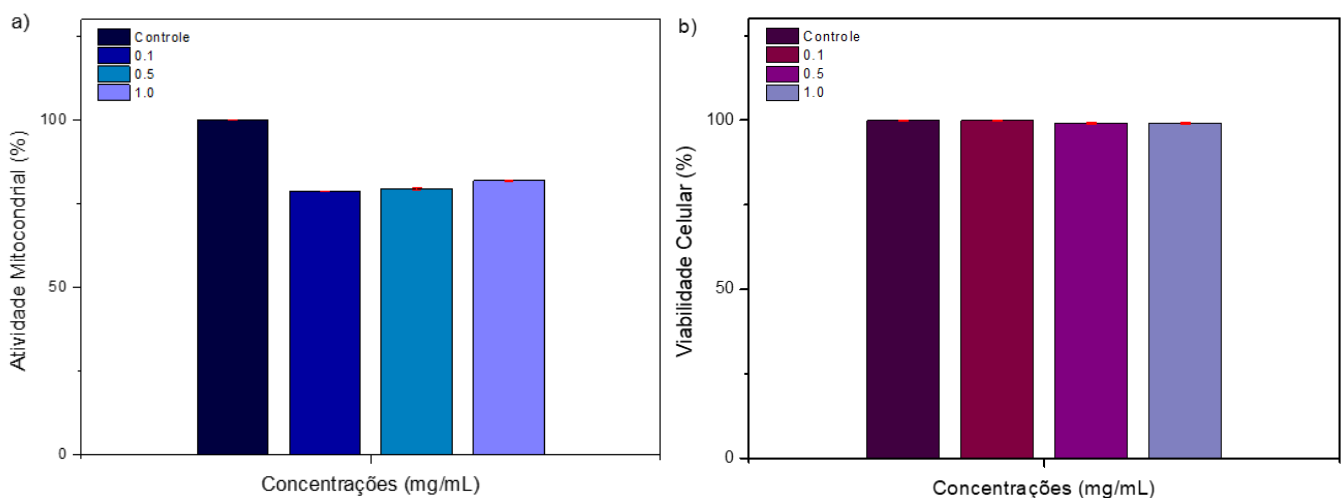
Fonte: O autor.

4.5 Citotoxicidade do nanocontraste Au@Gd-EGF

Os agentes de contraste utilizados em RM necessitam apresentar baixa citotoxicidade, assim foi avaliada a viabilidade celular e atividade mitocondrial do nanocontraste em linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-468), como mostra a Figura 17. O nanocontraste Au@Gd-EGF apresentou baixa citotoxicidade para as células expostas por 24 horas de incubação nas concentrações 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL, mostrando uma taxa de sobrevivência maior que 75% na linhagem celular MDA-MB-468, confirmando pelo método de exclusão, que analisa alterações na membrana (Figura 17b) e pelo MTT, que determina a atividade mitocondrial das células, sendo testes complementares (Figura 17a). Zhou e colaboradores (2021) avaliam a citotoxicidade do Gd-DTPAb@ZIF-8 NPs em células da linhagem 4T1 e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) em que a taxa de sobrevivência para os dois tipos de células estava acima de 75% após 24 h de incubação do agente de contraste em concentrações maiores que 12,5 µg/mL (ZHOU et. al., 2021). Assim este resultado mostra a excelente biocompatibilidade do nanocontraste Au@Gd-EGF, sugerindo sua aplicabilidade como agente de contraste no diagnóstico precoce de câncer de mama por ressonância magnética.

Figura 17: Citotoxicidade do nanocontraste Au@Gd-EGF na linhagem celular MDA MB-468.

a) Atividade Mitocondrial; b) Viabilidade Celular.



Fonte: O autor.

5 CONCLUSÃO

O complexo Gd-DTPA-Cisteamina modificado pela química carbodiimida foi caracterizado pela Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, no qual evidenciou os modos vibracionais em 930 cm^{-1} , 1042 cm^{-1} , 1232 cm^{-1} , 1588 cm^{-1} , 1716 cm^{-1} , caracterizando a formação do complexo, tornando possível o uso desta molécula para a funcionalização com as AuNPs.

A formação do nanocontraste Au@Gd-EGF foi caracterizada pela Espectroscopia UV-Vísivel e o Espalhamento Dinâmico de Luz, demonstrando a funcionalização dos complexos na área superficial das AuNPs, em que é observado uma alteração de absorção de 250 nm e um aumento do diâmetro hidrodinâmico da partícula para 43,82 nm, respectivamente.

