



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Dissertação de mestrado:

Heterogeneidade vascular em tumores sólidos e sua possível influência no acúmulo passivo  
de nanoemulsões lipídicas

Jaqueline Vaz de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Brasília - DF

2019

Jaqueline Vaz de Oliveira

Heterogeneidade vascular em tumores sólidos e sua possível influência no acúmulo passivo  
de nanoemulsões lipídicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Nanociência e  
Nanobiotecnologia, da Universidade de  
Brasília, como parte integrante dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Brasília - DF

2019

À Deus e a minha amada família, que  
estiveram ao meu lado durante esta caminhada  
e sempre me incentivaram a realizar meus  
sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Ao longo destes dois anos de trabalho que resultaram nesta dissertação, pessoas e instituições me ajudaram, ensinando e apoiando. Agora que alcanço meus objetivos, não poderia deixar de reconhecê-las.

A Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos.

Agradeço aos meus familiares Aliny, Maikeliny, André, Kalebe e Antônio que sempre me motivaram e pelo apoio incondicional que sempre me deram. Nunca conseguirei expressar em palavras o quanto eu amo vocês.

A minha mãe e melhor amiga, Euma. Mulher forte e admirável que me ensinou a paixão pelos livros e mostrou o quanto era importante estudar, mesmo não tendo a mesma oportunidade no passado. Mamãe, muito obrigado por sempre estar ao meu lado e acreditar tanto em mim que os meus sonhos se tornam seus também. Te agradeço por entender a minha ausência em momentos importantes e por sempre demonstrar tanto cuidado comigo. Nunca se esqueça, que perto ou longe, o meu amor sempre irá te acompanhar.

Ao meu querido orientador João Paulo. Sempre serei grata pela oportunidade dada a mim para a realização deste mestrado. Obrigada por compartilhar da sua sabedoria, conselhos e amor pela ciência (além do bom gosto pra piadas). Com certeza, um homem que faz jus ao título de “professor”, com humildade e sensibilidade que raramente se encontram no meio acadêmico. Espero apenas que um dia eu possa retribuir de alguma maneira tudo o que aprendi com você. Me sinto muito honrada e orgulhosa em ter sido sua aluna!

Ao meu amigo Mosar pelo companheirismo e apoio, tanto pessoal quanto acadêmico. Muito obrigada pela sua amizade e cumplicidade. Admiro muito você como profissional e por essa forma feliz que você tem de ver a vida. Sempre serei agradecida pelo apoio nos momentos turbulentos durante os seletivos de doutorado na reta final do mestrado. Sou grata pelo privilégio de conhecer você e o Daniel e por me receberem de maneira tão acolhedora, que sua família se tornou um pouco minha também.

A professora e amiga, Patrícia Bento. Que honra em conhecer você e o Wellington, exemplo de parceria e cumplicidade. Admiro muito você como mulher, professora e

pesquisadora. Obrigada por sempre me apoiar e me encorajar frente aos desafios da vida acadêmica. Agradeço também pelo auxílio e colaboração no decorrer dos experimentos.

A minha querida amiga, Márcia Cristina, exemplo de humildade e profissionalismo. Toda a minha gratidão a você pelo auxílio durante a realização dos experimentos. Sempre irei admirar seu senso de justiça, honestidade e integridade.

Ao meu amigo Victor Hugo pela parceria e amizade. Quanto carinho eu sinto por você e toda a sua família! Obrigada por todo o companheirismo e paciência durante estes dois anos.

Ao professor Ricardo Bentes pela companhia no café de todos os dias e por todos os conselhos que nortearam muitas decisões importantes em minha vida acadêmica. Levarei comigo seus ensinamentos e competência como exemplo durante minha trajetória acadêmica.

Ao grupo de pesquisa Nanobioimage (Débora, Luiza, Camila, Marina, Daniele, Nelice, Raquel, Fernanda e Thyago) coordenado pelo professor João Paulo. Muito obrigada por todas as contribuições, ensinamentos e pela convivência. Desejo do fundo do meu coração muito sucesso a cada um de vocês.

As amigas Rayane, Amanda e Camila por ensinarem tanto com suas personalidades e profissionalismo. Tenho muita admiração por cada uma de vocês e, principalmente, pelo amor e cuidado com que vocês conduzem seu trabalho.

Ao meu querido amigo, Gabriel, por todo auxílio e descontração proporcionada, fazendo com que as horas de trabalho fossem mais alegres. Obrigada pelo apoio e conselhos dados nas nossas longas conversas. Sua amizade é um grande presente!

Aos amigos e colegas do laboratório de nanobiotecnologia, Athayde, Henrique, Frederico, Marcela, Maria, Victor Melo, Lucas, Estér, Alícia, Wille, Maria Luiza pela amizade e companheirismo.

Aos professores César Grisólia e Jaqueline Rodrigues pela companhia diária e conselhos recebidos.

Ao professor Andris Figueiroa Bakuzis e seu Aluno Ailton Antônio de Sousa-Júnior do laboratório de magnetismo e nanomedicina térmica da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela gentileza e colaboração na realização do experimento de biodistribuição por tomografia por fluorescência molecular.

A professora Sônia Nair Bao e a técnica Ingrid Graciele do laboratório de microscopia eletrônica da Universidade de Brasília (UnB) pelo auxílio no experimento utilizando o microscópio eletrônico de varredura.

Aos técnicos do laboratório de nanobiotecnologia Karen e Diogo por todo e auxílio e prestatividade durante a execução dos experimentos.

A Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, pela oportunidade.

Agradeço sinceramente a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

As agências de fomento CAPES, CNPq, FINATEC, FINEP e FAP-DF.

“Aprender é a única coisa que a mente  
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se  
arrepende.”

Leonardo Da Vinci

## RESUMO

O desenvolvimento tumoral provoca o aumento da expressão de fatores angiogênicos induzindo a formação de uma rede vascular alterada, que suporta a sua sobrevivência e expansão além de fornecer uma via de transporte para metastizar as células tumorais. A ideia da nanomedicina é oferecer terapias eficientes para ajudar os compostos a permanecerem em circulação por mais tempo e se acumularem nos tumores em vez do tecido saudável. Grande parte dessas terapias baseiam-se na ideia de que as partículas se acumulam nos tumores devido a um fenômeno em que os vasos sanguíneos apresentam endotélio descontínuo que facilita a passagem preferencial para o tecido tumoral e permaneçam no local por mais tempo devido a atividade linfática ineficiente, evento conhecido como Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentada (EPR). Porém, muitos pesquisadores têm questionado essa premissa devido à dificuldade de nanopartículas carregadas com fármaco demonstrarem maior eficácia em ensaios clínicos. Com isso, o estudo de como as estruturas vasculares tumorais afetam o acúmulo de nanopartículas em tecidos tumorais é um tópico de interesse da comunidade científica. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura vascular tumoral de dois modelos experimentais de adenocarcinoma (adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino) e analisar sua influência na biodistribuição de nanoemulsão contendo o marcador fluorescente DiR (1,1'-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine Iodide). Para este fim, foram utilizadas técnicas de imageamento e análise morfológica como microscopia eletrônica de varredura, microtomografia computadorizada, tomografia por fluorescência molecular, permeabilidade vascular (Azul de Evans), histologia e imuno-histoquímica (CD31 e KI67) para estudar como os vasos sanguíneos se comportam na quarta semana de desenvolvimento tumoral. Utilizando estas técnicas, observou-se que mesmo as duas linhagens de adenocarcinoma estando em tempo de desenvolvimento semelhantes e com a mesma localização anatômica, apresentam comportamento vascular distinto dentro e entre os tipos de tumor de forma que isso afeta na dinâmica de perfusão e permeabilidade vascular e, na biodistribuição passiva da nanoemulsão para tecido tumoral. Desta forma, recomenda-se que para uma melhor aplicação clínica em terapias utilizando materiais nanoestruturados, o comportamento biológico tumoral deve ser avaliado individualmente para que se consiga selecionar a estratégia mais adequada para o tratamento e, conseqüentemente, se tenha maior sucesso clínico em nanomedicina.

**Palavras-chave:** Efeito EPR. Remodelamento vascular tumoral. Nanomedicina. Direcionamento tumoral. Câncer.

## ABSTRACT

Tumor development causes increased expression of angiogenic factors by inducing the formation of an altered vascular network, which supports its survival and expansion, as well as providing a transport pathway to metastasize tumor cells. The idea of nanomedicine is to offer effective therapies to help compounds stay in circulation longer and accumulate in tumors instead of healthy tissue. Much of these therapies are based on the idea that particles accumulate in tumors due to a phenomenon in which the blood vessels have discontinuous endothelium that facilitates the preferential passage to the tumor tissue and remain in place longer due to inefficient lymphatic activity, an event known as Permeability Effect and Enhanced Retention (EPR). However, many researchers have questioned this premise because of the difficulty of drug-loaded nanoparticles to demonstrate greater efficacy in clinical trials. Thus, the study of how tumor vascular structures affect the accumulation of nanoparticles in tumor tissues is a topic of interest to the scientific community. The aim of this study was to study the tumor vascular structure of two experimental adenocarcinoma models (Ehrlich adenocarcinoma and murine mammary adenocarcinoma) and to analyze its influence on the biodistribution of nanoemulsion containing the fluorescent marker DiR (1,1'-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine Iodide). To this end, imaging and morphological analysis techniques such as scanning electron microscopy, computerized microtomography, molecular fluorescence tomography, vascular permeability (evans blue), histology and immunohistochemistry (CD31 and KI67) were used to study how blood vessels behave in the fourth week of tumor development. Using these techniques, it has been observed that even the two adenocarcinoma lines being at the same time of development and with the same anatomical location, exhibit distinct vascular behavior within and between tumor types so that this affects the perfusion dynamics and vascular permeability and in the passive biodistribution of the nanoemulsion into tumor tissue. Thus, it is recommended that for a better clinical application in therapies using nanostructured materials, the biological behavior of the tumor should be evaluated individually so that the most appropriate strategy for the treatment can be selected and, consequently, the clinical success in nanomedicine is improved.

**Keywords:** EPR effect. Tumor vascular remodeling. Nanomedicine. Tumor targeting. Cancer.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Características biológicas necessárias para progressão tumoral.

**Figura 2:** Representação ilustrativa do Efeito EPR: vasculatura normal e disfuncional em processos neoplásicos.

**Figura 3:** Características fisiológicas do microambiente tumoral.

**Figura 4:** Representação esquemática do delineamento experimental esboçando os procedimentos e grupos experimentais utilizados para a realização do estudo.

**Figura 5 -** Representação esquemática do método para perfusão de contraste iodado e análise de radiopacidade.

**Figura 6 -** Representação ilustrativa das Regiões de Interesse (ROI) superficial e interna delimitadas nos tumores para quantificação e análise de radiopacidade.

**Figura 7 -** Representação esquemática do método para administração de azul de evans e análise de permeabilidade vascular.

**Figura 8 -** Representação ilustrativa do método de criofratura.

**Figura 9 -** Representação ilustrativa da obtenção de imagens para mensuração da intensidade de fluorescência por tomografia por fluorescência molecular.

**Figura 10 -** Representação ilustrativa das Regiões de Interesse (ROI) delimitadas em áreas de pulmão, fígado e tumor para quantificação e análise de intensidade de fluorescência.

**Figura 11:** Variação do volume tumoral de camundongos Balb/C fêmeas.

**Figura 12:** Variação do peso do pulmão (A), fígado (B) e tumor (C) de camundongos Balb/C fêmeas.

**Figura 13:** Análise de perfusão vascular de fígado (A) e pulmão (C) de camundongos Balb/C fêmeas e suas respectivas área sob a curva (B e D).

**Figura 14:** Análise de perfusão vascular em regiões externa (cor preta) e interna (cor verde) de tumores de camundongos Balb/C fêmeas portando adenocarcinoma mamário murino (A), adenocarcinoma de Ehrlich (C) e suas respectivas área sob a curva (B e D).

**Figura 15:** Imagem representativa das amostras de tumor (A após perfusão e D sem perfusão), fígado (B após perfusão e E sem perfusão) e pulmão (C após perfusão e F sem perfusão) de camundongos Balb/C fêmeas.

**Figura 16:** Análise de permeabilidade vascular de pulmão, fígado e tumor de camundongos Balb/C fêmeas portadores de adenocarcinoma ascítico de Ehrlich (cor verde) e adenocarcinoma mamário murino (cor azul).

**Figura 17:** Fotomicrografia representando as diferentes regiões do tecido tumoral.

**Figura 18:** Fotomicrografias de adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino de camundongos Balb/C fêmeas em regiões superficiais (A e B) e internas (C e D).

**Figura 19:** Fotomicrografias de adenocarcinoma de Ehrlich (A a F) e adenocarcinoma mamário murino (G a L) de camundongos Balb/C fêmeas submetidos a marcação imunohistoquímica para avaliação da expressão de KI67 e CD31 em regiões superficiais, intermediárias e internas.

**Figura 20:** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando endotélio vascular de fígado (A e B), pulmão (C e D), adenocarcinoma mamário murino em região interna (E e F) e região superficial (G e H) e, adenocarcinoma de Ehrlich em região interna (I e J) e região superficial (K e L).

**Figura 21:** Imagem em tempo real das regiões ventral e dorsal de camundongos portadores de adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino nos tempos de 04, 08, 24 e 48 horas após a injeção intraperitoneal de NEDiR e DiR livre.

**Figura 22:** Intensidade de fluorescência após injeção intraperitoneal de NEDiR e DiR livre.

**Figura 23:** Intensidade de fluorescência em região interna e externa do tumor após injeção intraperitoneal de NEDiR e DiR livre.

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>°C</b>	Celsius
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética de Uso Animal
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DiR</b>	1,10-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine Iodide
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>Efeito EPR</b>	Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentada
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HIF – <math>\alpha</math></b>	Fator induzido por hipóxia alfa
<b>HU</b>	Unidade de Hounsfield
<b>Kg</b>	Kilogramas
<b>KI67</b>	Marcador de proliferação de células tumorais
<b>CD31</b>	Marcador de densidade vascular
<b>MEV</b>	Microscópio eletrônico de varredura
<b>mL</b>	Mililitros
<b>µm</b>	Micrômetros
<b>mm</b>	Milímetros

<b>nm</b>	Nanômetros
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROI</b>	Região de interesse
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>VE – Caderina</b>	Caderina endotelial vascular
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrômetro
<b>3D</b>	Tridimensional

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
1.1 Câncer .....	01
1.2 Sistemas nanoestruturados no transporte de fármacos para o tratamento do câncer .....	03
1.3 O efeito de permeabilidade e retenção aumentada realmente facilita o direcionamento passivo de nanopartículas para o tecido tumoral?.....	06
1.4 Heterogeneidade do efeito EPR .....	08
1.5 Bases moleculares da angiogênese no processo neoplásico. ....	10
1.5.1 Angiogênese e remodelamento vascular no tecido tumoral. ....	11
1.5.2 Drenagem linfática no tecido tumoral .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>18</b>
3.1 Delineamento experimental .....	18
3.2 Procedimentos experimentais gerais para enxerto e avaliação do desenvolvimento tumoral. ....	18
3.2.1 Manutenção dos animais.....	18
3.2.2 Cultivo celular (adenocarcinoma mamário murino 4T1) .....	19
3.2.3 Cultivo celular (adenocarcinoma de Ehrlich).....	20

3.2.4	Enxerto tumoral .....	20
3.2.5	Volume tumoral e peso relativo.....	21
3.3	Dinâmica de perfusão e permeabilidade vascular.....	21
3.3.1	Análise de radiopacidade vascular por perfusão de contraste iodado.....	21
3.3.2	Protocolo para quantificação da radiopacidade vascular .....	23
3.3.3	Ensaio colorimétrico para análise de permeabilidade vascular .....	24
3.4	Análise morfológica de vasos sanguíneos tumorais .....	25
3.4.1	Análise histopatológica.....	25
3.4.2	Imunohistoquímica .....	25
3.4.3	Criofratura.....	26
3.5	Perfil de biodistribuição .....	27
3.5.1	Preparo da nanoemulsão .....	27
3.5.2	Análise da biodistribuição <i>in vivo</i> por tomografia por fluorescência molecular .....	28
3.5.3	Protocolo para quantificação de intensidade de fluorescência .....	29
3.6	Análise estatística.....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
	ANEXO I .....	60

# 1 INTRODUÇÃO

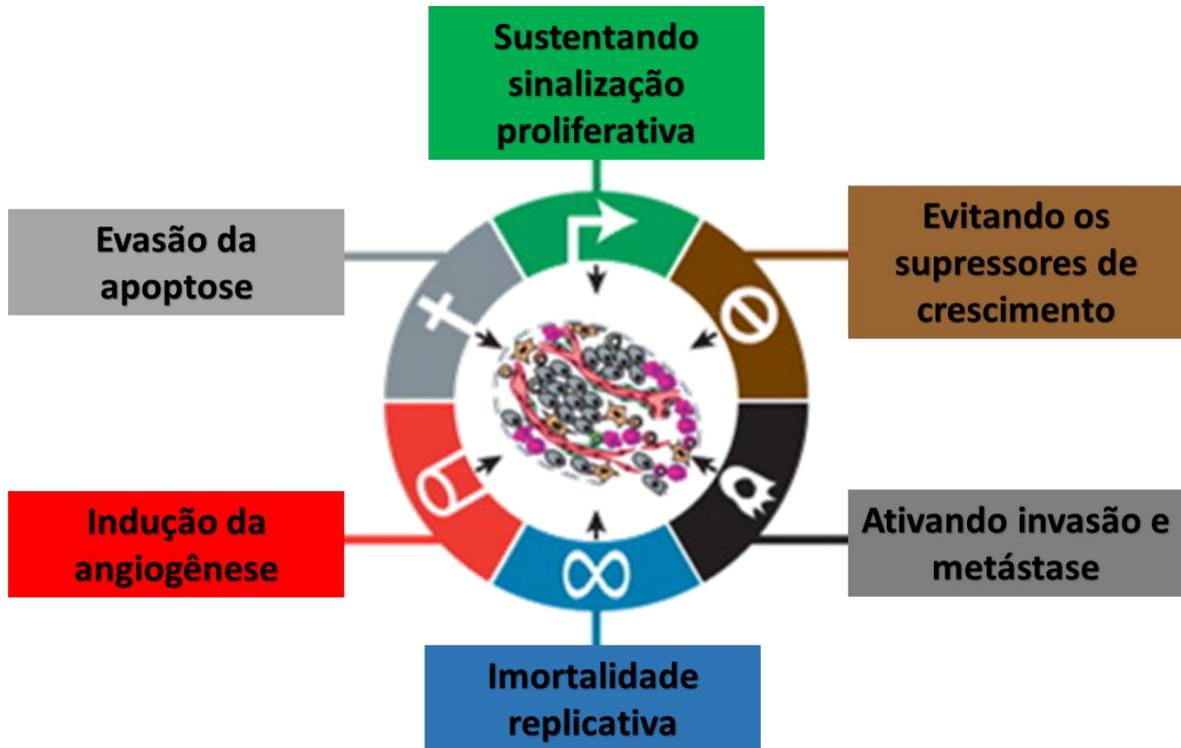
## 1.1 Câncer

O câncer é uma patologia caracterizada por um complexo de alterações que afetam a atividade molecular intracelular e também as comunicações entre as células e tecidos que acaba provocando a disseminação e proliferação descontrolada de células. O câncer é causado por fatores externos (tabaco, organismos infecciosos, substâncias químicas e radiação) e por fatores internos (mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações que ocorrem no metabolismo). Esses fatores causais podem agir juntos ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese (MARCOS, 2017; SHENG; HUANG, 2011).

