



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Dissertação de Mestrado

**MODULAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA NO SISTEMA
FAGOCITÁRIO MONONUCLEAR HEPÁTICO PELA AÇÃO DA CLOROQUINA**

Thyago José Arruda Pacheco

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Brasília-DF

2020

Thyago José Arruda Pacheco

**MODULAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA NO SISTEMA
FAGOCITÁRIO MONONUCLEAR HEPÁTICO PELA AÇÃO DA CLOROQUINA**

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

2020

Dedico este trabalho a Deus, à MTA, e minha querida família, que sempre me deram suporte e sabem verdadeiramente o que esta além dessas linhas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Universidade de Brasília que me acolheu durante esses seis anos me oferecendo diversas oportunidades para o meu crescimento intelectual, pessoal e espiritual.

À minha mãe, Divina Kelly, pelo imenso amor e por ter tido a coragem de encarar a vida e nos dar um belo exemplo do sentido real de vencer na vida, apesar de inúmeras dificuldades.

Ao meu Pai, Chico, que sempre demonstrou todo o carinho do mundo por mais que estivesse doente e debilitado, nos dando amor e ensinando a amar.

Aos meus irmãos, Diego e Vyctor, por estarem presentes em minha vida e saber que posso contar com vocês sempre que precisar.

À minha namorada, Marianne, por ser uma pessoa fantástica me ensinando a ser uma versão melhor de mim mesmo e alegrando meus dias.

À comunidade católica da UnB, por ter sempre me acolhido e fazer do anfiteatro 6 às 12h15 um oásis no meio do deserto.

Ao Santuário Tabor da Esperança, por fazer deste lugar a casa da Mãe que reina em meu coração e com seu cetro se mostra vencedora em minha vida.

À todos meus tios, primos, amigos, Jumas, Opus Dei todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes em minha vida me ajudando de alguma maneira.

Ao meu primo, Rafael (in memorian), por ter sido sempre uma ótima pessoa e nos deixar seu exemplo, nos veremos em breve.

À todas as vítimas da pandemia do coronavírus.

Ao Willie, Jaques, Dani, Marina, Camila, Luiza, Raquel, Athayde, Amanda, Luís, Karen, Diogo, Nelice, Jayne, Victors, Débora e todos aqueles que me ajudaram de alguma forma me ensinando algo ou com empréstimos de materiais, dicas ou trabalho.

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.

Ao Prof. Dr. João Paulo Figueiró, meu orientador, por aceitar me orientar neste mestrado. Obrigado pelo seu sim e pela ajuda que pacientemente me concedeu.

Aos professores Ricardo, Jaqueline, Patrícia, Luis, Laíse, Aline por todas as conversas, conselhos, ajuda, carona e trabalho.

À senhora Cijane e Laura pela gentileza e acolhimento durante o experimento na UFG.

Ao Olaf, nosso cãozinho querido que esquenta o coração de qualquer pessoa que tenha um.

Às agências de fomento CAPES, FAPDF, CNPq e INCT Nano.

Mater Perfectam Habebit Curam et Victoriam

Pater Joseph Kenterich

RESUMO

A aplicação da nanotecnologia na terapia do câncer tem sido promissora. Por ser uma tecnologia que fornece uma abordagem abrangente e única contra o câncer por meio do diagnóstico, prevenção, terapia e medicina personalizada. Com essa tecnologia, podem ser utilizadas diferentes estratégias para o tratamento do câncer como, por exemplo, o medicamento terapêutico sendo carregado por nanopartículas e com alvo específico, liberação controlada do agente terapêutico na região de interesse e métodos para o diagnóstico precoce.

Embora nanopartículas geralmente se acumulem 10 vezes mais em tumores quando comparado com fármacos convencionais, menos de 1% da dose injetada atinge tipicamente o tumor, pois ficam retidas no fígado e baço. Os macrófagos específicos para o fígado, chamados de células de Kupffer e que constituem uma das principais barreiras no uso de nanopartículas para o tratamento do câncer, foram identificados pela primeira vez no fígado por von Kupffer e correspondem a maior população de macrófagos teciduais.