A intensidade relativa do sinal avaliada por RM determinou o desempenho do Au@Gd-EGF como agente de contraste. Embora, esta intensidade tenha sido inferior ao do contraste comercial, direcionamento ativo presente no nanocontraste Au@Gd-EGF permitirá uma maior especificidade e sensibilidade na técnica de diagnóstico. A citotoxicidade do nanocontraste foi avaliada em células mamárias malignas da linhagem MDA-MB-468 pela atividade mitocondrial (MTT) e viabilidade celular (Azul de Tripán), sendo testes complementares, que demonstraram uma taxa de sobrevivência superior a 75%, determinando que o nanocontraste é biocompatível para aplicações *in vivo*.

O nanocontraste a base de gadolínio com direcionamento ativo foi sintetizado por meio da funcionalização de AuNPs aos complexos Gd-DTPA-Cisteamina e EGF- α -ácido lipóico. Nas aplicações do diagnóstico precoce por ressonância magnética de células tumorais, o nanocontraste Au@Gd-EGF apresentou uma boa eficiência e baixa citotoxicidade. Deste modo, o seu uso pode ser considerado seguro para futuras aplicações em diagnóstico por ressonância magnética.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.; DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5737-5750, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.008>
- AIOUB, M.; EL-SAYED, M. A. A real-time surface enhanced raman spectroscopy study of plasmonic photothermal cell death using targeted gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 4, p. 1258-1264, 2016. <https://doi-org.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1021/jacs.5b10997>
- ALHAMAMI, M. *et al.* Manganese-porphyrin-enhanced MRI for the detection of cancer cells: A quantitative in vitro investigation with multiple clinical subtypes of breast cancer. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0196998, 2018.
- ALRIC, C. *et al.* Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 18, p. 5908-5915, 2008.
- ANDRADE, J. E. Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob a influência do pH. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências - Física) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- BAZZOCCHI, M. *et al.* Contrast-enhanced breast MRI in patients with suspicious microcalcifications on mammography: results of a multicenter trial. **American Journal of Roentgenology**, v. 186, n. 6, p. 1723-1732, 2006.
- BERG, W. A. *et al.* Detection of breast cancer with addition of annual screening ultrasound or a single screening MRI to mammography in women with elevated breast cancer risk. **Jama**, v. 307, n. 13, p. 1394-1404, 2012a.
- BERG, W. A. *et al.* Shear-wave elastography improves the specificity of breast US: the BE1 multinational study of 939 masses. **Radiology**, v. 262, n. 2, p. 435-449, 2012b.
- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941, 2015.
- BURR, M. L. *et al.* An evolutionarily conserved function of polycomb silences the MHC Class I antigen presentation pathway and enables immune evasion in cancer. **Cancer Cell**, v. 36, n. 4, p. 385-401. e8, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.008>
- CAO, Y. *et al.* Gadolinium-based nanoscale MRI contrast agents for tumor imaging. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 19, p. 3431-3461, 2017.
- CARAVAN, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 6, p. 512-523, 2006.
- CARDENOSA, G. **Breast imaging companion**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

- CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal growth factor. **Annual review of biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 193-216, 1979.
- CASTILHO, M. L.; HEWITT, K. C.; RANIERO, L. FT-IR characterization of a theranostic nanoprobe for photodynamic therapy and epidermal growth factor receptor targets. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 903-908, 2017.
- CHELLQUIST, E. M.; SEARLE, R. An LC method for measuring complex formation equilibria by competitive chelation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 11, n. 10, p. 985-992, 1993.
- CHEN, S. *et al.* Pretreatment prediction of immunoscore in hepatocellular cancer: a radiomics-based clinical model based on Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI imaging. **European radiology**, v. 29, n. 8, p. 4177-4187, 2019.
- CHO, W.-S. *et al.* Surface functionalization affects the zeta potential, coronal stability and membranolytic activity of polymeric nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 2, p. 202-211, 2014.
- CHONG, C. R.; JÄNNE, P. A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1389-1400, 2013. Doi: <https://doi-org.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1038/nm.3388>
- COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *In*: MEYERS, Robert A. (Ed.). **Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation**. Hoboken, Nova Jersey: Wiley, 2006.
- CORR, S. A.; RAKOVICH, Y. P.; GUN'KO, Y. K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 3, p. 87-104, 2008.
- DAI, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2929, 2015.
- DE ABREU PAULINO, K. V. F. Efeitos do uso de contrastes a base de gadolínio em exames de ressonância magnética. *In* CONGRESSO METODISTA DE INICIAÇÃO E PRODUÇÃO CIENTÍFICA; SEMINÁRIO DE EXTENSÃO 20., 2018, São Bernardo do Campo. **Anais Eletrônico [...]**. São Bernardo do Campo: Metodista, 2018. Disponível em: <http://www.metodista.br/congressos-cientificos/index.php/CM2018/ECMS2018/paper/view/9626>
- DE HAËN, C. Conception of the first magnetic resonance imaging contrast agents: a brief history. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, v. 12, n. 4, p. 221-230, 2001.
- DENT, R. *et al.* Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 115, n. 2, p. 423-428, 2009.
- DI COSIMO, S. *et al.* The use of breast imaging for predicting response to neoadjuvant lapatinib, trastuzumab and their combination in HER2-positive breast cancer: Results from Neo-ALTTO. **European journal of cancer**, v. 89, p. 42-48, 2018.