O passo inicial para a carcinogênese se dá por uma invasão localizada que permite às células do carcinoma *in situ* romperem a membrana basal. Conseqüentemente, elas podem intravasos microvasos sanguíneos e linfáticos. Esses vasos podem servir de transporte para essas células para locais anatomicamente distantes, em que elas podem ficar presas e subsequentemente extravasar e formar micrometástases dormentes. Algumas micrometástases podem adquirir a habilidade de colonizar tecidos nos quais elas tenham chegado, permitindo a formação de metástases macroscópicas (BASKAR et al., 2012; BERTRAM, 2001; MARCOS, 2017; SHENG; HUANG, 2011).

O desenvolvimento do câncer compreende seis capacidades biológicas adquiridas durante sua formação (Figura 1). Essas são: sustentação da sinalização proliferativa, evitando os supressores de crescimento, resistindo à morte celular, permitindo a imortalidade replicativa, induzindo a angiogênese e ativando a invasão e a metástase. Subjacente a essas características estão a instabilidade do genoma, que gera a diversidade genética que acelera sua aquisição e a inflamação. Dentre estes, destaca-se a angiogênese como o processo através do qual o tumor

estimula a formação de novos vasos sanguíneos necessários para o fornecimento dos nutrientes essenciais para seu crescimento acelerado (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



**Figura 1: Características biológicas necessárias para progressão tumoral. Imagem adaptada de Hanahan e Weinberg, 2011.**

Dentre as formas de tratamento, tem-se cirurgia, a terapia hormonal, a quimioterapia e a terapia com radiação. No entanto, estas não são completamente seletivas no tratamento do câncer, seja ele primário e/ou metastático. Portanto, são necessárias terapias que possam auxiliar no tratamento tumoral, de modo a destruir a propagação metastática. A integração da nanotecnologia à terapia do câncer pode reduzir substancialmente o custo, aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade sistêmica localizada. Com isso, terapias utilizando sistema nanoestruturados representam em dos tratamentos que está em ascensão para a terapia contra o

câncer (BERTRAM, 2001; PETROS; DESIMONE, 2010; PRAGER; ZIELINSKI, 2013; SHENG; HUANG, 2011).

## **1.2 Sistemas nanoestruturados no transporte de fármacos para o tratamento do câncer**

A nanotecnologia é um campo relativamente novo da ciência e tecnologia que estuda materiais em dimensões nanométricas (0,1 a 1000 nm) e estes materiais ao serem utilizados em nanoescala podem apresentar propriedades diferentes das apresentadas na escala micro e macroscópicas, tais como condutividade elétrica, magnetismo, efeitos ópticos e força física. Os nanomateriais possuem aplicações em diversos campos como eletrônica, energia, meio ambiente e saúde. Dentre estes, destaca-se suas aplicações biomédicas devido ao grande potencial que apresentam para aumento da eficácia terapêutica no tratamento de diversas doenças (ANGELI et al., 2008; PRASAD et al., 2016).

Dentre os materiais nanoestruturados com aplicações biomédicas atualmente utilizados, têm-se lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e outros que podem ser utilizados como veículo para entrega de fármacos por demonstrarem uma ampla variedade de propriedades úteis, como: aumento do tempo de circulação; direcionamento específico para certos locais de doença; penetração intracelular aumentada; propriedades de contraste que permitem a avaliação da eficácia terapêutica durante o tratamento (nanoteranósticos); sensibilidade à estímulo e outros (TORCHILIN, 2009). Além disso, estas propriedades podem ser aprimoradas pela manipulação das propriedades físicas dos nanocarreadores, tais como tamanho, natureza da carga útil e características da superfície (KOBAYASHI; WATANABE; CHOYKE, 2014).

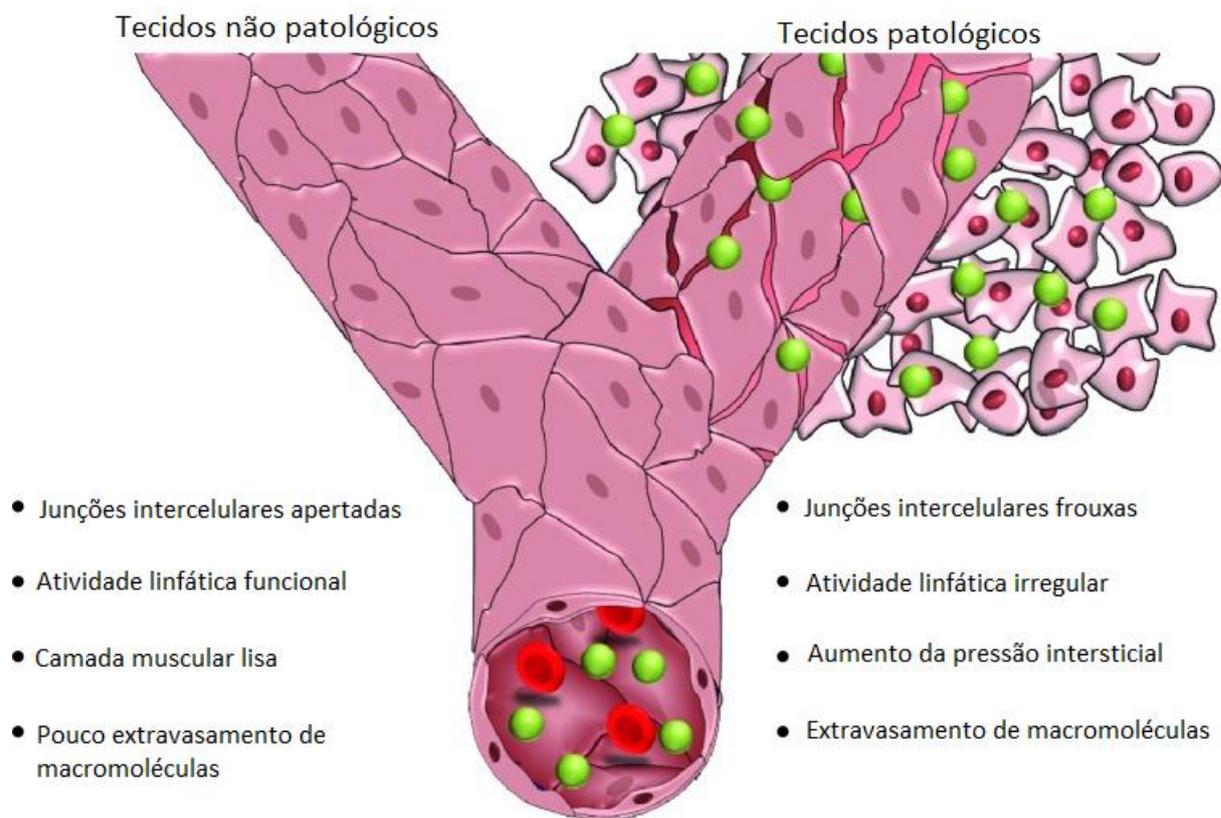
Carreadores nanoestruturados de fármacos podem atingir o tecido tumoral por meio de mecanismo de direcionamento ativo ou passivo. O direcionamento ativo é a estratégia utilizada quando se faz uso de anticorpos, peptídeos, aptâmeros de RNA e outros para ligação específica em receptores super-expressos no microambiente tumoral. Desta forma, a superfície das nanopartículas pode ser facilmente alterada, de modo a direcionar o nanocarreador especificamente para células cancerosas, resultando num direcionamento ativo dessas partículas (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

O mecanismo para direcionamento passivo é um dos princípios farmacocinéticos mais importantes para o planejamento de medicamentos macromoleculares e nanoestruturados é o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR; *do inglês enhanced permeability and retention effect*). O efeito EPR foi proposto pela primeira vez por Matsumura e Maeda em 1986 como um novo conceito para entrega de fármacos a tumores (MATSUMURA; MAEDA, 1986). Suas investigações mostraram que os vasos sanguíneos nos tumores são diferentes comparados aos vasos sanguíneos normais devido à arquitetura anormal e descontínua. A formação anormal de vasos sanguíneos junto à redução da drenagem linfática resulta neste fenômeno de vetorização passiva conhecido como efeito EPR (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; MAEDA, 2001a, 2001b; MAEDA; GREISH; FANG, 2006).

O efeito EPR considera a natureza anatômica e fisiopatológica única dos vasos sanguíneos tumorais que facilitam o transporte de carreadores nanoestruturados de fármacos para os tecidos tumorais (Figura 2). De acordo com este princípio, nanopartículas possuem biodistribuição seletiva em vasos tumorais por conseguirem passar pelas fenestrações e se acumulam nos tecidos tumorais devido a drenagem linfática irregular. Em contraste, essa distribuição de fármacos induzida pelo efeito EPR não ocorre em tecidos normais. Desta forma, em comparação com fármacos anticâncer convencionais, nanopartículas acabam apresentando perfil farmacocinético superior por exibir maior seletividade tumoral, de modo que produzem

efeitos antitumorais melhorados sem ou com menos reações adversas. Esse fenômeno único em tumores sólidos é, portanto, considerado um marco na quimioterapia para direcionamento tumoral e tornou-se uma tecnologia muito atrativa no desenvolvimento de fármacos anticâncer (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; MAEDA, 2001a, 2001b; MAEDA; GREISH; FANG, 2006; MATSUMURA; MAEDA, 1986, 1986).

O uso de nanopartículas para administrar agentes quimioterápicos no tratamento contra o câncer proporciona vantagens para melhorar a entrega de fármacos e superar muitos problemas associados à quimioterapia convencional (NGUYEN, 2011). Alguns desses materiais já entraram na clínica, enquanto outros ainda estão em ensaios pré-clínicos. Os exemplos de fármacos incorporados a sistemas nanoestruturados para uso clínico em câncer incluem a doxorrubicina lipossomal (Myocet<sup>TM</sup>, Elan Pharmaceuticals), doxorrubicina lipossomal peguilada (DOXIL<sup>®</sup>, Ortho Biotech, e Caelyx<sup>®</sup>, Schering Plough), daunorubicina lipossomal peguilada (DaunoXome<sup>®</sup>, Diatos), nanopartículas de paclitaxel conjugadas à albumina (Abraxane<sup>®</sup>, Abraxis Bioscience), entre outros (BYRNE; BETANCOURT; BRANNON-PEPPAS, 2008).



**Figura 2: Representação ilustrativa do Efeito EPR: vasculatura normal e disfuncional em processos neoplásicos** (Adaptado de Nehoff, H., 2014)(NEHOFF et al., 2014).

### **1.3 O efeito de permeabilidade e retenção aumentada realmente facilita o direcionamento passivo de nanopartículas para o tecido tumoral?**

Apesar das vantagens do direcionamento passiva, o efeito EPR vem sendo questionado nos últimos dois anos pela comunidade científica após a publicação do artigo “Analysis of nanoparticle delivery to tumours” em que os autores discutem a eficácia de entrega de nanopartículas a tumores. Neste artigo, Wilhelm e seus colaboradores, em uma meta-análise, examinaram os artigos da área dos últimos 10 anos e estimaram que a eficiência de entrega de nanopartículas é baixa pois apenas 0,7% da dose injetada de nanomateriais chega aos tecidos tumorais. Com isso, eles propõem um plano de 30 anos para estudar detalhadamente o problema

de entrega de fármacos incorporados a sistemas nanoestruturados para ajudar a melhorar a sua eficiência em ensaios clínicos (WILHELM et al., 2016).

Esse mesmo grupo de pesquisa realizou outro estudo em 2018 utilizando nanopartículas de ouro e sílica revestidas com ácido fólico e Trastuzumab (Herceptin) para avaliar se o direcionamento ativo melhora a interação de nanopartículas com as células cancerígenas. Seus resultados mostraram que apenas 0,0014% da dose injetada de nanopartículas chegaram as células neoplásicas, sendo que, apenas 2 de 100 células cancerígenas interagiram com as nanopartículas. A diferença entre o 0,7% para 0,0014% é capturada por outras células do estroma tumoral, tais como macrófagos. Isso demonstra que mesmo por direcionamento ativo, nanopartículas possuem dificuldades para atingir especificamente as células tumorais (DAI et al., 2018).

A baixa eficiência de acúmulo de nanopartículas ao tecido tumoral sugere a necessidade de reavaliar os processos e mecanismos de entrega para facilitar o desenvolvimento de estratégias para fornecer terapias que obtenham sucesso em ensaios clínicos e não apenas em modelo animal. A variação entre os resultados de estudos experimentais e clínicos estão provavelmente relacionados à ampla heterogeneidade dos efeitos EPR observados entre os tipos de tumor e nos tumores individuais (DAI et al., 2018; GOLOMBEK et al., 2018a). Visto que a entrega e acúmulo passivo de nanopartículas é dependente de efeito EPR, é necessário entender melhor como a vasculatura tumoral se comporta para que as nanopartículas projetadas possuam maior eficácia terapêutica e, conseqüentemente, maior aplicação clínica (FERRARI, 2005; YUAN et al., 1995).

#### **1.4 Heterogeneidade do efeito EPR**

A heterogeneidade do efeito EPR vem provocando debates sobre o valor real desse efeito. Isso porque muitos cientistas e pesquisadores mostram que certos tumores são difíceis de serem tratados devido à heterogeneidade do efeito EPR, já que a permeabilidade nos vasos sanguíneos pode não ser idêntica em todo tumor (GOLOMBEK et al., 2018b; (GREISH et al., 2018). De fato, tumores humanos são altamente diversificados e heterogêneos. Isso se dá porque variam em características histopatológicas, estágio de desenvolvimento, tamanho, densidade vascular, localização anatômica e entre outros. Além disso, os tumores podem variar não só apenas entre modelos animais e humanos, mas também entre tipos de tumores da mesma origem e entre tumores primários e secundários no mesmo paciente. Como consequência, o resultado clínico dos tratamentos com nanomedicina também é altamente heterogêneo e pode não ser tão bom quanto o esperado com base nos resultados pré-clínicos obtidos em estudos (GOLOMBEK et al., 2018a; MAEDA, 2015).

Vale ressaltar que o primeiro fármaco incorporado a um sistema nanoestruturado aprovado pelo FDA (Doxil<sup>®</sup>), obteve grande sucesso em ensaios clínicos no tratamento de Sarcoma de Kaposi e o êxito no tratamento foi relacionado a efeito EPR. Porém, este tipo de tumor é caracterizado por alta proliferação de estruturas vasculares, diferente de outros tumores de origem cutânea que são pouco vascularizados. Esta variação fisiológica exerce influência na distribuição passiva de nanocarreadores para tecidos tumorais, mostrando assim a necessidade de entender o comportamento biológico de cada tipo de tumor (BARENHOLZ, 2012; F LONGO et al., 2018; JAMES et al., 1994).

O fato de que o efeito EPR varia fortemente entre tumores de um mesmo indivíduos é de grande importância e podem induzir a acreditar que o direcionamento passivo mediado por EPR está ausente em pacientes, porém, isso não pode ser generalizado. Seguindo este

raciocínio, o fato de que a administração de nanopartículas possa apresentar apenas 0,7% de entrega em tecido tumoral não invalida a eficácia de tratamentos utilizando nanopartículas. Wilhelm e seus colaboradores não levaram em consideração em suas discussões a heterogeneidade do efeito EPR e a possibilidade de que 0,7% de eficiência de entrega pode ser suficiente dependendo do tratamento, pois é maior do que compostos citostáticos padrão podem normalmente alcançar (GOLOMBEK et al., 2018a).

Ademais, parte dos nanocarreadores administrados pelas vias sistêmicas podem não ser passivamente entregues para os tecidos tumorais, porém eles aumentam de maneira significativa o tempo de meia-vida dos fármacos em circulação. Esse fato, por si só é uma grande vantagem tecnológica, já que permite que doses farmacêuticas reduzidas possam ser administradas, mantendo o mesmo efeito terapêutico. Como exemplo, o quimioterápico doxorrubicina possui meia vida plasmática bastante curta, em torno de 30-60 minutos, enquanto a sua forma lipossomal apresenta meia-vida em torno de 20-30 horas. Nesse aspecto, o carreador lipossomal pode não ser diretamente absorvido pelos tecidos tumorais, mas ele podem manter uma liberação sustentada do fármaco por períodos prolongados, e este sim ser absorvido em maiores concentrações pelos tecidos tumorais (DOS SANTOS CÂMARA et al., 2017).

Outra vantagem que se pode descrever é que como os fármacos tem meia vida plasmática aumentada, eles ficam confinados aos carreadores lipossomais no sangue e reduzem a sua distribuição aos tecidos saudáveis do corpo. Nessa situação, houve redução significativa os efeitos colaterais dos quimioterápicos. Como exemplo deste fenômeno, em artigo do nosso grupo, foi possível dobrar as doses de doxorrubicina, quando esta estava associada a nanoemulsões lipídicas, e mesmo assim observamos a redução dos efeitos colaterais deste quimioterápico em modelos de tumor de mama (DOS SANTOS CÂMARA et al., 2017).

Portanto, mesmo com este paradigma de baixa acumulação passiva de nanomateriais em tecidos tumorais, vários sistemas nanoestruturados foram incorporados com sucesso na clínica e claramente criam benefício para o paciente, apesar da possibilidade de que o seu acúmulo tumoral possa ser baixo (BARENHOLZ, 2012; FORSSEN, 1997; GREEN et al., 2006). Para facilitar a eficácia clínica de fármacos incorporados a sistemas nanoestruturados e permitir terapias anticâncer mais eficientes e aperfeiçoadas, é crucial obter uma melhor compreensão sobre como o remodelamento vascular tumoral influencia na heterogeneidade do efeito EPR em pacientes.

Dentro do contexto destas discussões, nosso grupo de pesquisa tem estudado o padrão de biodistribuição de nanoemulsões lipídicas, as mesmas que serão utilizadas nesta dissertação, para tecidos tumorais. Como resultados principais deste estudo preliminar, foi observado que tanto a localização do tecido tumoral, seja ela no sítio primário ou metastático, quanto o tempo de evolução dos tumores influencia de maneira significativa o padrão de biodistribuição para os tecidos tumorais. Esses resultados preliminares comprovaram para nosso grupo que o padrão de organização do tecido tumoral pode influenciar na entrega de nanocarreadores para sítios tumorais, sendo, portanto, um tópico de interesse para a investigação para a nanomedicina (RADICCHI et al., 2018).