Essas Células de Kupffer fazem parte do Sistema Fagocitário Mononuclear e são predominantemente distribuídas no lúmen dos sinusóides hepáticos, exibindo atividade endocítica contra os materiais que passam pelo sangue e entram no fígado. Por esse motivo, as células de Kupffer são centrais no processo de eliminação de nanopartículas que atravessam as barreiras epiteliais do corpo.

Diante da problemática apresentada, este trabalho teve por objetivo modular a captação de uma nanoemulsão lipídica no sistema fagocitário mononuclear hepático pela ação da cloroquina para bloquear temporariamente a endocitose das nanopartículas pelas células de Kupffer.

Palavras-chave: cloroquina; biodistribuição; nanobiotecnologia; câncer; SFM; macrófagos; células de Kupffer; fagocitose; endocitose; nanopartículas.

ABSTRACT

The application of nanotechnology in cancer therapy has been promising. It is a technology that provides a comprehensive and unique approach to cancer through diagnosis, prevention, therapy and personalized medicine. Different strategies for the treatment of cancer can be used, for example, the therapeutic drug being carried by nanoparticles and with a specific target, controlled release of the therapeutic agent in the region of interest and methods for early diagnosis.

Although nanopharmaceuticals generally accumulate 10 times more in tumors when compared to conventional drugs, less than 1% of the injected dose typically reaches the tumor, because they get stuck in the liver and spleen. The liver-specific macrophages called Kupffer cells are one of the main barriers in the use of nanoparticles for the treatment of cancer. They were first identified in the liver by von Kupffer and correspond to the largest population of tissue macrophages.

Kupffer cells are part of the Mononuclear Phagocyte System and are predominantly distributed in the lumen of hepatic sinusoids exhibiting endocytic activity against materials that pass through the blood and enter the liver. For this reason, Kupffer cells are central to the process of eliminating nanoparticles that cross the body's epithelial barriers.

In view of the problem presented, this study aimed to modulate the capture of a lipid nanoemulsion in the hepatic mononuclear hepatic phagocytic system by the action of chloroquine to temporarily block an endocytosis of the nanoparticles by Kupffer cells.

Keywords: chloroquine; biodistribution; nanobiotechnology; cancer; MPS; macrophages; Kupffer cells; phagocytosis; endocytosis; nanoparticles.