D'ORSI, C. J. Breast Imaging Reporting and Data System: breast imaging atlas: mammography, breast ultrasound, breast MR imaging. *In*: LEE, C.I.; LEHMAN, C. D. BASSETT, L. W. (ed.). **Breast imaging**. New York: Oxford university press, 2003.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537-556, 2018.

ELIAS JUNIOR, J. *et al.* Complicações do uso intravenoso de agentes de contraste à base de gadolínio para ressonância magnética. **Radiologia Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 263-267, 2008.

EVERTT, D. Basic Principles of Colloidal Science. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 328-329, 1989.

GOMES, R. C.; CARNEIRO, C. C. Ressonância magnética: princípios básicos na formação da imagem com ênfase na utilização do contraste gadolínio. **Connection line-revista eletrônica do Univag**, n. 21, p. 164-176, 2019. DOI: 10.18312/connectionline.v0i21.1406

GROBMYER, S. R. *et al.* The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 103, n. 4, p. 317-25, 2011. <https://doi-org.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jso.21698>

HAMILTON, B. E. *et al.* Comparative analysis of ferumoxetyl and gadoteridol enhancement using T1-and T2-weighted MRI in neuroimaging. **American Journal of Roentgenology**, v. 197, n. 4, p. 981-988, 2011.

HOSSEN, S. *et al.* Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. **Journal of advanced research**, v. 15, p. 1-18, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.005>

HUANG, C.; NOTTEN, A.; RASTERS, N. Nanoscience and technology publications and patents: a review of social science studies and search strategies. **Journal of Technology Transfer**, v. 36, n. 2, p. 145-172, 2011.

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and future. **Human and experimental toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015.

IKEDA, D.; MIYAKE, K. K. **Breast imaging**: the requisites. Amsterdã: Elsevier Health Sciences, 2016. E-book.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 28 Ago 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, (Brasil). Estatística para câncer de mama. 2018. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatisticas-para-cancer-de-%20mama/6562/34/%3e/>. Acesso em: 28 Ago 2020.

IQBAL, N.; IQBAL, N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. **Molecular biology international**, v. 2014, p. 852748, 2014. Doi:10.1155/2014/852748

ISMAIL-KHAN, R.; BUI, M. M. A review of triple-negative breast cancer. **Cancer control**, v. 17, n. 3, p. 173-176, 2010.

IZZI, M. *et al.* Pros and Cons of Sacrificial Anode Electrolysis for the Preparation of Transition Metal Colloids: A Review. **ChemElectroChem**, v. 7, n. 2, p. 386-394, 2020.

JU, Y. *et al.* Inherent multifunctional inorganic nanomaterials for imaging-guided cancer therapy. **Nano Today**, v. 26, p. 108-122, 2019.

KLARENBACH, S. *et al.* Recommendations on screening for breast cancer in women aged 40–74 years who are not at increased risk for breast cancer. **CMAJ**, v. 190, n. 49, p. E1441-E1451, 2018. DOI: <http://dx-doi.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1503/cmaj.180463>

KNOPP, M. V. *et al.* Gadobenate dimeglumine-enhanced MRI of the breast: analysis of dose response and comparison with gadopentetate dimeglumine. **American Journal of Roentgenology**, v. 181, n. 3, p. 663-676, 2003.

KOVACS, E. *et al.* A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. **Annual review of biochemistry**, v. 84, p. 739-764, 2015.

KUHL, C. The current status of breast MR imaging part I. Choice of technique, image interpretation, diagnostic accuracy, and transfer to clinical practice. **Radiology**, v. 244, n. 2, p. 356-378, 2007.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982.