### **1.5 Bases moleculares da angiogênese e linfangiogênese no processo neoplásico**

O tópico de interesse desta dissertação, consistiu em estudar as variações de presença vascular e sua influencia nos processos de biodistribuição de nanoemulsões em modelos de tumor de mama. Para tanto, é necessária uma breve revisão dos conceitos relacionados a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos nos tecidos tumorais.

### 1.5.1 Angiogênese e remodelamento vascular no tecido tumoral

A angiogênese é um mecanismo fundamental para vários eventos fisiológicos e patológicos. Em condições fisiológicas, a angiogênese é um fenômeno altamente regulado e ocorre durante o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e o ciclo menstrual. A angiogênese não regulada é observada em condições patológicas, como psoríase, retinopatia diabética e câncer. A angiogênese é um processo morfogenético multicelular altamente dinâmico e complexo que é essencial durante o crescimento tumoral, visto que é um pré-requisito necessário para a oxigenação adequada, nutrição e remoção de resíduos metabólicos no local do tumor (BENTLEY; CHAKRAVARTULA, 2017; KURZ, 2000).

Os vasos sanguíneos podem proliferar por intermédio de vasos pré-existentes (angiogênese) e sofrem alterações no fenótipo (remodelamento vascular) em doenças inflamatórias, tumores e muitas outras condições crônicas. As alterações nos vasos sanguíneos recém-formados e remodelados são específicas de cada doença, pois refletem adaptações vasculares a estímulos ambientais exclusivos de cada condição (RIBATTI, 2006). Nos tumores, a configuração normal dos vasos sanguíneos é geralmente abolida. Vasos tumorais tendem a quebrar todas as regras convencionais da microvasculatura, espalhando-se com um padrão de organização diferenciado, seguindo caminhos tortuosos e mudando de diâmetro. Vasos tumorais de maior calibre podem ter paredes finas geralmente pertencentes a capilares ou uma membrana basal incompleta e um revestimento inadequado de pericitos (EBERHARD et al., 2000; HOBBS et al., 1998). Além disso, a indução da permeabilidade vascular também pode ocorrer. Esta pode ser mediada por organelas vesículo-vacuolares, pela não expressão de moléculas de adesão de células endoteliais plaquetárias (PECAM-1) e por caderinas endotelial

vascular (VE-caderina) (CARMELIET et al., 1996), que promovem uma falta de adesão entre as células endoteliais e em última instância cria um endotélio descontínuado.

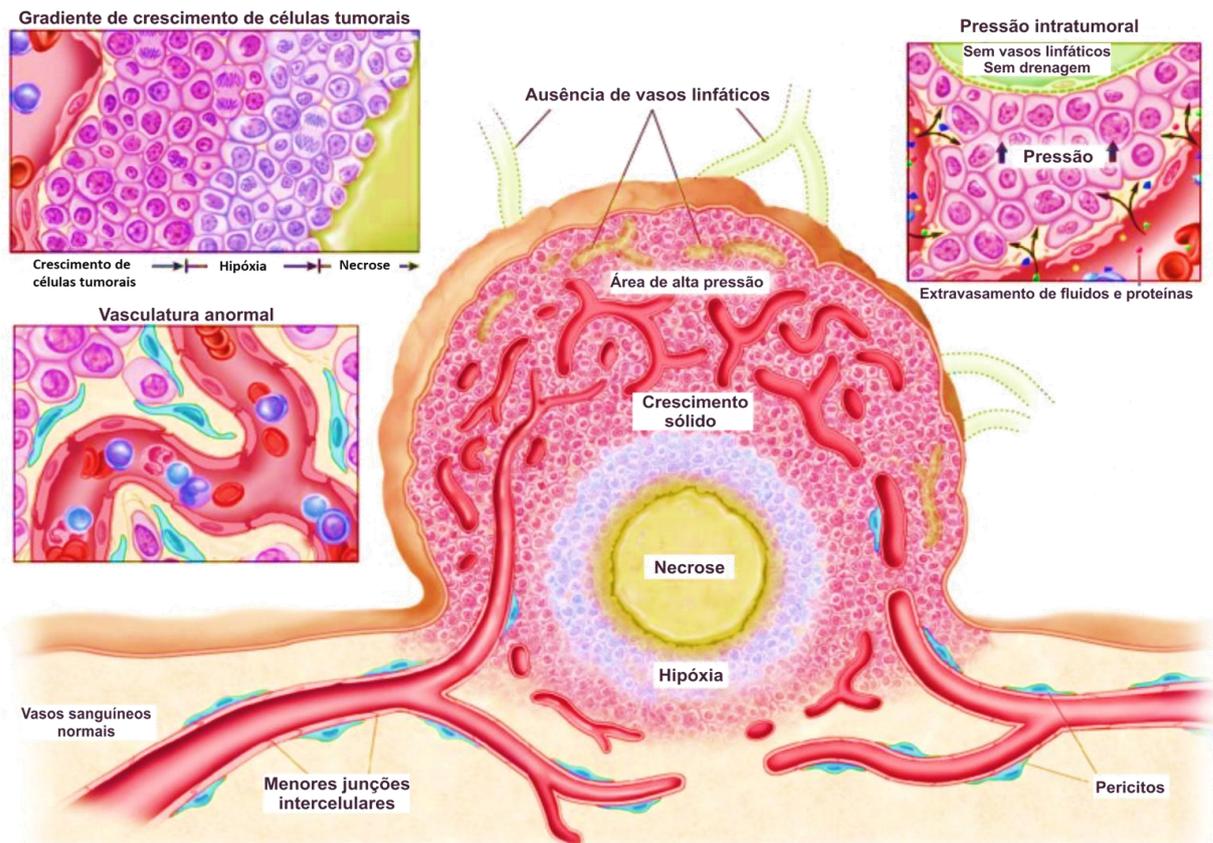
O desequilíbrio da expressão de fatores proangiogênicos como angiogenina, fator de crescimento epidérmico, estrogênio, interleucina 8, prostaglandina E1 e E2, TNF-  $\alpha$  , VEGF e fator estimulante de colônias de granulócitos são as principais causas da estrutura caótica em um tumor (BAISH; JAIN, 2000). Dentre estes, destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) uma das mais potentes proteínas sinalizadoras angiogênicas que possui capacidade de provocar permeabilidade vascular, além de promover a proliferação de células endoteliais vasculares (HASHIZUME et al., 2000; HOBBS et al., 1998).

Em 1971, Folkman foi o primeiro a relacionar o crescimento tumoral com o processo angiogênico. Neste estudo, ele gerou a hipótese de que o crescimento tumoral e as metástases dependem da angiogênese e da linfangiogênese desencadeadas por sinalizações químicas das células tumorais em uma fase de crescimento rápido e, assim, a inibição da angiogênese poderia impedir a progressão do tumor (STOCKMANN et al., 2014). Em outro estudo, Muthukkaruppan e seus colaboradores (1982) compararam o comportamento de células cancerígenas enxertadas em diferentes regiões do mesmo órgão. Uma região era a íris com circulação sanguínea e a outra era a câmara anterior sem circulação. As células cancerosas colocadas em regiões em que a angiogênese tiveram crescimento um maior (maior que 2 mm<sup>3</sup>) quando comparadas as colocadas em regiões sem circulação sanguínea (1 a 2mm<sup>3</sup>) (MUTHUKKARUPPAN; KUBAI; AUERBACH, 1982). Desde então, a angiogênese passou a ser considerada um mecanismo crucial necessário para o crescimento, nutrição adequada e remoção de resíduos metabólicos do microambiente tumoral (PRAGER; ZIELINSKI, 2013).

Em condições fisiológicas, as células estão localizadas a 100 e 200  $\mu$ m dos vasos sanguíneos, sua fonte de oxigênio. Quando um organismo multicelular está crescendo, as

células induzem angiogênese e vasculogênese para garantir o suprimento sanguíneo adequado. Em uma condição patológica, como o câncer, a formação de tumores sólidos requer a coordenação de angiogênese para garantir a sobrevivência e proliferação tumoral. No entanto, apesar dessa neovascularização, a hipóxia é persistente e frequentemente encontrada em tumores fazendo com que este microambiente seja caracterizado pela heterogeneidade na oxigenação. A hipóxia é provocada por um baixo nível de oxigênio nos tecidos, que surge no início do processo de desenvolvimento do tumor porque as células tumorais de proliferação rápida superam a capacidade de adaptação vascular. Tumores com baixa oxigenação têm um mau prognóstico, e fortes evidências sugerem que isso se deve aos efeitos da hipóxia na progressão maligna, angiogênese, metástase e resistência à terapia (GASTL et al., 1997; HORI et al., 1991).

Regiões tumorais tornam-se hipóxicas quando localizadas a mais de 100  $\mu\text{m}$  de distância dos vasos sanguíneos e esse estado pode provocar modificações fenotípicas nas células tumorais que desencadeiam diversas alterações que podem incluir a ativação de uma via angiogênica. As áreas mais vascularizadas estão mais localizadas na periferia do tumor o que leva a formação de uma região central hipóxica (Figura 3). A hipóxia aumenta a expressão de fatores pró-angiogênicos por meio do fator induzido por hipóxia  $\alpha$  (HIF-  $\alpha$ ). Se fatores pró-angiogênicos estiverem em excesso em relação a fatores antiangiogênicos, pode ocorrer a mudança para um fenótipo angiogênico. A presença de células com esse fenótipo, é provavelmente um reflexo ao desenvolvimento da tolerância à hipóxia resultante da modulação da morte celular no microambiente (FOLKMAN, 2002; HORI et al., 1991; LIOTTA; STETLER-STEVENSON, 1991).



**Figura 3: Características fisiológicas do microambiente tumoral** (Adaptado de Kobayashi, H., 2014).

O microambiente hipóxico seleciona células capazes de sobreviver na ausência de disponibilidade normal de oxigênio. No entanto, a persistência e frequência de hipóxia em tumores sólidos levantam uma segunda explicação potencial. Também tem sido sugerido que microrregiões estáveis de hipóxia podem desempenhar um papel positivo no crescimento do tumor. Embora a hipóxia iniba a proliferação celular e, eventualmente, ocasione a morte celular, a hipóxia também fornece sinais angiogênicos e metastáticos, permitindo assim a sobrevivência prolongada na ausência de oxigênio e a geração de um sinal angiogênico (DULAK; JÓZKOWICZ, 2003; WOUTERS et al., 2003).

Algumas alterações vasculares estruturais podem ser destacadas durante a angiogênese tumoral. Em capilares maduros (não-crescentes), a parede do vaso é composta por um revestimento de células endoteliais, uma membrana basal e uma camada de células chamadas

pericitos, que envolvem parcialmente o endotélio. Os pericitos estão contidos dentro da mesma membrana basal das células endoteliais e ocasionalmente fazem contato direto com eles. Fatores angiogênicos produzidos por células tumorais se ligam a receptores de células endoteliais e iniciam o processo de angiogênese. Quando as células endoteliais são estimuladas a crescer, elas secretam proteases, heparanase e outras enzimas que digerem a membrana basal ao redor do vaso (BARLOW et al., 2013; GASTL et al., 1997; PRAGER; ZIELINSKI, 2013). A degradação da membrana basal e da matriz extracelular que envolve os capilares ou vênulas é um mecanismo realizado pelas metaloproteinases da matriz, uma família de metalopeptidases secretadas pelas células tumorais e pelas células do estroma. A dissolução da matriz extracelular também permite a liberação de fatores proangiogênicos da matriz (BHUSHAN et al., 2002).

As junções entre as células endoteliais tornam-se descontínuas, permitindo a passagem de certas moléculas e outras proteínas plasmáticas pelo espaço criado e o broto recém-formado cresce em direção à fonte do estímulo. Células endoteliais invadem a matriz e começam a migrar e proliferar na massa tumoral. Neste local, as células endoteliais recém-formadas se organizam em tubos ocos (canalização) e criam nova membrana basal para estabilidade vascular. Vasos sanguíneos fundidos recém-formados formam o fluxo sanguíneo dentro do tumor. A formação do lúmen durante a canalização é conduzida por interações importantes entre as proteínas de superfície associadas à célula e a matriz extracelular (oligossacarídeos híbridos, galectina-2, PECAM-1, VE-caderina e outros). As células endoteliais ativadas também secretam fatores de crescimento que mantêm seu estado ativado e facilitam sua invasão, bem como a proliferação de células tumorais (GAMBLE et al., 1999; NANGIA-MAKKER et al., 2000; YANG et al., 1999).

### 1.5.2 Drenagem linfática no tecido tumoral

O sistema linfático é fundamental para manter o equilíbrio de fluidos no tecido, transportar células do sistema imune para os linfonodos para gerar respostas imunes adaptativas, transportar lipídios absorvidos no intestino para a circulação sanguínea e recuperar moléculas do espaço intersticial (ALITALO, 2011). Os tumores sólidos geralmente induzem uma expansão da rede linfática circundante (ALITALO, 2011; STACKER et al., 2014). No entanto, os vasos linfáticos funcionais estão restritos à margem do tumor e às regiões peritumorais que circundam o tumor. Como os tumores não possuem vasos linfáticos intratumorais funcionais, a pressão do líquido intersticial está elevada, o que pode alterar o fluxo linfático para os linfonodos que drenam o tumor e, com isso, macromoléculas que extravasam para o tecido tumoral acabam passando mais tempo retidas devido a essa ineficiência (HOSHIDA et al., 2006; PADERA et al., 2002). Além disso, embora o sistema linfático não funcione adequadamente nos tecidos tumorais, é a principal via de metástase das células tumorais para os tecidos normais. A metástase linfática é uma das consequências mais comuns da progressão do câncer e seu controle é criticamente importante (CADY, 2007).

Como foi descrito, as aberrações estruturais nos vasos sanguíneos e linfáticos tumorais corroboram para que o efeito de permeabilidade e retenção aumentada ocorra. Desta forma, a alta heterogeneidade dos tumores faz com que seja necessária uma maior compreensão do remodelamento vascular tumoral, bem como avaliar estratégias para melhorar o direcionamento tumoral de nanopartículas baseado em efeito EPR.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar a estrutura vascular tumoral em dois modelos experimentais de adenocarcinoma (adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino) na sua quarta semana de desenvolvimento e analisar sua influência na biodistribuição de nanoemulsão lipídica contendo o marcador fluorescente DiR (NEDiR).

### **2.2 Objetivos específicos**

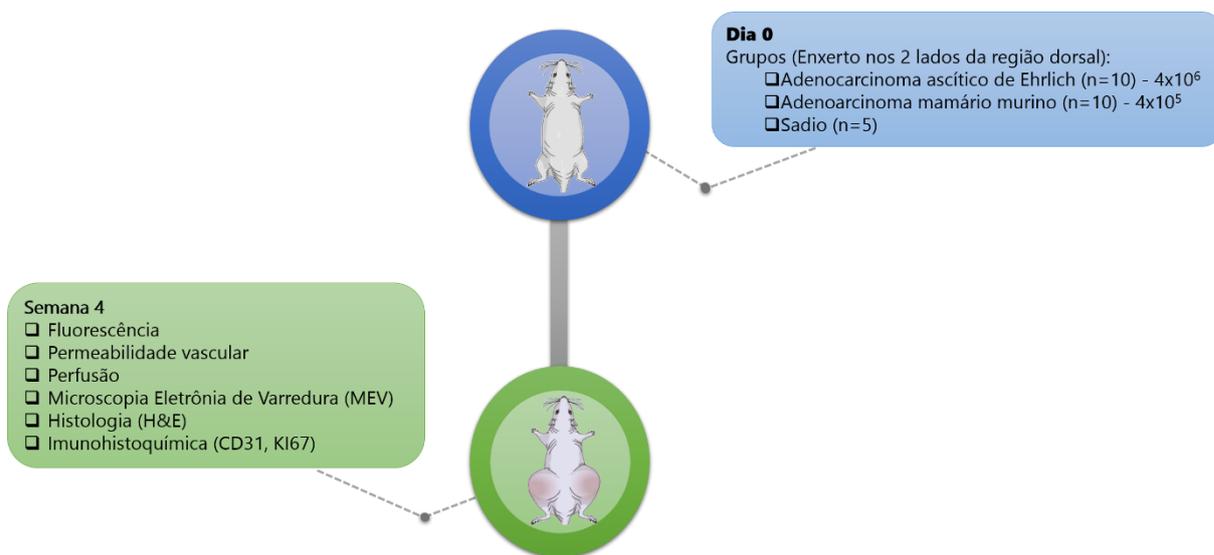
- ▣ Avaliar a dinâmica de perfusão de contraste iodado por microtomografia computadorizada e permeabilidade vascular após administração de azul de evans em dois modelos experimentais de adenocarcinoma mamário (adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino);
- ▣ Caracterizar morfológicamente vasos sanguíneos por microscopia eletrônica de varredura, histopatologia, e imunohistoquímica em dois modelos experimentais de adenocarcinoma mamário (adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino);
- ▣ Analisar o perfil de biodistribuição da nanoemulsão contendo o marcador fluorescente DiR (NEDiR) através de tomografia por fluorescência molecular em modelos

experimentais de adenocarcinoma mamário (adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino) *in vivo*.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Delineamento experimental

O presente estudo seguiu o delineamento experimental ilustrado na Figura 4.



**Figura 4:** Representação esquemática do delineamento experimental esboçando os procedimentos e grupos experimentais utilizados para a realização do estudo.

#### 3.2 Procedimentos experimentais gerais para enxerto e avaliação do desenvolvimento tumoral

##### 3.2.1 Manutenção dos animais

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Protocolo nº 24/2018 (anexo I).

Neste estudo, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (*Mus musculus*) obtidos no biotério Central da Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília - DF. Durante a realização dos experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília e todos os animais passaram por período de quarentena antes da realização dos experimentos para que se assegurasse que todos estavam saudáveis. No decorrer do período de quarentena e experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas separados em devidos grupos em estudo, com dieta com ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Os animais possuíam a mesma idade (aproximadamente 8 semanas) e apresentavam entre 25 e 30 g. Estes foram mantidos em temperatura controlada de 22 °C, umidade (50% ± 10%), ciclo circadiano automatizado (12 horas de ciclos claros/escuros) e filtragem de ar individual.