Lista de Figuras

Figura 1- Esquematização da endocitose. Adaptado de SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV 2010.....	3
Figura 2 - Esquema geral da fagocitose. Adaptado de BALASUBRAMANIAN; SRAVANTHI; SUJITHA, 2015.	4
Figura 3 - Esquema das vias de eliminação de nanopartículas. As nanopartículas são eliminadas através do sistema renal, hepatobiliar e do sistema fagocitário mononuclear. Setas sólidas indicam as interações, setas tracejadas indicam possíveis interações. O sistema fagocitário mononuclear inclui fagócitos do fígado. Adaptado de YU; ZHENG, 2015.	5
Figura 4 - Diferentes estratégias para aumentar as nanopartículas na circulação sanguínea. Adaptado de ZHANG, Y.-N. et al 2016.	10
Figura 5 - Difosfato de Cloroquina. Adaptado de BHATTACHARJEE et al., 2002....	11
Figura 6 - Efeitos gerais da Cloroquina como modulador da biodistribuição de nanopartículas. Adaptado de PELT et al., 2018.....	13
Figura 7 - Delineamento experimental simplificado. A) Células RAW 264.7 foram cultivadas para avaliar a toxicidade na presença de cloroquina. B) Avaliação da fagocitose de Zimosan e nanoemulsão. C) Análise da modulação da cloroquina pelo sistema fagocitário mononuclear por tomografia de fluorescência molecular.....	16
Figura 8 - Esquematização do processo de Formulação da nanoemulsão com rodamina.	18
Figura 9 - Esquema ilustrativo da fagocitose por macrófagos murinos RAW 264.7. Imagem criada com <i>BioRender.com</i>	21
Figura 10 - Esquema experimental <i>in vitro</i> . A) Placas T75cm ² utilizadas para o cultivo de RAW 264.7. B) Incubadora para cultivo das células de macrófagos murinos. C) Plaqueamento das células em placa de 96 poços para avaliação da modulação da Cloroquina <i>in vitro</i> . D) Microscópio EVOS utilizado para o imageamento das células. . Imagem criada com <i>BioRender.com</i>	22
Figura 11 - Esquematização do processo de formulação da amostra de nanoemulsão com DiR.....	24
Figura 12 - Fluxo de caracterização das nanopartículas. A caracterização da nanoemulsão com DiR e rodamina seguiram os mesmos protocolos representados nesta figura. Após a síntese das nanoemulsões foram diluídas em PBS para leitura no ZetaSizer e mensurado o tamanho, PDI e potencial Zeta.....	25
Figura 13 - Avaliação no equipamento de Tomografia por Fluorescência Molecular <i>in vivo</i> . A) Os grupos CQN + DiR e CQN + NEDiR foram administrados previamente com Cloroquina e aguardado 30 minutos para a ação do fármaco, logo após foi adicionado 200 µL de DiR nos grupos DiR e CQN + DiR e 200 µL de NEDiR nos grupos NEDiR e CQN + NEDiR. B) Foi feito a captura das imagens nos tempos de 04, 08, 24 e 48 horas. Imagem criada com <i>BioRender.com</i>	27
Figura 14 - Segunda etapa da experimentação <i>in vivo</i> . A) Foram feitas as coletas das imagens capturadas do tempos 4, 8, 24 e 48h para a quantificação. B) Representação ilustrativa das Regiões de Interesse (ROI) delimitadas em áreas do pulmão, fígado e região administrada para análise da intensidade de fluorescência e sua quantificação. <i>Imagem criada com Biorender.com</i>	28
Figura 15 – Teste de viabilidade celular. Viabilidade celular dependente da concentração de Cloroquina após 24h de exposição. **p<0,005, *** p = 0,0005, ****p=0,0001.....	30