LEE, S. C. *et al.* Radiologist's role in breast cancer staging: providing key information for clinicians. **Radiographics**, v. 34, n. 2, p. 330-342, 2014.

LI, Kangan *et al.* Multifunctional dendrimer-based nanoparticles for in vivo MR/CT dual-modal molecular imaging of breast cancer. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 2589, 2013.

LI, N. *et al.* Multiple gold nanorods@ hierarchically porous silica nanospheres for efficient multi-drug delivery and photothermal therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 8, p. 1642-1649, 2017.

LIBERMAN, L. *et al.* MR imaging of the ipsilateral breast in women with percutaneously proven breast cancer. **American Journal of Roentgenology**, v. 180, n. 4, p. 901-910, 2003.

LU, Rong *et al.* Gadolinium-hyaluronic acid nanoparticles as an efficient and safe magnetic resonance imaging contrast agent for articular cartilage injury detection. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 4, p. 758-767, 2020. Doi: [10.1016/j.bioactmat.2020.05.009](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.05.009)

LUCAS, L. J. *et al.* Development of a sensitive, stable and EGFR-specific molecular imaging agent for surface enhanced Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 5, p. 434-446, 2015.

ANDREATO, L. **Ressonância Magnética das Mamas**. 2016. Disponível em: <http://luizandreatoctmri.blogspot.com/2016/02/ressonancia-magnetica-das-mamas.html> . Acesso em: 29 set. 2020.

MARINE, J. C; DAWSON, S. J; DAWSON, M. A. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.20, p. 743–756, 2020. DOI<https://doi-org.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1038/s41568-020-00302-4>

MOUTIEZ, E. *et al.* Time-resolved Luminescence as a Novel Detection Mode for the Simultaneous High-performance Liquid Chromatographic Determination of Gadolinium–DOTA and Gd³⁺. **Analyst**, v. 122, n. 11, p. 1347-1352, 1997. <https://doi-org.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1039/A703800C>

NEAL, D. E. *et al.* The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. **Cancer**, v. 65, n. 7, p. 1619-1625, 1990. Doi: 10.1002/1097-0142(19900401)65:7<1619::AID-CNCR2820650728>3.0.CO;2-Q

NI, D. *et al.* Engineering of inorganic nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 23, p. 7438-7468, 2017.

PENAULT-LLORCA, F; RADOSEVIC-ROBIN, N. Biomarkers of residual disease after neoadjuvant therapy for breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 8, p. 487, 2016. DOI:<http://dx-doi.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1038/nrclinonc.2016>.

PERALDO-NEIA, C. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. **BMC Cancer**, v. 11, p. 31, 2011. Doi: <https://doi-org.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1186/1471-2407-11-31>

PLASILOVA, M. L. *et al.* Features of triple-negative breast cancer: Analysis of 38,813 cases from the national cancer database. **Medicine**, v. 95, n. 35, 2016.

REY-VARGAS, L. *et al.* Effect of neoadjuvant therapy on breast cancer biomarker profile. **BMC cancer**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

ROGERS, S. J. *et al.* Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 24, n. 1, p. 47-69, 2005. DOI: <https://doi-org.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10555-005-5047-1>

RUSSO J; RUSSO, I. H. Development of the human breast. **Maturitas**, v. 49, n. 1, p. 2-15, 2004.

RUSSO, J. *et al.* Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor α and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. **Breast cancer research and treatment**, v. 53, n. 3, p. 217-227, 1999.

SANTOS, M. V. **Contaminantes metálicos em contrastes a base de quelatos de gadolínio e reações de transmetalização**. 2013. Tese (Doutorado) universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Santa Maria, 2013.

SHAHID, Muhammad. Water soluble gold nanoparticles based high relaxivity MRI contrast agents. **Materials Research Express**, v. 6, n. 12, p. 1250h1, 2020. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6b53>

SHENG, Q.; LIU, J. The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 8, p. 1241-5, 2011.

SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Molecular oncology**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2018.

SILVA, Y. L. P. *et al.* Efeitos do contraste iodado, da xilocaína e da concentração de gadolínio no sinal emitido em exames de artrorrressonância magnética: estudo por amostras. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 2, p. 69-73, 2015.

SINHA, S. *et al.* Novel Gd-Loaded Silicon Nanohybrid: A Potential EGFR Expressing Cancer Cell Targeting MRI Contrast Agent. **Applied Materials and Interfaces**, v.9, n. 49, p.42601-42611, Dec. 2017.