### **3.2.2 Cultivo celular (adenocarcinoma mamário murino 4T1)**

As células de linhagem de adenocarcinoma mamário murino (Tumor 4T1), foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 1% de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando atingiam confluência, eram realizados repiques para garantir a manutenção das células. Estas foram desprendidas da garrafa por ação de 0,25% de tripsina-EDTA e mantidas no meio por 3 minutos, a 37 °C. A ação da tripsina foi neutralizada com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e descartada após centrifugação. O meio de cultura foi repostado e as células foram mantidas até atingirem um número suficiente para os experimentos *in vivo*. Utilizou-se o método de exclusão por azul de tripan para estabelecer o número de células viáveis. A quantidade de células desejadas foi estimada por meio de contagem utilizando câmara de Neubauer. Os procedimentos de

descongelamento, substituição de meio de cultura e repique foram realizados em fluxo laminar previamente esterilizado juntamente com os demais materiais utilizados no cultivo celular.

### 3.2.3 Cultivo celular (adenocarcinoma de Ehrlich)

As células de adenocarcinoma de Ehrlich (Tumor de Ehrlich) foram mantidas por meio de repique em camundongos hospedeiros por meio da inoculação intraperitoneal de  $1 \times 10^6$  de células de ascite a partir de alíquotas congeladas em nitrogênio líquido. Os inóculos foram obtidos através de punção intraperitoneal de animais portando a neoplasia. Semelhante ao realizado no cultivo celular de Tumor 4T1, o número de células viáveis foi determinado pelo método de exclusão por azul de tripan (conforme descrito no tópico anterior). A concentração dos inóculos foi ajustada com tampão fosfato-salina (Phosphate Buffered Saline, PBS) estéril.

### 3.2.4 Enxerto tumoral

Para o enxerto tumoral, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com solução de cloridrato de cetamina (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Brasil) e cloridrato de xilazina (Syntec do Brasil, Ltda., Brasil) nas doses de 80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. Em seguida, realizou-se a tricotomização dos pelos da parte inferior da região dorsal e os camundongos receberam a injeção contendo as células tumorais por via subcutânea nos dois flancos. A concentração de células 4T1 inoculadas foi de  $4 \times 10^5$  em meio de DMEM sem soro fetal bovino e concentração de células de Ehrlich foi de  $4 \times 10^6$  no volume de 100 $\mu$ L em tampão PBS estéril. O grupo controle não recebeu injeção de células.

Os animais foram separados nos seguintes grupos experimentais: a) Tumor 4T1 (n=10), b) Tumor de Ehrlich (n=10) e c) grupo controle sadio (n=5). Após o enxerto tumoral, os animais foram mantidos no biotério até que se atingisse o período adequado para realização dos experimentos. Todas as análises que serão descritas a seguir foram realizadas na quarta semana de desenvolvimento tumoral.

### 3.2.5 Volume tumoral e peso relativo

O volume tumoral foi medido em cm<sup>3</sup> por meio do escaneamento das peças por microtomografia computadorizada (Modelo PET/SPECT, Albira Si, Bruker). As imagens foram feitas utilizando parâmetros de baixa resolução [CT single good, low dose (200µA), low voltage (35µA), CT quality (standard), reconstrução padrão do software] e analisadas utilizando o software PMOD 3.307 (PMOD Technologies LLC). O volume tumoral foi mensurado por meio da segmentação de toda a região da peça utilizando a faixa de 0-900 HU (Unidade de Hounsfield).

O cálculo do peso relativo foi realizado de acordo com a seguinte equação 1:

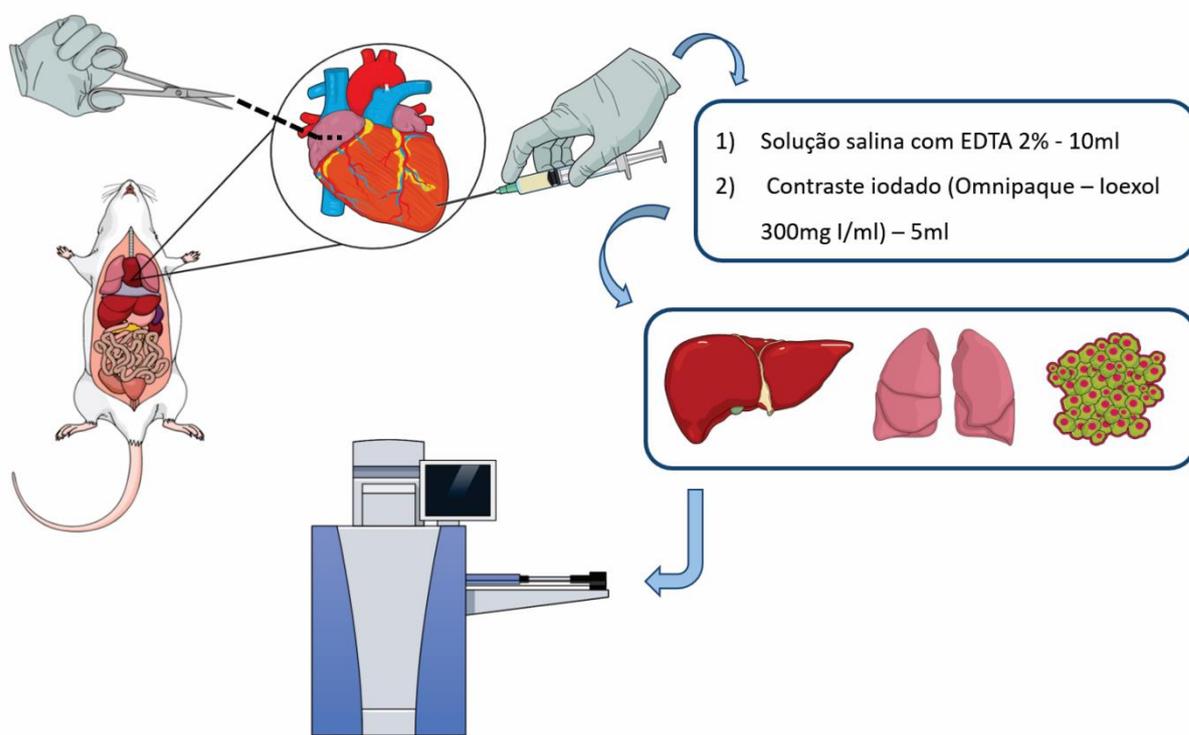
$$(1) \textit{Peso relativo} = \frac{\textit{Peso do órgão (g)}}{\textit{Peso do animal (g)}} \times 100$$

## 3.3 Dinâmica de perfusão e permeabilidade vascular

### 3.3.1 Análise de radiopacidade vascular por perfusão de contraste iodado

A radiopacidade dos vasos sanguíneos foi avaliada através da perfusão de contraste iodado (Figura 5). Uma vez que o animal foi eutanasiado com super dosagem de anestesia (solução de cetamina e xilazina), realizou-se a abertura do tórax e exposição do coração. Após isso, fez-se uma pequena incisão na extremidade posterior do átrio direito e passou-se uma

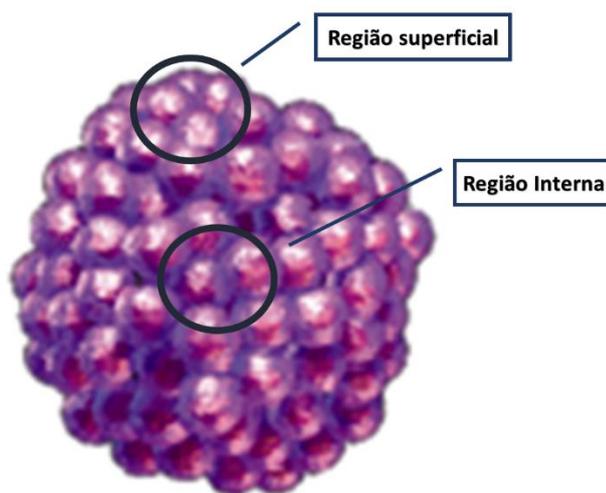
agulha (scalp calibre 19G) através do ventrículo esquerdo. A ponta foi visível através da parede da aorta e não atingiu o arco aórtico. Utilizando uma seringa, primeiro perfundi-se 10mL de uma solução salina com 2% de EDTA e depois 5 mL do contraste iodado (Omnipaque – Ioxol 300mg I/mL). Foram retirados fígado, pulmão e tumor para escaneamento por microtomografia computadorizada (Modelo PET/SPECT, Albira Si, Bruker). Órgãos de animais que não passaram pelo método de perfusão foram utilizados como controle. As imagens foram feitas utilizando parâmetros de alta resolução [CT high resolution, high dose (400  $\mu$ A), high voltage (45  $\mu$ A), CT quality (high), reconstrução padrão do software] e analisadas utilizando o software PMOD 3.307 (PMOD Technologies LLC).



**Figura 5 - Representação esquemática do método para perfusão de contraste iodado e análise de radiopacidade.**

### 3.3.2 Protocolo para quantificação da radiopacidade vascular

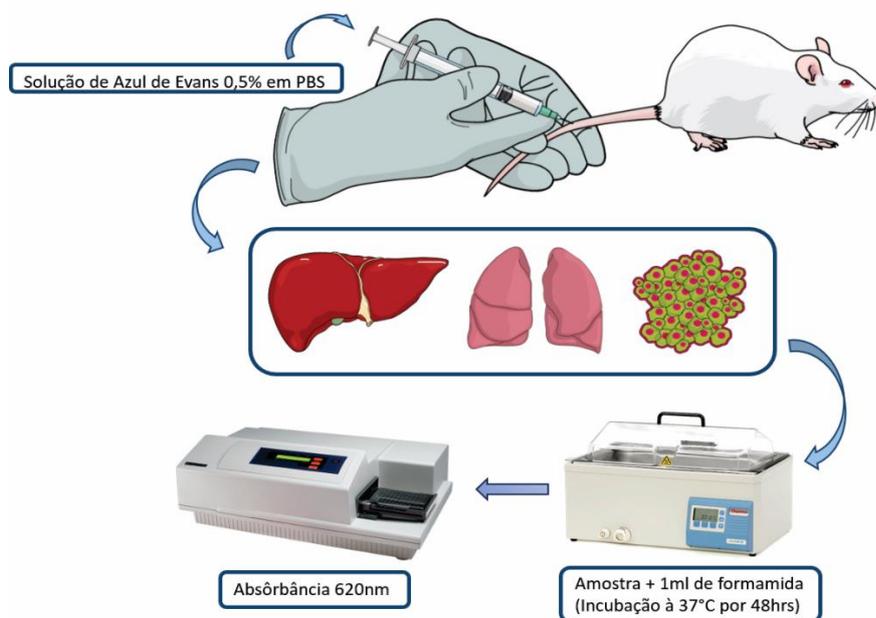
As imagens obtidas após escaneamento por microtomografia computadorizadas foram analisadas utilizando o software PMOD 3.307 (PMOD Technologies LLC) para avaliar o perfil de radiopacidade. Para isso, nas imagens de fígado e pulmão, suas extremidades foram delimitadas individualmente utilizando ferramenta para traçar a região em todos os planos (x, y e z) e, assim, obtendo-se o histograma de frequência de voxels por Unidade de Hounsfield (HU) de toda a peça analisada. Nas imagens de tumor, a região de interesse (ROI) foi traçada de maneira semelhante em regiões superficial e interna da peça para a geração de histogramas de cada região de modo a comparar a diferença de radiopacidade dos dois locais (Figura 6). Os dados das peças sem perfusão (controle) correspondem à média dos órgãos de animais com adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino que não passaram por perfusão.



**Figura 6 - Representação ilustrativa das Regiões de Interesse (ROI) superficial e interna delimitadas nos tumores para quantificação e análise de radiopacidade.**

### 3.3.3 Ensaio colorimétrico para análise de permeabilidade vascular

A permeabilidade vascular foi avaliada através de injeção intravenosa de azul de evans (Figura 7). Os animais foram colocados em dispositivo de contenção de modo que sua calda pudesse ser manuseada. Lentamente, injetou-se 200  $\mu$ L de solução estéril de 0,5% de azul de evans em PBS e fez-se o deslocamento cervical. Foram retirados fígado, pulmão e tumor para extração e quantificação de azul de evans extravasado em tecido intersticial. Para isso, os órgãos foram triturados, pesados e colocados em tubos contendo 1mL de formamida. Todos os tubos foram incubados em banho maria a 37°C por 48 horas para a extração do azul de evans do tecido. Após esse tempo a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi coletado para realizar a leitura da absorbância a 620nm em espectrofotômetro (SpectraMax M Series Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices). O azul de evans extravasado foi calculado por mg de tecido.



**Figura 7 - Representação esquemática do método para administração de azul de evans e análise de permeabilidade vascular.**

### **3.4 Análise morfológica de vasos sanguíneos tumorais**

#### **3.4.1 Análise histopatológica**

O fígado, pulmão e tumor dos animais foram fixados em paraformaldeído 4% com tampão fosfato (0,1M, pH7,4) por quatro horas a temperatura ambiente. Em seguida, foram processados de acordo com os métodos histológicos padrão conforme descrito por Longo *et al.* (2016) passando por processos de desidratação em diferentes concentrações de etanol (70 a 100%), diafanização em solução 1:1 de álcool absoluto/xilol e, também, em xilol puro. As amostras foram então incluídas e emblocadas individualmente em parafina.

Os cortes de 5µm foram feitos utilizando o micrótomo Leica modelo RM2125RT (Leica Alemanha). As secções foram distendidas, previamente, em álcool 30% e, depois, em banho-maria a 40°C, para serem coletadas com lâminas de vidro. Estas foram mantidas, overnight, em estufa a 37°C. Após este período, os cortes passaram por um processo de desparafinização, hidratação, desidratação e corados utilizando hematoxilina e eosina, obtendo assim, a lâmina pronta para análise. Todas as lâminas foram analisadas e fotografadas no microscópio Invitrogen EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

#### **3.4.2 Imunohistoquímica**

Após constatação da qualidade dos blocos de parafina, novos cortes foram realizados para a análise imuno-histoquímica. Esta análise foi realizada com a identificação dos antígenos relacionados aos anticorpos monoclonais CD31 e KI67. Os cortes histológicos foram confeccionados com espessura de 3µm e dispostos em lâmina silanizadas. O material foi submetido a desparafinização através do uso de xilol, seguido de hidratação com concentrações decrescentes de etanol (100% a 70%). O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com

peróxido de hidrogênio a 3% em duas incubações, sendo cada uma por 15 minutos à temperatura ambiente.

A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (0,21 g/L de ácido cítrico, pH: 6) em panela de pressão por 5 minutos, iniciando a contagem de tempo após o momento em que a panela atingiu a pressão. As ligações inespecíficas foram bloqueadas utilizando leite em pó a 3% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram, então, para a câmara úmida onde foram incubadas com o anticorpo overnight (12 horas) a 4 °C. As secções foram então incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação findou após o uso do cromógeno diaminobenzidina (DAB), seguida pela substância de contra-coloração hematoxilina. Foram feitos banhos em álcool e xilol para desidratação. Somente as regiões coradas em marrom foram consideradas positivas. Todas as lâminas foram analisadas e fotografadas no microscópio Invitrogen EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

### 3.4.3 Criofratura

A criofratura é um método de microscopia eletrônica em que as amostras passam por congelamento rápido seguido de um corte ou fratura do mesmo a uma temperatura muito baixa (Figura 8). Para realizá-la, as amostras de fígado, pulmão e tumor foram congeladas em nitrogênio líquido e fraturadas com um único impacto. Os fragmentos foram colocados em solução de tetróxido de ósmio 1% por 1 hora e depois desidratadas em diferentes concentrações de cetona (30% a 100%). Logo após, passaram por 3 banhos em CO<sub>2</sub> para secagem em ponto crítico e dispostas em fitas de carbono fixas em stubs com a região fraturada exposta. As amostras foram metalizadas e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Jeol – Japão.

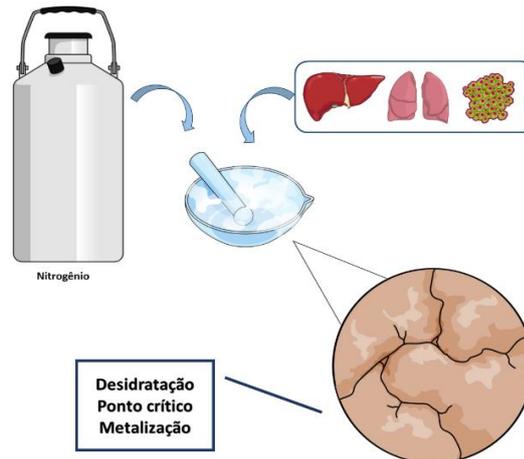


Figura 8 - Representação ilustrativa do método de criofratura.

### 3.5 Perfil de biodistribuição de

#### 3.5.1 Preparo da nanoemulsão

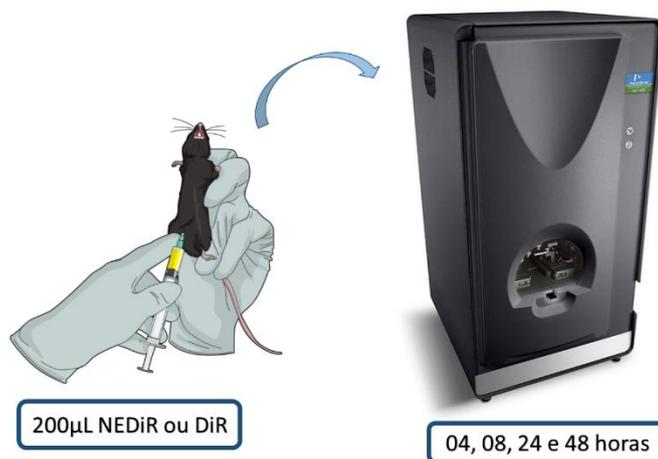
A nanoemulsão (NE) foi obtida de acordo com o método de autoemulsificação descrito por MUEHLMAN *et al.* (2015). Para o preparo, utilizou-se 360 mg de Cremophor e 120 mg de óleo de rícino. Esta fase oleosa foi mantida por agitação por 10 minutos e, após este período inicial, adicionou-se 5mL de PBS estéril e agitou-se novamente por 20 minutos. A quantificação do espalhamento dinâmico da luz (DLS) e potencial zeta, bem como avaliação da estabilidade coloidal desta nanoemulsão foram avaliados em estudos anteriores já publicados (MUEHLMANN *et al.*, 2015; RADICCHI *et al.*, 2018). NE se manteve estável por um ano sob diferentes condições de armazenamento.

O fluoróforo XenoLight DiR<sup>®</sup> (1,10-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine Iodide/PerkinElmer) foi adicionado antes de cada administração. A solução de DiR foi diluída em solução etanólica de PBS a 1% (DiR a 1 mg mL<sup>-1</sup>). Todas as formulações à base de DiR foram preparadas e mantidas sob agitação magnética durante 10 minutos imediatamente antes

da administração no animal por injeção intraperitoneal (equivalente a DiR igual a  $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ), seguindo dosagem e posologia semelhante ao nosso estudo anterior (RADICCHI et al., 2018).