Figura 16 - Caracterização da nanoemulsão branca e nanoemulsão com rodamina. Distribuição e avaliação do tamanho, PDI e potencial zeta de NE e NERod. O gráfico representado em vermelho se refere à NE branca e em verde à NERod.....	31
Figura 17 - Avaliação do efeito da Cloroquina com o Zimosan. A) Controle. B) Zimosan. C) CQN. D) CQN + Zimosan. E) CTK. F) CTK + Zimosan. As células foram coradas com 5 µM de Laranja de Acridina. Aumento de 40x, barras representam 100 µm.	32
Figura 18 - Zimosan fagocitado por RAW 264.7 com diferentes métodos de microscopia. A) Microscopia por contraste de imagem do grupo CQN + Zim. B) Microscopia de fluorescência do grupo CQN + Zim. As setas indicam o Zimosan sendo fagocitado e os asteriscos representam o Zimosan extracelular. Aumento de 40x, barras representam 100 µm.	33
Figura 19 - Comparação entre RAW 264.7 fagocitando Zimosan em meio ácido e menos ácido. A) Representa o grupo Zim, as setas nas regiões vermelhas indicam o Zimosan sendo fagocitado em meio ácido. B) grupo CQN + Zim fagocitando Zimosan em meio menos ácido, as setas indicam Zimosan sendo fagocitado em meio menos ácido. Aumento de 40x, barras representam 100 µm.	34
Figura 20 - Internalização de partículas de Zimosan. Comparação da fagocitose de Zimosan entre os grupos Zim e CQN + Zim a cada 70 células de RAW 264.7 em triplicata. * p<0,02.	35
Figura 21 - Células RAW 264.7 incorporando NERod. As setas indicam a coloração da Rodamina 6G no citoplasma, indicando que a NERod foi incorporada. Aumento de 40x, barras representam 100 µm	36
Figura 22 - Avaliação da cloroquina na fagocitose de NERod. Grupo CQN + NERod que recebeu CQN antes da administração de NERod. Setas indicam que NERod se interiorizou apesar do inibidor de endocitose CQN. Os mesmos resultados foram observados com citocalasina.....	37
Figura 23 - Caracterização da NE e NEDiR. Distribuição e avaliação do tamanho, PDI e potencial Zeta de NE e NEDiR. O gráfico representado em vermelho se refere à NE branca e em verde à NEDiR.	38
Figura 24 - Imagens <i>in vivo</i> das regiões ventrais de camundongos. Visualização das imagens capturadas nos tempos de 04, 08, 24 e 48 horas após a injeção intraperitoneal de NEDiR e DiR livre com e sem a administração prévia de CQN.....	39
Figura 25 - Intensidade de fluorescência na região administrada após injeção intraperitoneal de DiR livre e NEDiR. A) O gráfico representa quantitativamente a intensidade de fluorescência na região de administração nos tempos 04, 08, 24 e 48h. B) Área sob a curva da região de administração ao longo do tempo de 04, 08, 24 e 48h. Asterisco (*) indica p<0,05.	40
Figura 26 - Intensidade de fluorescência no fígado após injeção intraperitoneal de DiR livre e NEDiR. A) O gráfico representa quantitativamente a intensidade de fluorescência nos tempos 04, 08, 24 e 48h. Os asteriscos do gráfico A representam em 24h (*) p= 0,028, em 8h (**) p =0,0023 e 48h p =0,0016. B) Área sob a curva da região do fígado ao longo do tempo de 04, 08, 24 e 48h. Os asteriscos do gráfico B representam **p<0,01, ****p<0,0001.....	41
Figura 27 - Intensidade de fluorescência no pulmão após injeção intraperitoneal de DiR livre e NEDiR. A) O gráfico representa quantitativamente a intensidade de fluorescência nos tempos 04, 08, 24 e 48h. Os asteriscos do gráfico A (**) representam p = 0,0023. B) Área sob a curva da região do pulmão ao longo do tempo de 04, 08, 24 e 48h. Os asteriscos do gráfico B (****) representam p<0,0001.	42

Figura 28 - Peso dos animais ao longo do experimento. A) Peso dos animais ao longo de todo o experimento. B) Área sobre a curva ao longo de todo o tempo do experimento. Não houve diferença estatística em nenhuma semana.43

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Discriminação de reagentes utilizados <i>in vitro</i>	18
Tabela 2 - Grupo experimental com Zimosan	20
Tabela 3 - Grupo experimental da nanoemulsão com rodamina	20
Tabela 4 – Grupos experimentais <i>in vivo</i>	25
Tabela 5 - Discriminação de reagentes utilizados <i>in vivo</i> em cada grupo	26

Lista de Abreviações

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

AUC – Área sob a curva

ASC – Área sob a curva

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CK – Células de Kupffer

CO₂ - Dióxido de carbono

CQN – Cloroquina

CTK – Citocalasina D

DiR - *1,10-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine Iodide*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EPR - Efeito de permeabilidade e retenção aumentada