SOPIK, V.; SUN, P.; NAROD, S. A. Impact of microinvasion on breast cancer mortality in women with ductal carcinoma in situ. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 3, p. 787-795, 2018.

SPAK, D. A. *et al.* BI-RADS® fifth edition: A summary of changes. **Diagnostic and interventional imaging**, v. 98, n. 3, p. 179-190, 2017.

SPANO, J. P. *et al.* Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. **Ann Oncol.**, v. 16, n. 1, p. 102-108, 2005.

STENEHJEM, D. D. *et al.* Assessment of HER2 testing patterns, HER2+ disease, and the utilization of HER2-directed therapy in early breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 6, p. 169-177, 2014.

TESLA. **Diferença entre ressonância magnética e tomografia computadorizada**. 2020. Disponível em: <https://teslaimagem.com.br/diferenca-entre-ressonancia-magnetica-e-tomografia-computadorizada/> Acesso em: 29 set. 2020.

URBAN, L. A. B. D; CHALA, L. F; MELLO, G. G. N. **Mama CBR**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. (Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem)

VAN STEENHOVEN, J. E. C. *et al.* Conventional pathology versus gene signatures for assessing luminal A and B type breast cancers: results of a prospective cohort study. **Genes**, v. 9, n. 5, p. 261, 2018.

VEALE, D. *et al.* Characterization of epidermal growth factor receptor in primary human non-small cell lung cancer. **Cancer Res.**, v. 49, n. 5, p. 1313-1317, 1989.

WESTBROOK, C.; ROTH, C. K.; TALBOT, J. **Ressonância Magnética: Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

YANG, M. *et al.* Mitomycin C-treated human-induced pluripotent stem cells as a safe delivery system of gold nanorods for targeted photothermal therapy of gastric cancer. **Nanoscale**, v. 9, n. 1, p. 334-340, 2017.

ZANETTI, J. S; RIBEIRO-SILVA, A. Carcinoma mucinoso invasor da mama e seus diagnósticos diferenciais em biópsia por agulha grossa: revisão da literatura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 2, p. 99-104, 2010.

ZENG, Z. *et al.* Mammography and ultrasound effective features in differentiating basal-like and normal-like subtypes of triple negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 45, p. 79670, 2017.

ZHAN, C. *et al.* A Gold Nanocage/Cluster Hybrid Structure for Whole-Body Multispectral Optoacoustic Tomography Imaging, EGFR Inhibitor Delivery, and Photothermal Therapy. **Small**, v. 15, n. 33, p. 1900309, 2019. Doi: <https://doi-org.ez102.periodicos.capes.gov.br/10.1002/sml.201900309>

ZHOU, W. *et al.* Zeolitic imidazolate framework nanoparticles loaded with gadolinium chelate as efficient T 1 MRI contrast agent. **Journal of Materials Science**, v. 56, n. 12, p. 7386-7396, 2021.

ANEXO A: Trabalhos publicados em anais de congresso.



ENCONTRO DE OUTONO 2020
SOCIEDADE BRASILEIRA DE FÍSICA

CERTIFICATE

The Organizing Committee hereby certifies that the work "Synthesis and characterization of nanocontrast for diagnostic imaging" by Thais da Silva Veriato, Suélio Marinho de Queiroz, Aline Cristina de Lima, Leandro Raniero, Maiara Lima Castilho was presented in the session MEDICAL PHYSICS I of the Encontro de Outono da SBF 2020, which took place in Online from November 23 to 27, 2020.



222-219-1

November 27, 2020




Eduardo Granado
Coordenador de Programa


Cicero Rafael Cena
Coordenador Geral

ANEXO B: Gold Nanoparticles Conjugated with EGF And Gadolinium-DTPA for Targeted Delivery of a Contrast Agent in MRI.

ACS Applied Materials & Interfaces

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Gold Nanoparticles conjugated with EGF and Gadolinium-DTPA for targeted delivery of a contrast agent in MRI

Journal:	<i>ACS Applied Materials & Interfaces</i>
Manuscript ID	am-2021-062707
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	05-Apr-2021
Complete List of Authors:	Queiroz, Suelio; Universidade do Vale do Paraiba Veriato, Thaís; Universidade do Vale do Paraiba Raniero, Leandro; Universidade do Vale do Paraiba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Castilho, Maiara; Universidade do Vale do Paraiba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

SCHOLARONE™
Manuscripts