### 3.5.2 Análise da biodistribuição *in vivo* por tomografia por fluorescência molecular

Na quarta semana de desenvolvimento do tumor, os animais com enxerto de Tumor 4T1 e Tumor de Ehrlich foram divididos em dois grupos. Os animais passaram por leitura inicial a fim de verificar a presença de sinal de fluorescência nas regiões de análise e, logo após, receberam por via intraperitoneal  $200 \mu\text{L}$  de solução de NEDiR ou DiR ( $0,8 \text{ mg/kg}$ ). Depois disso, a intensidade de fluorescência foi avaliada nos tempos de 04, 08, 24 e 48 horas após a administração (Figura 9).



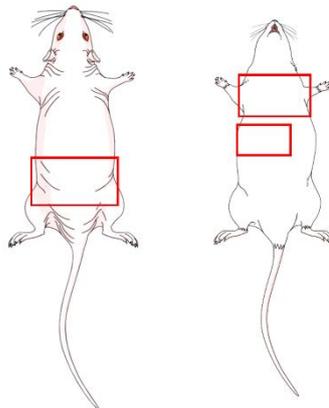
**Figura 9 - Representação ilustrativa da obtenção de imagens para mensuração da intensidade de fluorescência por tomografia por fluorescência molecular.**

A avaliação da intensidade de fluorescência foi realizada utilizando um tomógrafo de fluorescência no infravermelho próximo (Perkin-Elmer modelo FMT 4000). O aparelho consiste em uma câmara escura onde o animal é anestesiado com inalação de isoflurano e posicionado em um cassete que é inserido no aparelho. As leituras foram realizadas utilizando laser de  $80\text{mW}$  do canal  $750\text{nm}$  com detectores na base próximo ao laser para medir a

reflectância afim de gerar uma imagem de referência. Por fim, um filtro e uma câmera ccd fazem a captura da imagem final. Estas imagens foram analisadas e quantificadas utilizando o software de imagem TrueQuant.

### 3.5.3 Protocolo para quantificação de intensidade de fluorescência

No experimento, obteve-se tomografias 2D dos camundongos em diferentes tempos, para demonstrar quantitativamente a biodistribuição de NEDiR e DiR livre. Em todos os tempos analisados, foram realizadas 2 leituras em cada animal para quantificar nas regiões onde se localizam o pulmão e fígado (região ventral) e região onde se localiza os tumores (região dorsal) (Figura 10). Para tanto, a quantificação usando o software TrueQuant foi feita através do uso da ferramenta para delimitar a região de interesse (ROI) nos locais desejados. O dado obtido é expresso como contagem/energia em cada um dos tempos analisados.



**Figura 10 - Representação ilustrativa das Regiões de Interesse (ROI) delimitadas em áreas de pulmão, fígado e tumor para quantificação e análise de intensidade de fluorescência.**

### **3.6 Análise estatística**

Os resultados foram analisados no software GraphPad Prisma<sup>®</sup> 7.0 e foram submetidos a testes estatísticos específicos com confiança estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). Diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes Two-way ANOVA, de uma ou de duas vias, aplicando pós-testes de múltiplas comparações de Tukey's. Os resultados quantitativos foram descritos como média  $\pm$  erro padrão.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grande desenvolvimento da nanomedicina para oncologia se deu com a descrição do efeito EPR, onde macromoléculas e nanopartículas podem ter acesso ao espaço intersticial do tumor e permanecem retidas por mais tempo devido a ineficiência de drenagem linfática. Por mais que esta premissa tenha sido base das plataformas em nanotecnologia para entrega de fármacos aos tumores, o sucesso clínico de fármacos desenvolvidos utilizando esta abordagem tem sido dificultado pela heterogeneidade tumoral.

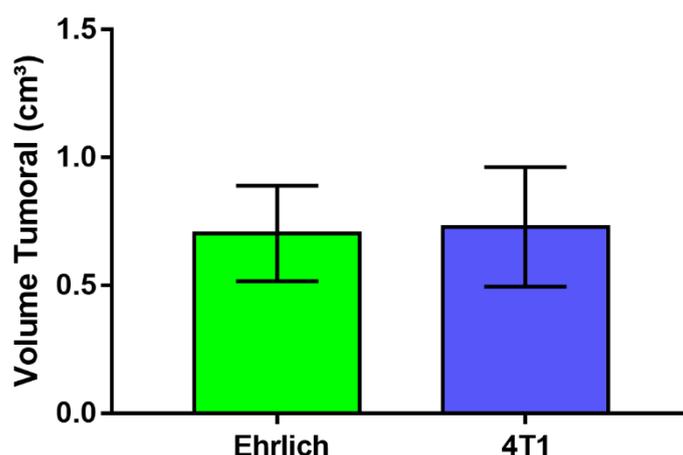
Considerando a alta heterogeneidade do efeito EPR entre pacientes individuais, a escolha da melhor estratégia para o tratamento antitumoral depende do quanto se sabe sobre o comportamento biológico individual de cada tumor já que a diferença nos níveis de efeito EPR levará a resultados terapêuticos muito diferentes. Por conseguinte, a seleção do melhor protocolo para tratamento pode ser realizada por imageamento. A utilização de imagens para a realização de análises proporciona a possibilidade de avaliar a resposta ao tratamento em tempo real e facilita intervenções terapêuticas durante o tratamento para melhorar o prognóstico do paciente. Algumas técnicas não-invasivas podem ser utilizadas para visualizar e quantificar o direcionamento do tumor mediado por EPR, dentre estas, destacasse as de maneira indireta (KEEREWEER et al., 2012; MAEDA; NAKAMURA; FANG, 2013).

A maneira indireta de utilizar imageamento para facilitar o direcionamento tumoral baseado em efeito EPR é analisar as características dos tumores e avaliar como estas se correlacionam com acúmulo passivo de nanomedicamentos. Alguns estudos pré-clínicos utilizam desta estratégia para examinar os principais parâmetros que envolvem o efeito EPR e entender como estes interferem na eficácia do tratamento. Assim, parâmetros vasculares de imagem podem ser úteis para compreender melhor a individualidade do microambiente tumoral e como isso pode ser utilizado para a escolha da estratégia terapêutica mais adequada para

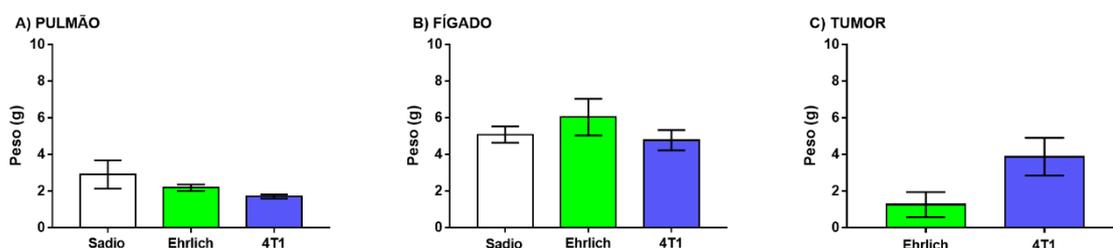
facilitar a aplicação clínica de nanocarreadores contendo fármacos (EHLING et al., 2014; THEEK et al., 2014).

Considerando as possíveis abordagens para se superar a heterogeneidade do efeito EPR, tanto para compreender as características estruturais do tumor quanto para correlacioná-las com a nanotecnologia, estudos devem ser voltados para compreender melhor a administração de fármacos baseadas em princípios nanotecnológicos e possibilitar seu uso clínico para tratamento de pacientes com câncer. Com isso, este trabalho se propôs a utilizar técnicas de imageamento para compreender melhor o remodelamento vascular tumoral e como sua variabilidade influencia na biodistribuição de nanomateriais.

Para este estudo, foram realizados enxertos de dois tipos de adenocarcinomas diferentes (Tumor de Ehrlich e Tumor 4T1) nos flancos inferiores de cada animal com a intenção de compreender melhor como os vasos sanguíneos se comportam na quarta semana de desenvolvimento e porquê as características estruturais vasculares contribuem para que a biodistribuição de nanopartículas seja maior em estágio tumoral mais avançado. Em todos os animais foi avaliado o volume tumoral para analisar se o crescimento tumoral ocorreu de maneira homogênea nas duas linhagens de adenocarcinoma. As Figuras 11 e 12 mostram os resultados relacionados a medição de volume tumoral e peso relativo dos órgãos, respectivamente, dos animais de estudo.



**Figura 11: Variação do volume tumoral de camundongos Balb/C fêmeas.** Os dados referentes a Ehrlich (cor verde) e 4T1 (cor azul) correspondem a adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino, respectivamente. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

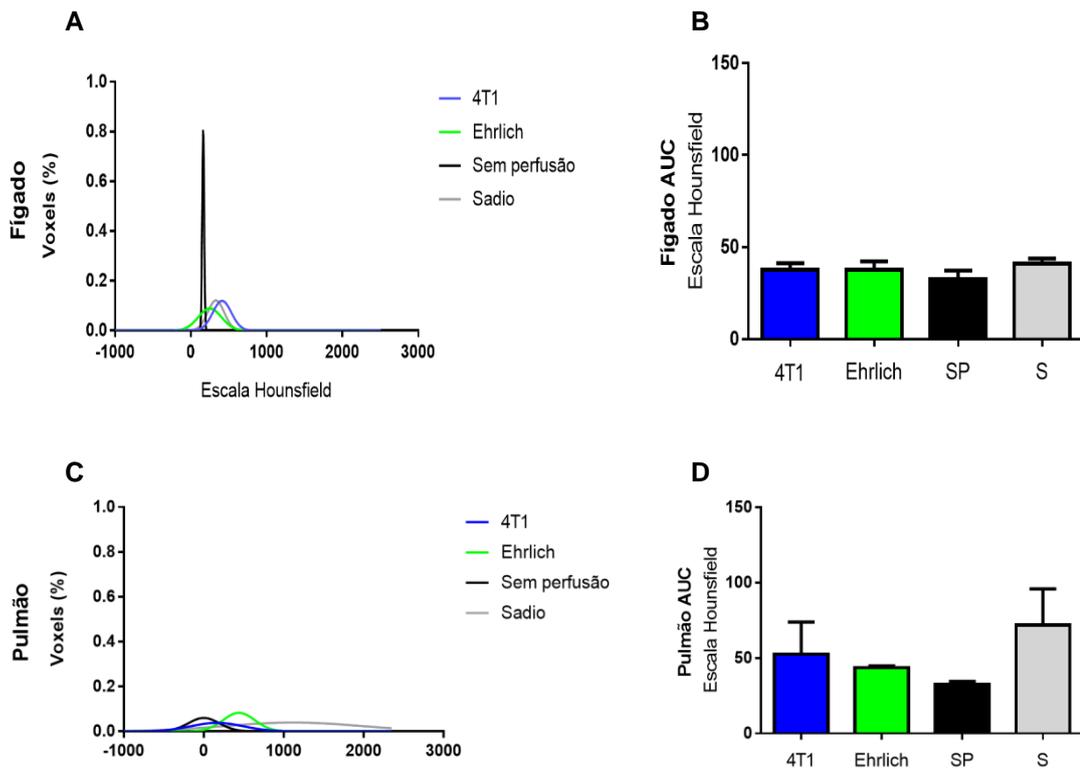


**Figura 12: Variação do peso do pulmão (A), Fígado (B) e tumor (C) de camundongos Balb/C fêmeas.** Os dados referentes a Ehrlich (cor verde) e 4T1 (cor azul) correspondem a adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino, respectivamente. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

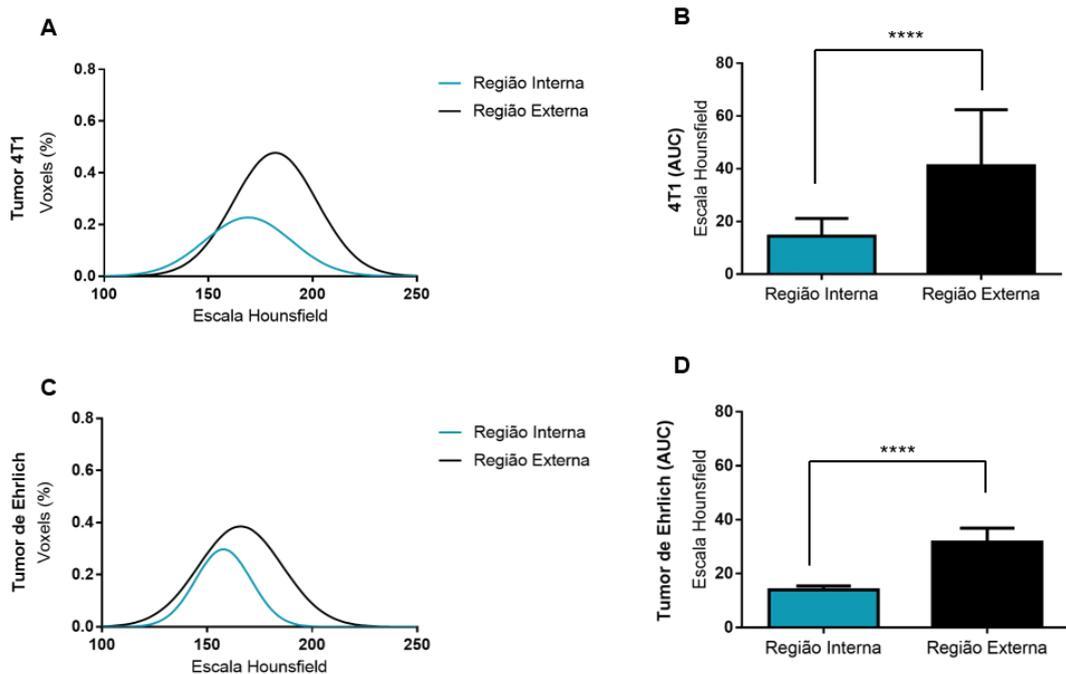
De acordo com os dados obtidos da avaliação de volume (Figura 11) e peso tumoral (Figura 12), as linhagens não apresentaram diferença estatística em relação ao volume e apresentaram apenas uma leve variação quanto ao peso, demonstrando que estas exibiram desenvolvimento semelhante e crescimento uniforme. Desta maneira, as diferenças apresentadas na dinâmica de perfusão e permeabilidade são relacionadas ao comportamento vascular dos tumores e não a diferenças de desenvolvimento tumoral entre os tipos de adenocarcinoma.

O teste de perfusão de contraste iodado foi realizado para avaliar o perfil de radiopacidade vascular e dinâmica de perfusão do iodo. Com esta técnica, pôde-se observar a diferença de perfusão entre os órgãos (Figura 13) e em regiões interna e externa de tumores (Figura 14) de camundongos portando tumor de Ehrlich e tumor 4T1. Este dado foi analisado e expresso como percentual de voxels (menor unidade 3D da imagem) por valores de atenuação da microtomografia computadorizada demonstrados de acordo com uma escala de densidade linear como “unidades de Hounsfield” (HU). A Escala Hounsfield é uma escala quantitativa que descreve a radiodensidade dos materiais através transformação da medida original do coeficiente de atenuação linear para uma escala dimensional (BROOKS, 1977). Nos gráficos, quanto maior o deslocamento para a direita maior o perfil de radiopacidade vascular do órgão, ou seja, maior foi a captação de iodo durante a perfusão. Os dados obtidos demonstram que as peças sem perfusão apresentaram menor radiodensidade em comparação com as outras peças, demonstrando que o método de perfusão de contraste iodado foi realizado com sucesso para contrastação vascular (Figura 15).

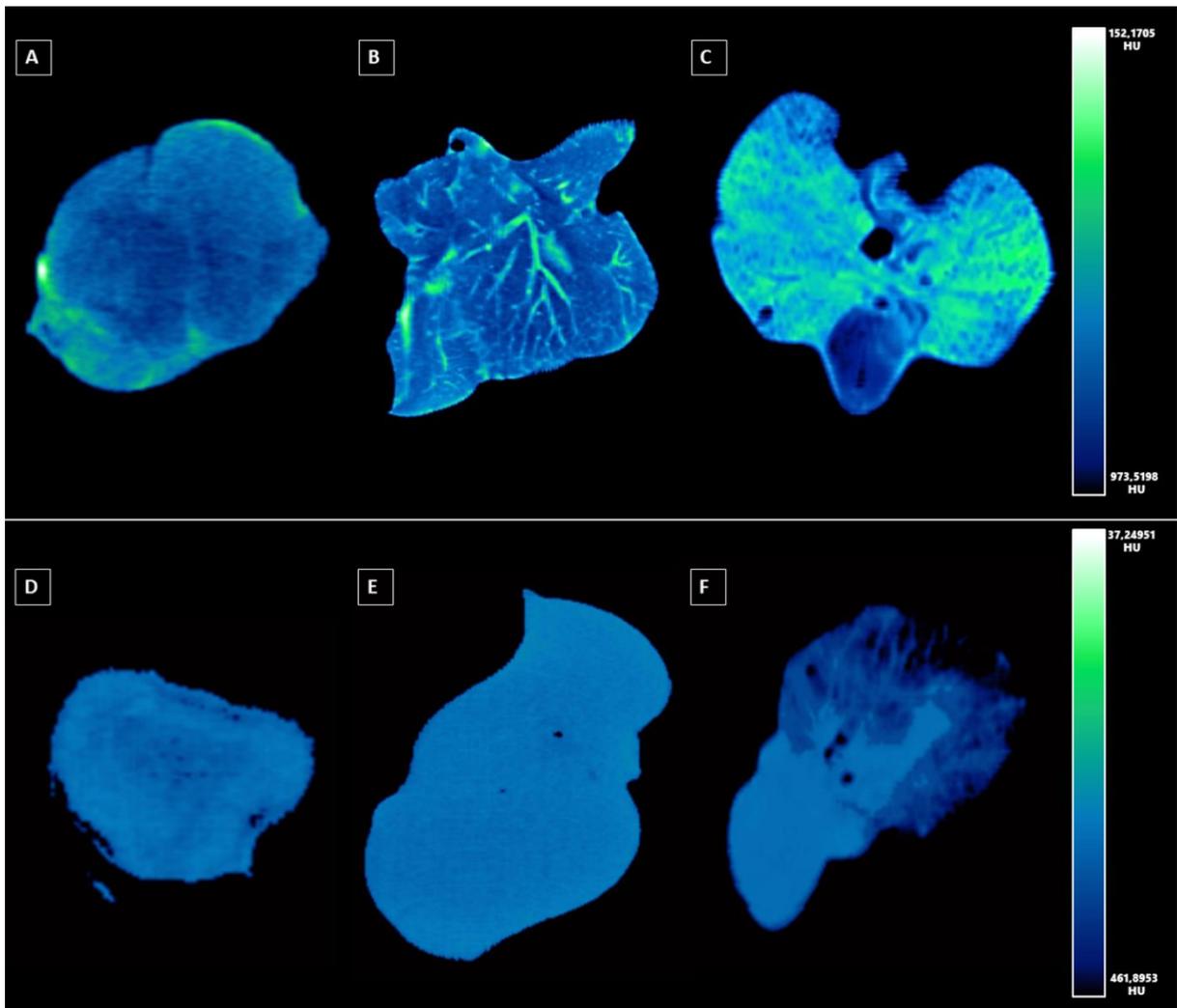
Animais portadores de tumor de Ehrlich apresentaram menor perfusão em fígado e pulmão em comparação com os animais portadores de tumor 4T1 (Figura 13). Isso pode ser relacionado ao perfil mais agressivo demonstrado por tumores de Ehrlich que possivelmente provoca maior incidência de metástase em fígado e pulmão dificultando a perfusão nestas áreas (MIRANDA-VILELA et al., 2014). As regiões externa e interna dos tumores também foram comparadas quanto ao seu perfil de radiopacidade vascular (Figura 14).