HUB – Hospital Universitário de Brasília

ICONANNO - *International Conference Of. Nanoscience And Nanobiotechnology*

I.P. – Intraperitoneal

LA - Laranja de Acridina

mg- Miligramas

mL - Mililitros

NE – Nanoemulsão Branca

NEDiR – Nanoemulsão com DiR

NERod – Nanoemulsão com Rodamina

nm - Nanômetros

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão Sódio Fosfato

PEG – Polietilenoglicol

PMCLFI - Proteína de Montagem de Clatrina de Ligação ao Fosfatidilinositol

ROI - Região de interesse

rpm - Rotações por Minuto

SFB - Soro fetal bovino

SFM – Sistema Fagocitário Mononuclear

UCB - Universidade Católica de Brasília

UnB – Universidade de Brasília

USP – Universidade de São Paulo

ZIM – ZIMOSAN

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tratamento do câncer	1
1.2	Problemática com o uso de nanopartículas	1
1.3	Depuração de nanopartículas	4
1.3.1	Depuração Renal	6
1.3.2	Depuração Hepatobiliar	6
1.3.3	Depuração pelo sistema fagocitário mononuclear	6
1.4	Estratégias para aumentar o tempo de meia-vida de nanopartículas na circulação sanguínea	8
1.4.1	Modificação da Superfície de nanopartículas	8
1.4.2	Modificação de propriedades mecânicas	8
1.4.3	Modificação da forma	9
1.4.4	Saturação de Macrófagos	9
1.4.5	Depleção de macrófagos	9
1.4.6	Camuflagem biológica	9
1.5	Abordagem com o uso da Cloroquina	10
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Preparo de materiais para o experimento <i>in vitro</i>	16
3.1.1	Manutenção das Células	16
3.1.2	Preparo do Zimosan	17
3.1.3	Preparo de inibidores da fagocitose	17
3.1.4	Preparo da nanoemulsão com a sonda fluorescente rodamina	17
3.2	Procedimentos experimentais <i>in vitro</i>	18
3.2.1	Plaqueamento	18
3.2.2	Teste de MTT	19
3.2.3	Grupos experimentais do teste de endocitose	19
3.2.4	Avaliação no EVOS	21
3.2.5	Quantificação das partículas de Zimosan Internalizadas	21
3.3	Preparo de materiais para o experimento <i>in vivo</i>	23
3.3.1	Aquisição e manutenção dos animais	23
3.3.2	Preparo da Cloroquina e da nanoemulsão com sonda fluorescente DiR	23
3.4	Caracterização da nanoemulsão branca e com Rodamina e DiR	24

3.5	Procedimentos experimentais <i>in vivo</i>	25
3.5.1	Grupos experimentais.....	25
3.5.2	Avaliação na Tomografia por Fluorescência Molecular	26
3.5.3	Quantificação da intensidade de fluorescência	28
3.6	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	30
4.1	<i>In vitro</i>	30
4.1.1	Teste de MTT	30
4.1.2	Caracterização da nanoemulsão com Rodamina	30
4.1.3	Avaliação no EVOS do grupo Zimosan	31
4.1.4	Quantificação de partículas fagocitadas	35
4.1.5	Avaliação no EVOS do grupo NERod.....	36
4.2	<i>In vivo</i>	38
4.2.1	Caracterização da nanoemulsão com DiR	38
4.2.2	Avaliação na Tomografia por Fluorescência Molecular	38
4.2.3	Quantificação da intensidade de fluorescência	39
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8	ANEXOS	60
9	PRINCIPAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tratamento do câncer

Os tratamentos convencionais para o câncer possuem algumas desvantagens que acabam levando à morbidade dos pacientes sendo associada a complicações em longo prazo, contribuindo para a alta mortalidade. A quimioterapia, por exemplo, é extensamente utilizada para o tratamento do câncer, todavia os fármacos antineoplásicos apresentam baixa meia-vida na circulação sanguínea, necessitando de administrações sequenciais para a manutenção da concentração terapêutica (ZHANG et al., 2008).

Devido à atividade inespecífica e administrações sequenciais, os quimioterápicos provocam efeitos colaterais severos, geram angústia e traumas aos pacientes (LEMIEUX; MAUNSELL; PROVENCHER, 2008). No entanto, a nanobiotecnologia proporciona algumas vantagens farmacológicas ao ser utilizada com quimioterápicos convencionais, entre elas são: dispersão de drogas insolúveis em água, coentrega e rastreamento de dois ou mais fármacos para terapia combinada, bem como reduzir a toxicidade do tratamento (HO; PFEFFER; SINGH, 2017).

Ademais, os nanocarreadores são entregues de uma maneira mais específica para a região tumoral; reduzindo, assim, os efeitos adversos em outros tecidos. Além disso, os nanocarreadores prolongam a meia-vida dos fármacos na circulação, reduzindo o número de doses e permitindo a liberação do fármaco pelos transportadores sob certas condições fisiológicas (TORCHILIN, 2006).

Sendo assim, alguns sistemas com nanopartículas são amplamente usados para a entrega de drogas quimioterapêuticas no tratamento do câncer. Essa tecnologia, inclusive, produziu bons resultados clínicos e alguns produtos já estão disponíveis no mercado comercial há décadas, como o Doxil® lipossômico e Abraxane® à base de nanopartículas de albumina (MALAM; LOIZIDOU; SEIFALIAN, 2009).

1.2 Problemática com o uso de nanopartículas

Embora nanofármacos geralmente acumulem 10 vezes mais em tumores quando comparado com fármacos convencionais, um relatório resumindo os achados de 117 estudos de biodistribuição de nanopartículas descobriu que menos

de 1% da dose injetada atinge tipicamente o tumor (SUZUKI et al., 2008; WILHELM et al., 2016).

Quando as nanopartículas são expostas à corrente sanguínea, elas interagem com proteínas opsoninas. No momento em que essas proteínas opsoninas se anexam à superfície das nanopartículas, elas permitem que os macrófagos do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) reconheçam facilmente as nanopartículas e, conseqüentemente, as nanopartículas eventualmente se acumulam nos órgãos do SFM, tais como o fígado e baço. Estes fenômenos podem causar baixa eficiência de entrega de nanofármacos e toxicidade sistêmica grave por conta dos nanosistemas de entrega de drogas (OH; PARK, 2014).

Esses artigos demonstram que apesar de haver um acúmulo nos tecidos tumorais, muito do material nanoparticulado ainda é distribuído para tecidos saudáveis, tais como fígado e baço. Esses dois órgãos, em especial, são particularmente alvo dentre diversas nanopartículas por dois motivos principais: (1) possuem circulação aberta, o que facilita o contato entre o compartimento vascular e o interstício; e (2) possuem grande quantidade de macrófagos residentes, que capturam ativamente as nanopartículas circulantes. Este segundo mecanismo ativo, denominado aqui de endocitose, será um dos temas centrais abordados nesta dissertação de mestrado. Diante disso, o objetivo desta dissertação é modular este processo *in vivo*, com a finalidade de alterar o perfil de biodistribuição das nanopartículas circulantes.

Uma nanopartícula colocada no meio externo de uma célula pode interagir com o exterior da membrana plasmática, o que pode levar essa nanopartícula a entrar no interior da célula e ser degradada através de um processo denominado endocitose do qual envolve algumas etapas. Primeiro, a partícula é englobada por invaginações membranosas. Segundo, os endossomos entregam a partícula para estruturas vesiculares especializadas. Finalmente, a partícula é entregue a compartimentos intracelulares para reciclagem ou entrega através das células (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010).

Todos os tipos de células do corpo humano usam o processo de endocitose para se comunicarem com os ambientes biológicos e pode ser dividida em duas grandes categorias - fagocitose (captação de partículas grandes) e pinocitose (captação de fluidos e solutos) como ressaltado na Figura 1 (GERMAIN, 2004). Esse

é um processo dependente de energia, através do qual as células internalizam íons e biomoléculas (IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011) e as vias de endocitose são tipicamente classificadas em endocitose mediada por clatrina e caveolina, fagocitose, macropinocitose e pinocitose (Figura 1).