**Figura 13: Análise de perfusão vascular de fígado (A) e pulmão (C) de camundongos Balb/C fêmeas e suas respectivas área sob a curva (B e D).** O dado sem perfusão (Cor preta) corresponde à média de adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino sem perfusão de contraste iodado. Os dados referentes a Ehrlich (cor verde) e 4T1 (cor azul) correspondem a adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino, respectivamente.



**Figura 14: Análise de perfusão vascular em regiões externa (cor preta) e interna (cor verde) de tumores de camundongos Balb/C fêmeas portando adenocarcinoma mamário murino (A), adenocarcinoma de Ehrlich (C) e suas respectivas área sob a curva (B e D).** Subscrito \*\*\*\* significa  $p < 0,05$ .



**Figura 15:** Imagem representativa das amostras de tumor (A após perfusão e D sem perfusão), fígado (B após perfusão e E sem perfusão) e pulmão (C após perfusão e F sem perfusão) de camundongos Balb/C fêmeas. Regiões de coloração esverdeada demonstram as áreas de perfusão de contraste iodado e, portanto, maior radiodensidade.

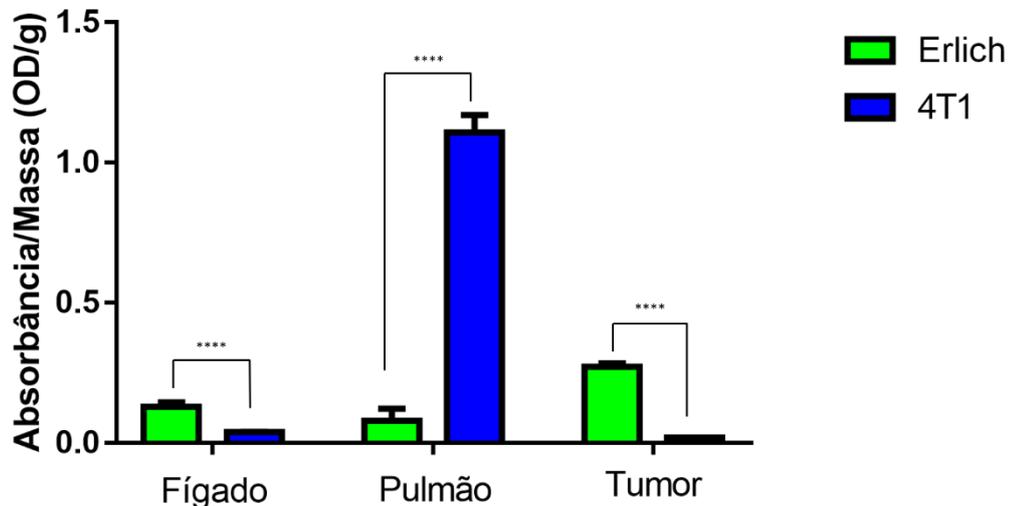
Diferente do pressuposto de que o microambiente tumoral apresenta comportamento homogêneo, há heterogeneidade significativa dentro e entre os tipos de tumor. Os dados obtidos através da dinâmica de perfusão de iodo (Figura 14), indicaram que dentro de um mesmo tumor há diferenças de vascularização de maneira que área externa mostrou maior radiopacidade e, portanto, mostrou ser mais vascularizada que áreas internas (correspondente a regiões necróticas). Este dado demonstra que regiões internas (indicativas de necrose) são menos vascularizadas que regiões superficiais.

Esta diferença de densidade vascular entre regiões superficiais e internas pode ser explicada devido à proliferação acelerada das células tumorais que não são capazes de induzir a angiogênese suficiente para suportar esta proliferação acelerada. Um efeito direto disso é a redução das tensões de oxigênio nas regiões mais centrais, formando ilhas de tecido central hipóxicas. Essa característica, típica dos tumores em modelos experimentais, gera algumas consequências fisiológicas, tais como uma quebra nos controles de pH teciduais, gerando áreas internas mais ácidas, pela baixa tensão de oxigênio e alta tensão de gás carbônico.

Além disso, por estar tentando sobreviver a este ambiente hipóxico, as células passam a expressar fatores induzidos por hipóxia, tais como o HIF (FOLKMAN, 2002; HORI et al., 1991; LIOTTA; STETLER-STEVENSON, 1991). Este fator de transcrição ativa uma série de vias metabólicas, entre as quais induz a expressão do VEGF, principal proteína sinalizadora para a formação de novos vasos, induzindo o processo de angiogênese. Porém, essa super expressão de fatores angiogênicos acaba por produzir vasos sanguíneos defeituosos, com presença de poros vasculares aberrantes. Ademais, a grande proliferação celular intratumoral pode provocar a compressão dos vasos em regiões mais internas, fazendo com que essas áreas sejam menos perfundidas.

O teste utilizando azul de evans (Figura 16) demonstra a dinâmica da albumina em relação permeabilidade vascular (RADU; CHERNOFF, 2013). Ao entrar na corrente sanguínea, o azul de evans se combina à albumina plasmática formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial de acordo com a presença e tamanho das fenestrações vasculares. Os resultados provenientes deste teste demonstraram maior permeabilidade em pulmões de animais portadores de tumor 4T1, mostrando que a maior presença de metástase em animais portadores de tumor de Ehrlich realmente dificulta a perfusão

nessa região. Assim, o aumento da permeabilidade vascular pode ser quantificado através do extravasamento do corante para o espaço intersticial. O resultado obtido demonstrou que semelhante ao resultado de perfusão, pulmões de animais portando tumor de Ehrlich apresentaram menor permeabilidade e que a região hepática apresentou pequena diferença entre os dois tipos de adenocarcinoma. Já em relação aos tumores, tumor de Ehrlich se mostrou significativamente mais permeável do que tumor 4T1, mostrando que os dois modelos tumorais localizados em região anatômica semelhante e em mesmo estágio de maturação exibem diferença de permeabilidade vascular.

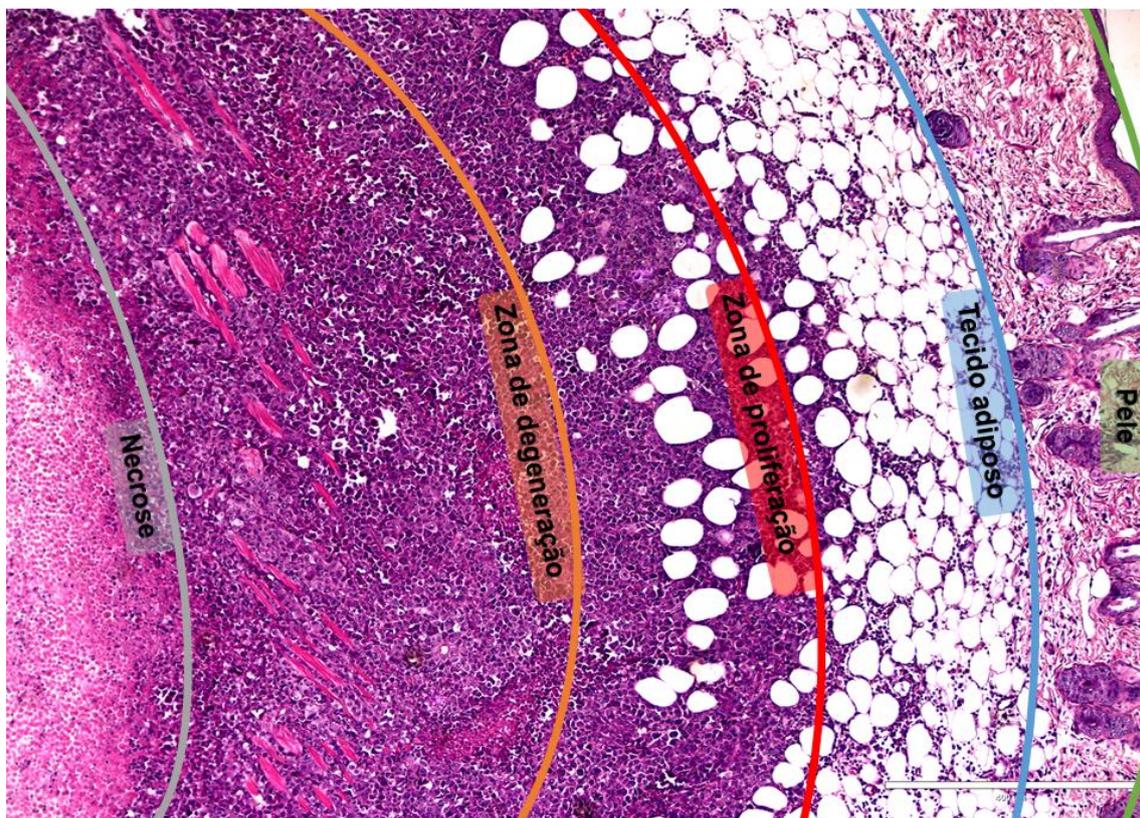


**Figura 16:** Análise de permeabilidade vascular de pulmão, fígado e tumor de camundongos Balb/C fêmeas portadoras de adenocarcinoma ascítico de Ehrlich (cor verde) e adenocarcinoma mamário murino (cor azul). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Subscrito \*\*\*\* significa  $p < 0,05$ .

Em estudo realizado por Chen *et al.*, 2017 (CHEN et al., 2017), a permeabilidade vascular de três modelos experimentais de tumor após a administração de azul de evans (INS-1: Insulinoma murino; UM-SCC-22B: adenocarcinoma de células escamosas; U-87 MG: Glioma humano) foi avaliada através da comparação de diferentes métodos. A permeabilidade vascular em modelo U-87 MG após extração e quantificação de azul de evans por ensaio colorimétrico semelhante ao utilizado neste estudo, mostrou que mesmo os grupos controle

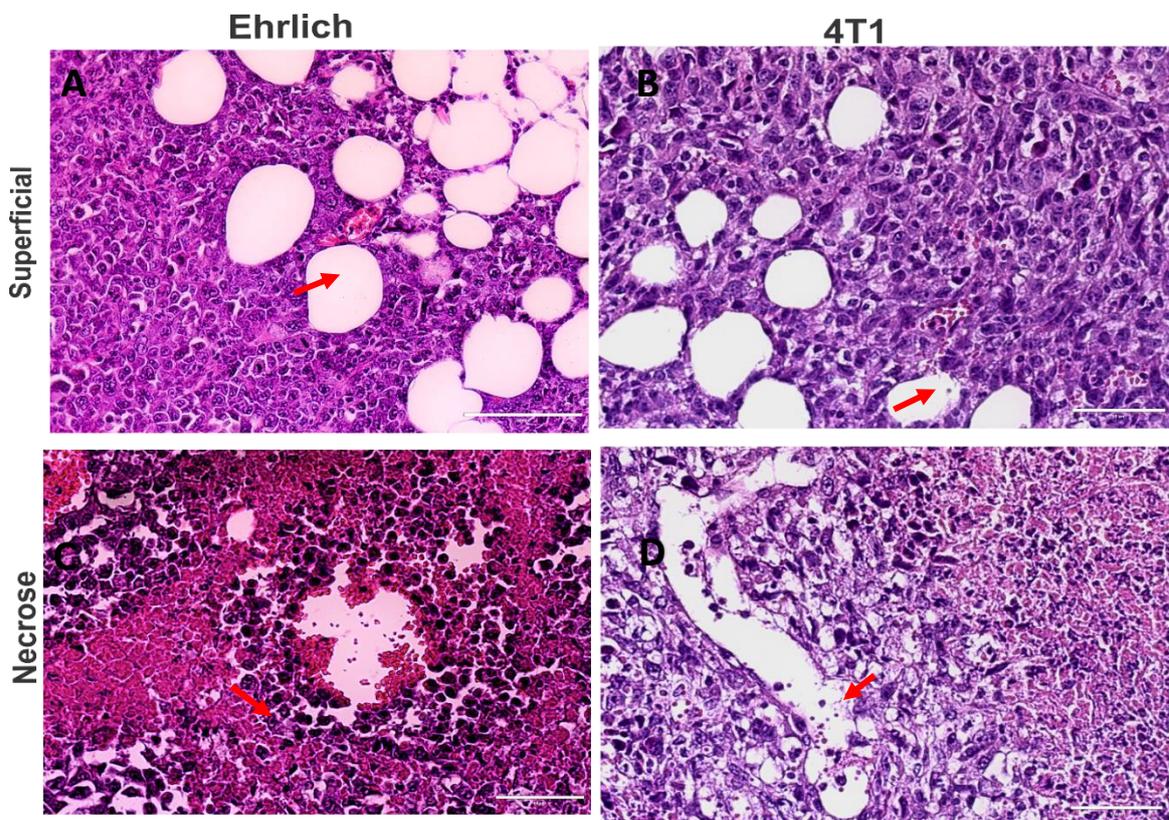
(sem tratamento) apresentaram diferenças de permeabilidade ao longo do tempo de análise (8h, 1d, 4d e 7d) mostrando que a própria individualidade do microambiente tumoral pode influenciar este parâmetro.

Para entender este perfil de permeação diferenciado, realizamos a análise morfológica dos tecidos tumorais por meio de análise das microscopias de luz e microscopia eletrônica de varredura. Os focos principais da análise foi entender a distribuição e a estrutura de vasos e capilares, sanguíneos e linfáticos, nos tecidos dos diferentes modelos tumorais estudados. Além disso, procuramos entender as diferenças entre as regiões mais internas e externas ou superficiais. Estas duas regiões teciduais representam as áreas de necrose espontânea e de tecido em proliferação, que em teoria estariam com baixa e alta tensão de oxigênio, respectivamente (KOBAYASHI; WATANABE; CHOYKE, 2014) (Figura 17).

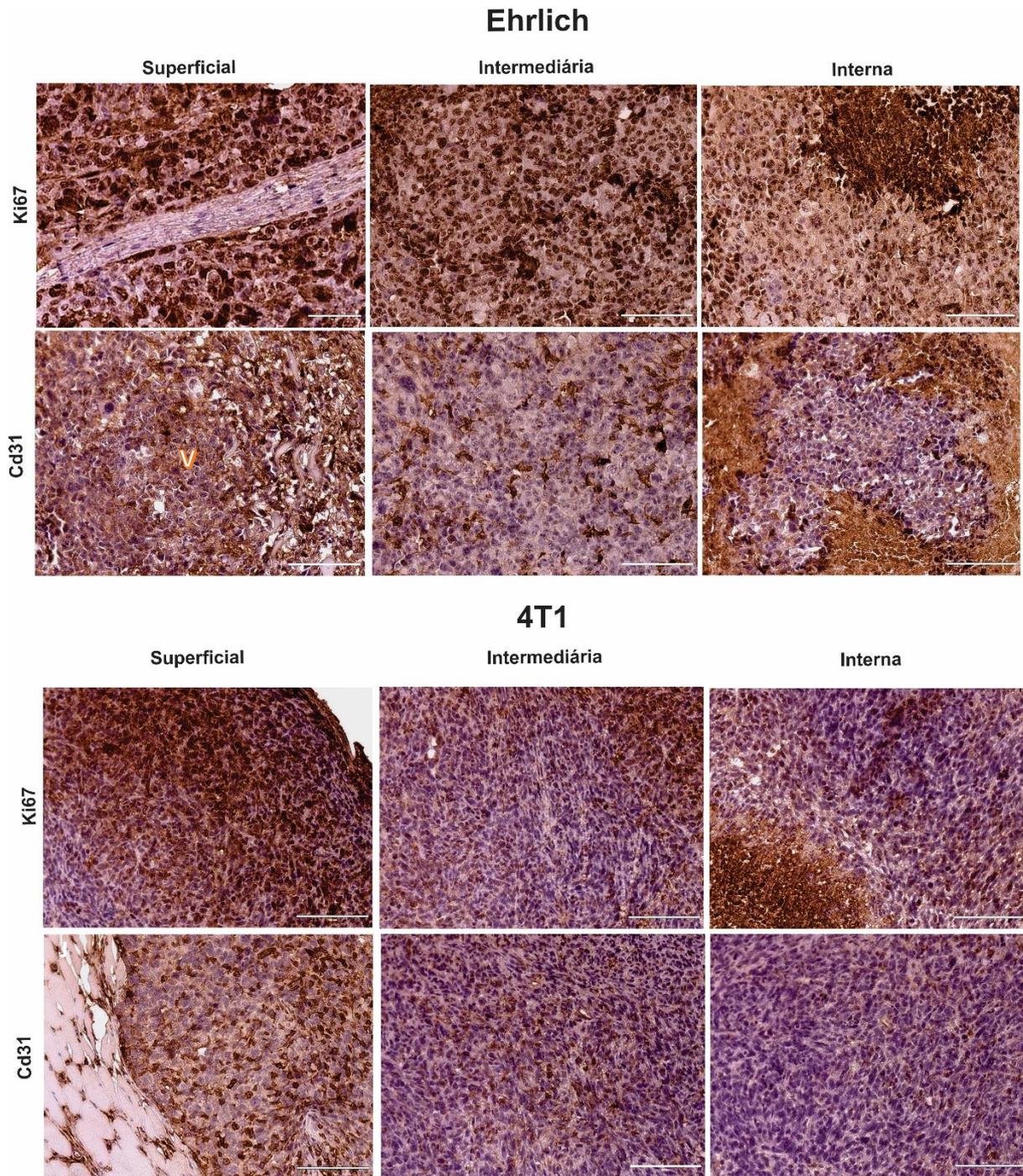


**Figura 17: Fotomicrografia representando as diferentes regiões do tecido tumoral.** Na imagem são vistas as regiões referentes a tecido epitelial (verde), tecido adiposo (azul), zona de proliferação (vermelho), zona de degeneração (laranja) e necrose (cinza).