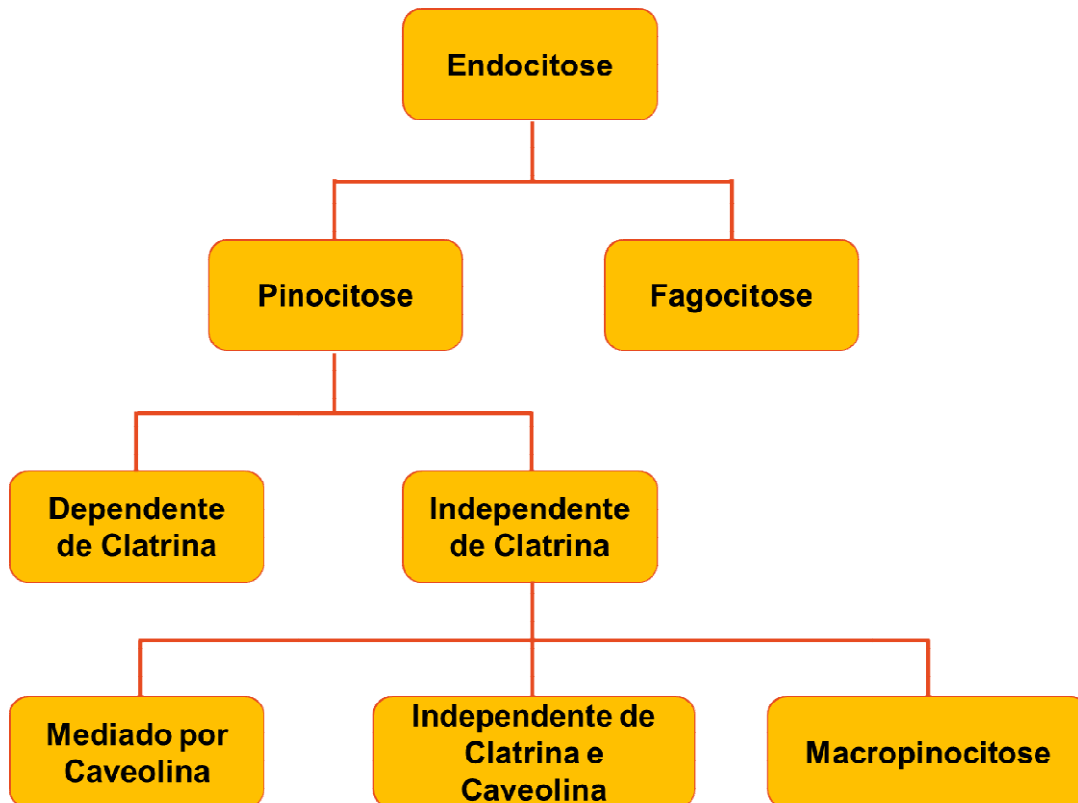


Figura 1- Esquematização da endocitose. Adaptado de SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV 2010.

A fagocitose é um processo dependente de actina que geralmente engloba partículas maiores que $0,5 \mu\text{m}$ e ocorre principalmente em fagócitos, como macrófagos (Figura 2), células dendríticas, neutrófilos e monócitos (TAUBER, 2003; HILLAIREAU; COUVREUR, 2009). Já a pinocitose, ao contrário, está presente em todos os tipos de células, tem múltiplas formas, englobam fluídos e partículas entre $0,2\text{--}5 \mu\text{m}$ e pode ser classificada como endocitose dependente de Clatrina e Caveolina (CONNER; SCHMID, 2003). Muitos tipos de células usam as vias de endocitose, mediada por essas proteínas, para internalizar materiais em nanoescala, incluindo vírus e nanopartículas (PELKMANS; KARTENBECK; HELENIUS, 2001; WANG et al., 2009).