Para as análises estruturais, realizou-se microscopia de luz (Figura 18), microscopia de luz com marcações de imunohistoquímica (Figura 19) e análise de criofratura por MEV (Figura 20). A caracterização morfológica realizada pelas análises citadas anteriormente mostrou que, em todas morfologias utilizadas, os vasos sanguíneos tumorais de regiões mais externas apresentam morfologia vascular mais compatível com a normalidade, com integridade endotelial e diâmetro vasculares normais, e regiões mais internas apresentam endotélio vascular descontínuo e aberrantes. Isso pode ser correlacionado ao dado obtido após quantificação destas mesmas regiões por meio de análise de radiopacidade vascular em tumores após perfusão de contraste iodado (Figura 14). As imagens de histopatologia (Figura 18) e imuno-histoquímica (Figura 19) exibiram diferenças em relação a presença de vasos e estrutura do endotélio vascular entre regiões superficiais e internas nos tumores.



**Figura 18: Fotomicrografias de adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino de camundongos Balb/C fêmeas em regiões superficiais (A e B) e internas (C e D). As setas vermelhas indicam a parede endotelial vascular com células mais justapostas em vasos sanguíneos localizados em regiões superficiais e mais descontínuas em vasos sanguíneos localizados em regiões de necrose. Todas as imagens estão em aumento de 40X.**



**Figura 19:** Fotomicrografias de adenocarcinoma de Ehrlich (A a F) e adenocarcinoma mamário murino (G a L) de camundongos Balb/C fêmeas submetidos a marcação imunohistoquímica para avaliação da expressão de KI67 e CD31 em regiões superficiais, intermediárias e internas. As áreas identificadas com a letra N são referente a tecido necrótico e V são referentes a tecidos viáveis.

As discontinuidades endoteliais produzem uma alteração estrutural clara na parede do capilar. Além disso, essa alteração estrutural culmina com a perda do controle fisiológico das pressões osmóticas e oncóticas entre o leito vascular e o interstício tumoral. Nestas situações,

a pressão que, em condições normais, tende a movimentar as partículas do leito vascular para o interstício é perdida, sendo este movimento impedido pela alta concentração proteica no interstício tumoral. Portanto, as regiões internas, que possuem os endotélios aberrantes, tendem a possuir um sistema capilar alterado tanto do ponto de vista estrutural, quanto do ponto de vista funcional e fisiológico. Esse efeito pode ser observado nos resultados de perfusão de iodo, onde as regiões internas foram menos perfundidas que regiões periféricas.

A marcação imunohistoquímica foi realizada para avaliar a expressão de KI67 (marcador de proliferação de células tumorais) e CD31 (marcador de tecido endotelial vascular). De acordo com o que é descrito em literatura, a marcação imunohistoquímica em tecidos necróticos pode levar a falsa positividade. Em artigo publicado em 2008 (TRUE, 2008), True relata que os tipos de células podem ser identificados e caracterizados de maneira inespecífica por imunocolorações em tecidos necróticos. Nossa capacidade de prever retenção ou aumento de imunorreatividade em tal situação é imperfeita. Se o tecido necrótico contém ou não epítomos que são imunorreativos é imprevisível e não há explicação muito clara para isso.

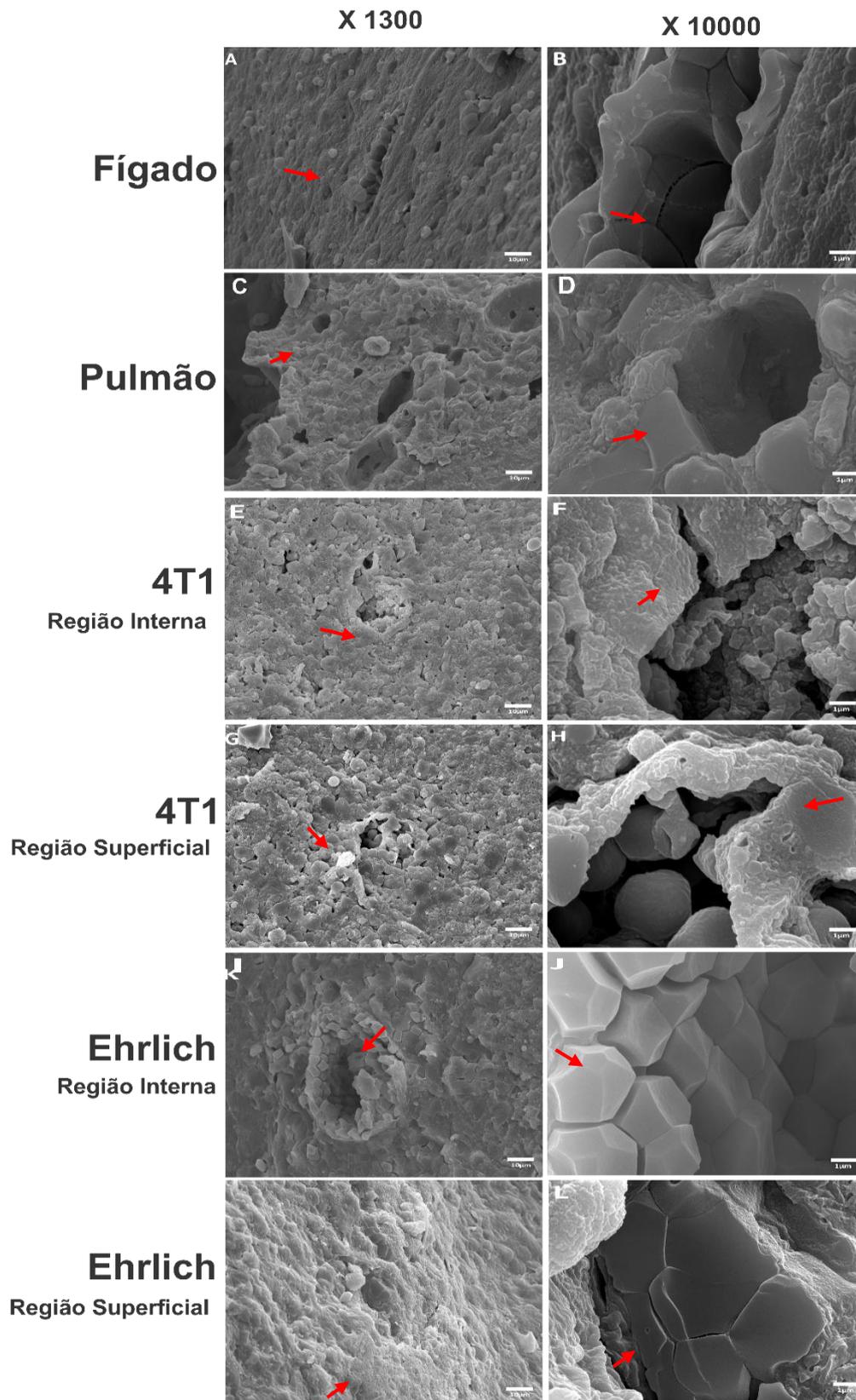
Diante disto, a análise imunohistoquímica realizada neste estudo foi apenas para fins qualitativos. As imagens mostram que os marcadores (cor marrom) são bastante expressivos em regiões superficiais e intermediárias. As regiões de necrose apresentam menor expressão dos marcadores mesmo com a inespecificidade. A área de tecido muscular foi utilizada como parâmetro para definir as regiões superficiais das amostras. Os tecidos musculares também foram utilizados como controles negativos, ou seja, tecidos que não teriam marcação constitutiva para os marcadores.

Estudos anteriores (ERGÜN et al., 2001; TILKI et al., 2007), já sustentam a hipótese de que durante o crescimento tumoral alguns vasos sanguíneos sofrem mudanças estruturais de sua parede. Em especial, vasos sanguíneos de regiões mais centrais dos tumores estão

parcialmente estabilizados e isso é associado a uma redução clara na densidade vascular e à necrose tumoral. Tilki e seus colaboradores relataram que em modelos experimentais de tumores apenas as células tumorais que estão em regiões tumorais organizadas em que os vasos sanguíneos estão mais estáveis, sobrevivem. As células que se encontram distantes destes vasos sanguíneos sofrem necrose pois são supridas por vasos mais instáveis e imaturos (malformado e com camada pericítica incompleta).

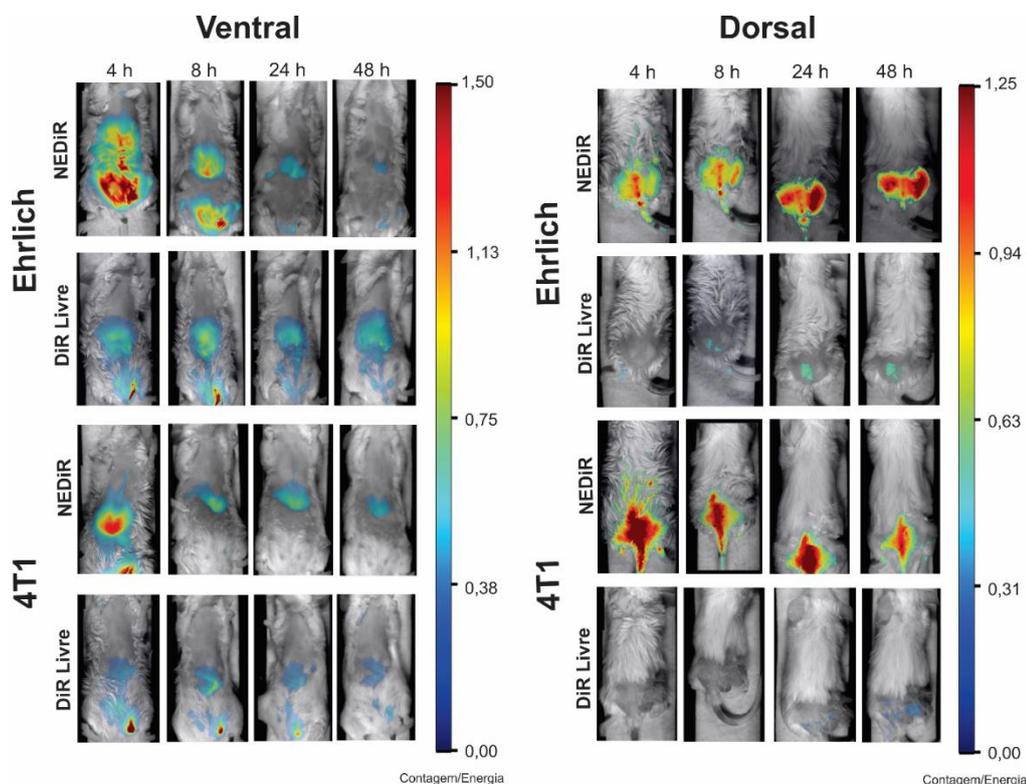
As fotomicrografias de MEV (figura 20) também mostram resultados semelhantes a histopatologia. Porém, além da diferença entre os espaços intercelulares no endotélio vascular de regiões mais hipóxicas (interna) e mais vascularizadas (superficial), tumores de Ehrlich apresentaram endotélio vascular mais aberrantes e descontínuo, representadas pela descontinuidade de ligação entre células vizinhas, visivelmente maiores em regiões mais internas em comparação os tumores 4T1. As fotomicrografias também mostraram que o endotélio vascular hepático é descontínuo, diferente da região pulmonar.

Seguindo a mesma premissa de que o microambiente tumoral deve ser avaliado individualmente e pode influenciar no acúmulo de nanomateriais, um estudo de 2018 publicado pela Wang e seus colaboradores (WANG et al., 2018) utilizou um chip que mimetizou as principais barreiras biológicas tumorais envolvidas na biodistribuição de nanopartículas (vasos sanguíneos com parede vascular descontínua e matriz extracelular densa) para investigar o extravasamento e, conseqüente, acúmulo em tecidos tumorais. Com isso, observou-se que a incorporação de ácido fólico na superfície de nanopartículas não aumentou o acúmulo tumoral, demonstrando que o direcionamento ativo de nanopartículas também sofre influência da individualidade do microambiente tumoral.

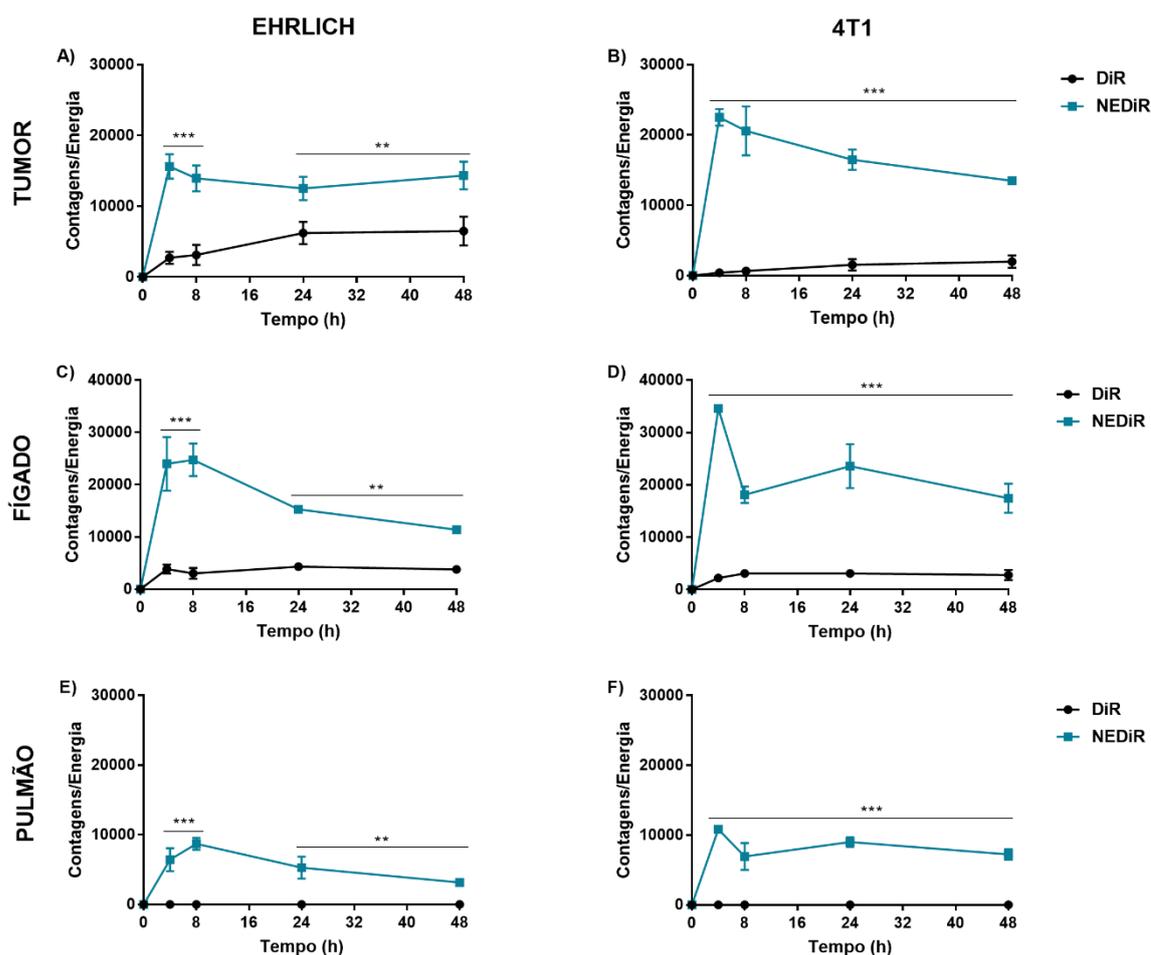


**Figura 20:** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando endotélio vascular de fígado (A e B), pulmão (C e D), adenocarcinoma mamário murino em região interna (E e F) e região superficial (G e H) e adenocarcinoma de Ehrlich em região interna (I e J) e região superficial (K e L). As imagens foram fotografadas em aumento de x1300 (A, C, E, G, I e K) mostrando a região de endotélio vascular e aumento de x10000 (B, D, F, H, J e L) mostrando as junções intercelulares em imagem ampliada, ambas indicadas pelas setas vermelhas.

A biodistribuição de NEDiR foi realizada com a intenção de analisar o perfil de distribuição da nanoemulsão em regiões de fígado, pulmão e tumor de camundongos Balb/C fêmeas portadores de tumor de Ehrlich e tumor 4T1 (Figuras 21, 22 e 23). Os dados demonstraram que NEDiR apresentou maior acúmulo em todas as regiões em comparação com DiR Livre, principalmente em região tumoral. Além disso, a intensidade de fluorescência de NEDiR foi significativamente maior nas regiões correspondente a tumor e fígado em comparação a região pulmonar. Este dado pode ser correlacionado com o resultado obtido através de análise de criofratura por MEV (Figura 20). As junções intercelulares mais espaçadas podem facilitar a permeabilidade da nanoemulsão para o espaço extravascular, permitindo uma biodistribuição preferencial para estas regiões.



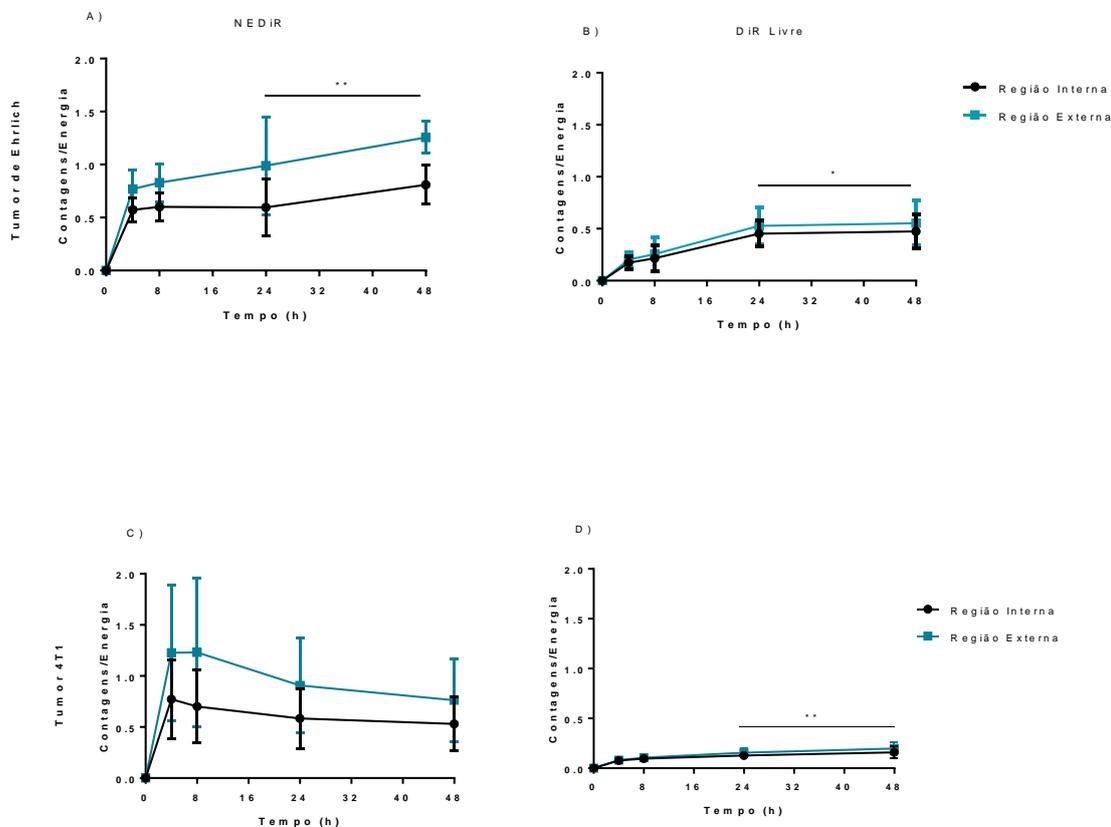
**Figura 21:** Imagem em tempo real das regiões ventral e dorsal de camundongos portadores de adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino nos tempos de 04, 08, 24 e 48 horas após a injeção intraperitoneal de NEDiR e DiR livre.



**Figura 22: Intensidade de fluorescência após injeção intraperitoneal de NEDiR e DiR livre.** Os gráficos representam quantitativamente a intensidade de fluorescência em diferentes tempos nas regiões em que se localizam tumor (A e B), fígado (C e D) e pulmão (E e F) de camundongos portadores de adenocarcinoma de Ehrlich e adenocarcinoma mamário murino, respectivamente. As linhas em cor verde representam animais que receberam a administração intraperitoneal de NEDiR. As linhas em cor preta representam animais que receberam a administração intraperitoneal de DiR livre. A intensidade de fluorescência da região de interesse (ROI) foi quantificada pelo software de imagem TrueQuant e expressa como contagem/energia. Subscrito \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Com a análise de intensidade de fluorescência utilizando tomografia por fluorescência molecular, observou-se que NEDiR apresentou maior acúmulo em todas as regiões, inclusive tumoral, em comparação com o grupo que recebeu DiR Livre. Além disso, semelhante a dinâmica de perfusão de contraste iodado, a fluorescência se mostrou mais intensa em regiões externas em comparação a regiões internas do mesmo tumor. Isso demonstra que o princípio descrito por Matsumura e Maeda em 1986 (MATSUMURA; MAEDA, 1986), descrevendo que

nanopartículas devido ao seu tamanho, possuem melhor distribuição em comparação com outras moléculas e melhor entrega em região tumoral devido às características fisiopatológicas dos vasos sanguíneos tumorais pode ser observado em modelos experimentais.



**Figura 23: Intensidade de fluorescência em região interna e externa do tumor após injeção intraperitoneal de NEDiR e DiR livre.** Os gráficos representam quantitativamente a intensidade de fluorescência em diferentes tempos nas regiões interna (cor preta) e externa (cor verde) de camundongos portadores de adenocarcinoma de Ehrlich (A e B) e adenocarcinoma mamário murino (C e D), respectivamente. A intensidade de fluorescência da região de interesse (ROI) foi quantificada pelo software de imagem TrueQuant e expressa como contagem/energia. Subscrito \* significa  $p < 0,1$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

Porém, além do tamanho das nanopartículas, recomenda-se que as características físicas sejam consideradas antes que o nanomaterial seja projetado visto que interfere no seu perfil de acúmulo em região tumoral. Perry *et al.*, 2017 (PERRY *et al.*, 2017), investigaram como o acúmulo e penetração de nanopartículas no tumor é influenciado pelo tamanho das nanopartículas, pelo tipo de célula cancerígena e pela localização do tumor, além de caracterizar

tumores para fatores mediadores de EPR, como densidade de microvasos, permeabilidade vascular, densidade de vasos linfáticos, conteúdo estromal e macrófagos associados a tumores. Os resultados mostraram que acúmulo de nanopartículas foi diferente nos modelos de tumor avaliados (Modelos: SKOV3 - Ovário humano / 344SQ – Pulmonar murino / A549 – Pulmonar humano / A431 – Epidermóide humano) e que isto correlacionou-se com a densidade dos microvasos tumorais, enquanto a penetração da NP nos tumores foi influenciada principalmente pelo conteúdo estromal em cada modelo de tumor. Além disso, ao comparar os três tamanhos de nanopartículas obtidas através do método de impressão por técnica de processamento roll-to-roll, nanopartículas menores apresentaram maior percentual de acúmulo em comparação com os outros dois tamanhos, confirmado a premissa que o menor tamanho facilita a passagem através da descontinuidade endotelial vascular.

Em estudo publicado em 2019 por Chen e seus colaboradores (CHEN et al., 2019), o efeito da normalização simultânea da vascularização tumoral anormal e dos componentes da matriz extracelular foi utilizada como estratégia para facilitar liberação intratumoral de nanopartículas *in vivo*. Os resultados demonstraram que a estratégia utilizada melhorou a distribuição de nanopartículas em tumores sólidos. Assim, a compreensão e desenvolvimento de estratégias de modulação do microambiente tumoral pode auxiliar na melhoria do transporte transvascular e intersticial de nanopartículas. Isso, juntamente com uma compreensão mais completa de como as propriedades intrínsecas dos nanomateriais afetam o fornecimento intratumoral, podem abrir caminho para a identificação de melhores estratégias para entregar nanopartículas em tumores sólidos.

A análise de intensidade de fluorescência apresentou outro resultado bastante interessante (Figura 22), os animais que receberam NEDiR por via intraperitoneal apresentaram intensidade de fluorescência significativamente maior nas regiões correspondente a tumor e fígado em comparação a região pulmonar. Este resultado pode ser explicado devido a forma

que a arquitetura hepática normalmente se apresenta<sup>88</sup>. As células endoteliais sinusoidais possuem descontinuidades intercelulares com diâmetro aproximado de 50-250nm e que correspondem aproximadamente 20% da sua superfície. Essas descontinuidades possibilitam um sistema de filtração altamente eficiente através da transferência de plasma e nanosubstratos entre o sangue e os hepatócitos. A morfologia sinusoidal também pode sofrer modificações morfológicas em diversos estados fisiológicos (COGGER et al., 2015; GRIFFIN; GAO, 2017).

Estudos sobre esta distribuição celular hepática e como elas competem com as nanopartículas em circulação devido a formação do sinusóide hepático podem ser observados. Em estudo avaliando a biodistribuição de lipossomas de albumina de soro humano poliaconidado (Aco-HSA) em células endoteliais sinusoidais foi observado que que 80% dos lipossomas Aco-HSA injetados se acumularam nos tecidos hepáticos 30 minutos após a injeção intravenosa (KAMPS et al., 1997). Comparado com os lipossomas controle, observou-se um aumento de 17 vezes no fígado com lipossomas Aco-HSA. Da quantidade total de nanopartículas nos tecidos hepáticos, dois terços dos lipossomas Aco-HSA foram absorvidos pelas células endoteliais sinusoidais, enquanto os outros foram sequestrados pelas células de Kupffer.

Os resultados deste estudo mostram que o fígado apresenta um dos maiores problemas para o uso de nanopartículas clinicamente, pois o sequestro hepático de nanopartículas dificulta o tratamento em tecidos doentes extra-hepáticos. A diminuição do tamanho de partículas para menos de 100nm faz com elas estejam na mesma escala que muitas moléculas biológicas. Isso faz com que elas tenham acesso a diferentes tecidos e estruturas celulares dentro do fígado e possam ter diferentes padrões de acumulação. Assim, além de considerar a individualidade do microambiente tumoral, deve-se considerar também o potencial sequestro de nanopartículas e o perfil farmacodinâmico competitivo do sistema hepático.

Os resultados discutidos acima indicam que há diferenças na remodelação do leito de vasos sanguíneos tumorais, mostrando heterogeneidade dentro e entre os dois tipos de adenocarcinoma avaliados. Além disso, os resultados de MEV mostraram que no mesmo tipo de tumor há diferentes dimensões de poro na vasculatura e que o tamanho dos poros varia de acordo com a localização do vaso dentro do tumor e em órgãos muito vascularizados como fígado e pulmão. Isso influencia diretamente na biodistribuição e acúmulo de macromoléculas e nanopartículas tanto em tecido tumoral como nas interações com outros órgãos, mostrando a necessidade de estudar a individualidade do microambiente tumoral para que se tenha maior aplicação clínica em nanomedicina.

## 4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se ter as seguintes conclusões:

- ▣ Dois modelos de adenocarcinoma em mesmo estágio de desenvolvimento, com perfil de crescimento semelhante, mesma localização anatômica, enxertados em animais de mesma idade e linhagem apresentam diferenças vasculares estruturais e hemodinâmicas;
- ▣ Dentro de um mesmo tumor, vasos sanguíneos localizados em regiões superficiais e internas podem apresentar morfologia diferente, com dimensão e tamanho dos poros variáveis de acordo com a localização do vaso dentro do tumor;
- ▣ O efeito de permeabilidade e retenção aumentada é observado na quarta semana de desenvolvimento tumoral, porém, se mostra heterogêneo dentro e entre os tipos de adenocarcinoma.

Desta forma, observa-se que o comportamento biológico individual de cada tipo de tumor e as diferenças estruturais de vasos sanguíneos tumorais podem interferir na dinâmica e direcionamento passivo de nanoemulsão para o tecido tumoral. Com isso, para que se tenha maior sucesso em ensaios clínicos em terapias utilizando fármacos incorporados a carreadores nanoestruturados projetados com base no princípio farmacocinético de efeito EPR, recomenda-se que se considere o comportamento biológico tumoral individualmente para que se consiga selecionar a estratégia mais adequada para o tratamento e, conseqüentemente, se tenha maior sucesso clínico em nanomedicina.

## REFERÊNCIAS

ALITALO, K. **The lymphatic vasculature in disease** *Nature Medicine*, 2011.

ANGELI, E. et al. Nanotechnology applications in medicine. **Tumori**, v. 94, n. 2, p. 206–215, 2008.

BAISH, J. W.; JAIN, R. K. **Fractals and cancer** *Cancer Research*, 2000.

BARENHOLZ, Y. **Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned** *Journal of Controlled Release*, 2012.

BARLOW, K. D. et al. **Pericytes on the tumor vasculature: Jekyll or hyde?** *Cancer Microenvironment*, 2013.

BASKAR, R. et al. **Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions** *International Journal of Medical Sciences*, 2012.

BENTLEY, K.; CHAKRAVARTULA, S. The temporal basis of angiogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2017.

BERTRAM, J. S. **The molecular biology of cancer** *Molecular Aspects of Medicine*, 2001.

BHUSHAN, M. et al. Recent advances in cutaneous angiogenesis. **British Journal of Dermatology**, v. 147, n. 3, p. 418–425, 2002.

BROOKS, R. A. A quantitative theory of the hounsfield unit and its application to dual energy scanning. **Journal of Computer Assisted Tomography**, 1977.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. **Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008.

CADY, B. Regional lymph node metastases; a singular manifestation of the process of clinical metastases in cancer: Contemporary animal research and clinical reports suggest unifying concepts. **Annals of Surgical Oncology**, 2007.

CARMELIET, P. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**, 1996.

CHEN, H. et al. Quantification of tumor vascular permeability and blood volume by positron emission tomography. **Theranostics**, 2017.

CHEN, Y. et al. Therapeutic Remodeling of the Tumor Microenvironment Enhances Nanoparticle Delivery. **Advanced Science**, v. 1802070, 2019.

COGGER, V. C. et al. A Standardized Method for the Analysis of Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Their Fenestrations by Scanning Electron Microscopy. **Journal of Visualized Experiments**, 2015.

DAI, Q. et al. Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors. **ACS Nano**, 2018.

DOS SANTOS CÂMARA, A. L. et al. Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model. **Nanomedicine**, 2017.

DULAK, J.; JÓZKOWICZ, A. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Synthesis by Nitric Oxide: Facts and Controversies. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 1, p. 123–129, 2003.

EBERHARD, A. et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: Implications for antiangiogenic tumor therapies. **Cancer Research**, 2000.

EHLING, J. et al. Micro-CT imaging of tumor angiogenesis: Quantitative measures describing micromorphology and vascularization. **American Journal of Pathology**, 2014.

ERGÜN, S. et al. Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. **Angiogenesis**, 2001.

F LONGO, J. P. et al. Nanomedicine for cutaneous tumors – lessons since the successful treatment of the Kaposi sarcoma. **Nanomedicine**, v. 13, n. 23, p. 2957–2959, 2018.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. **The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect** **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2011.

FERRARI, M. **Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges** **Nature Reviews Cancer**, 2005.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, 2002.

FORSSEN, E. A. **The design and development of DaunoXome® for solid tumor targeting in vivo**. **Advanced Drug Delivery Reviews**. **Anais...**1997

GAMBLE, J. et al.  $\beta$ 1 integrin activation inhibits in vitro tube formation: Effects on cell migration, vacuole coalescence and lumen formation. **Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research**, 1999.

GASTL, G. et al. Angiogenesis as a target for tumor treatment. **Oncology (Switzerland)**, v. 54, n. 3, p. 177–184, 1997.

GOLOMBEK, S. K. et al. **Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses** **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2018a.

GOLOMBEK, S. K. et al. **Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses** **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2018b.

GREEN, M. R. et al. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, 2006.

GREISH, K. et al. Nanomedicine: is it lost in translation? **Therapeutic Delivery**, 2018.

GRIFFIN, C. T.; GAO, S. **Building discontinuous liver sinusoidal vessels** **Journal of Clinical Investigation**, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation** **Cell**, 2011.

HASHIZUME, H. et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. **American Journal of Pathology**, 2000.

HOBBS, S. K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1998.

HORI, A. et al. Suppression of Solid Tumor Growth by Immunoneutralizing Monoclonal Antibody against Human Basic Fibroblast Growth Factor. **Cancer Research**, 1991.

HOSHIDA, T. et al. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: Therapeutic implications. **Cancer Research**, 2006.

JAMES, N. D. et al. Liposomal doxorubicin (Doxil): An effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. **Clinical Oncology**, 1994.

KAMPS, J. A. et al. Massive targeting of liposomes, surface-modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1997.

KEEREWEER, S. et al. Targeting integrins and enhanced permeability and retention (EPR) effect for optical imaging of oral cancer. **Journal of Surgical Oncology**, 2012.

KOBAYASHI, H.; WATANABE, R.; CHOYKE, P. L. **Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; What is the appropriate target?** *Theranostics*, 2014.

KURZ, H. **Physiology of angiogenesis** *Journal of Neuro-Oncology*, 2000.

LIOTTA, L. A.; STETLER-STEVENSON, W. G. Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. **Cancer Research**, 1991.

LONGO, J. P. F. et al. Prevention of distant lung metastasis after photodynamic therapy application in a breast cancer tumor model. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 2016.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Advances in Enzyme Regulation**, 2001a.

MAEDA, H. **SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: Advantages in cancer chemotherapy** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001b.

MAEDA, H. **Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015.

MAEDA, H.; GREISH, K.; FANG, J. **The EPR effect and polymeric drugs: A paradigm shift for cancer chemotherapy in the 21st century** *Advances in Polymer Science*, 2006.

MAEDA, H.; NAKAMURA, H.; FANG, J. **The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013.

MARCOM, P. K. Breast Cancer. In: **Genomic and Precision Medicine: Primary Care: Third Edition**. [s.l.: s.n.].

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. **Cancer Research**, 1986.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: Hematological, toxicological and histopathological evaluations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2014.

MUEHLMANN, A. L. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, 2015.

MUTHUKKARUPPAN, V. R.; KUBAI, L.; AUERBACH, R. Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. **J Natl Cancer Inst**, 1982.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, 2000.

NEHOFF, H. et al. **Nanomedicine for drug targeting: Strategies beyond the enhanced permeability and retention effect** **International Journal of Nanomedicine**, 2014.

NGUYEN, K. T. Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy: Promises and Challenges. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, 2011.

PADERA, T. P. et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. **Science**, 2002.

PERRY, J. L. et al. Mediating Passive Tumor Accumulation through Particle Size, Tumor Type, and Location. **Nano Letters**, 2017.

PETROS, R. A.; DESIMONE, J. M. **Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic**

applications **Nature Reviews Drug Discovery**, 2010.

PRAGER, G. W.; ZIELINSKI, C. C. Angiogenesis in cancer. In: **Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis**. [s.l: s.n.].

PRASAD, R. et al. Bioresponsive carbon nano-gated multifunctional mesoporous silica for cancer theranostics. **Nanoscale**, 2016.

RADICCHI, M. A. et al. Lipid nanoemulsion passive tumor accumulation dependence on tumor stage and anatomical location: a new mathematical model for in vivo imaging biodistribution studies. **Journal of Materials Chemistry B**, 2018.

RADU, M.; CHERNOFF, J. An *in vivo* Assay to Test Blood Vessel Permeability. **Journal of Visualized Experiments**, 2013.

RIBATTI, D. Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system. **Journal of Anatomy**, v. 208, n. 2, p. 139–152, 2006.

SHENG, W. Y.; HUANG, L. **Cancer immunotherapy and nanomedicine** **Pharmaceutical Research**, 2011.

STACKER, S. A. et al. **Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer** **Nature Reviews Cancer**, 2014.

STOCKMANN, C. et al. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. **Frontiers in Oncology**, 2014.

THEEK, B. et al. Characterizing EPR-mediated passive drug targeting using contrast-enhanced functional ultrasound imaging. **Journal of Controlled Release**, 2014.

TILKI, D. et al. Zone-specific remodeling of tumor blood vessels affects tumor growth. **Cancer**, 2007.

TORCHILIN, V. **Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009.

TRUE, L. D. **Quality control in molecular immunohistochemistry***Histochemistry and Cell Biology*, 2008.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016.

WANG, H. F. et al. Tumor-Vasculature-on-a-Chip for Investigating Nanoparticle Extravasation and Tumor Accumulation. **ACS Nano**, 2018.

WILHELM, S. et al. **Analysis of nanoparticle delivery to tumours***Nature Reviews Materials*, 2016.

WOUTERS, B. G. et al. Modulation of cell death in the tumor microenvironment. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 13, n. 1, p. 31–41, 2003.

YANG, S. et al. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 3, p. 887–895, 1999.

YUAN, F. et al. Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. **Cancer Research**, 1995.

## ANEXO I: Declaração de autorização do Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA).

Brasília, 8 de maio de 2018.	 <b>Universidade de Brasília</b> Instituto de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso Animal	
<b>DECLARAÇÃO</b>		
Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NO DESENVOLVIMENTO DE METASTASES PULMONARES EM MODELOS DE TUMOR DE MAMA APÓS O TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA ASSOCIADA A NANOEMULSÕES E A ADMINISTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE LOSARTANA.", Protocolo n.º 24/2018, sob responsabilidade do Professor João Paulo Figueiró Longo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: <i>Mus musculus</i> (25 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 20/05/2018 a 20/12/2018.		
	 Prof. Dr. Cássio José da Silva Coordenador da CEUA – UnB	
*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.		