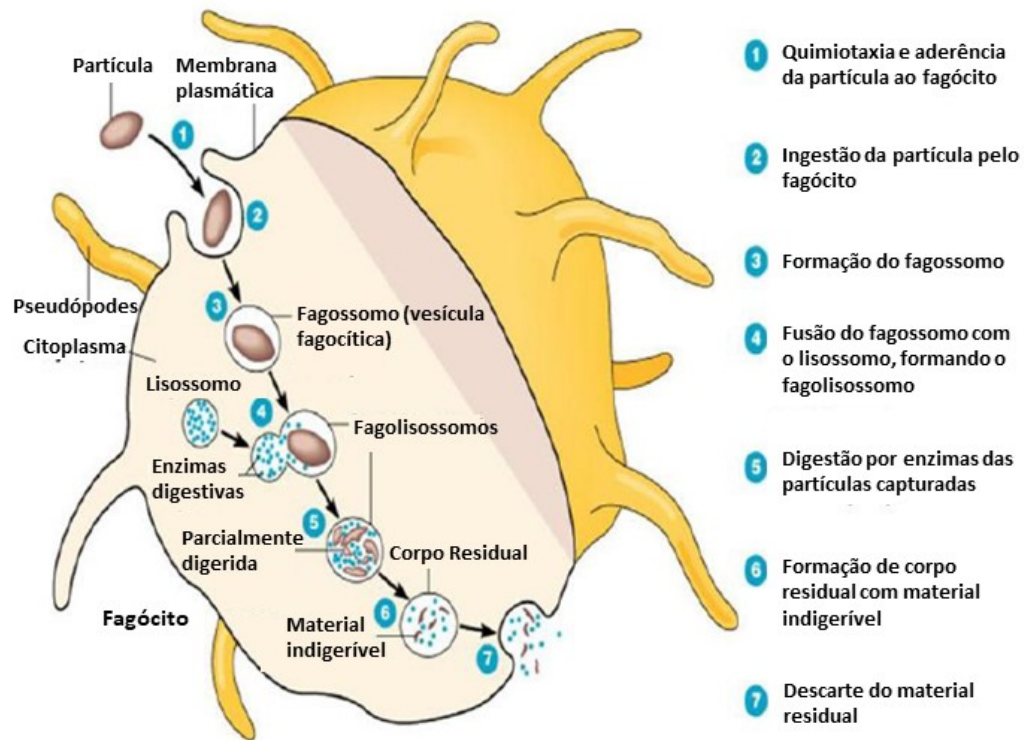


Figura 2 - Esquema geral da fagocitose. Adaptado de BALASUBRAMANIAN; SRAVANTHI; SUJITHA, 2015.

Os macrófagos específicos para o fígado, chamados de células de Kupffer (CK), constituem uma das principais barreiras no uso de nanopartículas para o tratamento do câncer, pois tem alta capacidade de remover os nanocarreadores da circulação sanguínea (RAO, 2008). Eles foram identificados pela primeira vez no fígado por von Kupffer e correspondem a maior população de macrófagos teciduais (KUPFFER, 1876; DIXON et al., 2013).

Essas CK fazem parte do SFM, estando predominantemente distribuídas no lúmen dos sinusóides hepáticos e exibem atividade endocítica contra os materiais que passam pelo sangue e entram no fígado (NAITO et al., 2004). Por esse motivo, as células de Kupffer são centrais no processo de eliminação de nanopartículas que atravessam as barreiras epiteliais do corpo (SADAUSKAS et al., 2007).

1.3 Depuração de nanopartículas

As propriedades físico-químicas das nanopartículas, incluindo o tipo de núcleo, tamanho, química da superfície, forma e carga superficial, ditam sua

interação com os diferentes tipos de células e são responsáveis pela ampla discrepância na depuração observada em diferentes tipos de nanopartículas (TRAN et al., 2017).

Após a administração no corpo a maioria das nanopartículas não atingem o seu alvo e são sequestradas pelo baço e fígado quando são maiores que 6 nm, ou eliminadas através dos rins se forem menores que 6nm (SUN et al., 2014; YU; ZHENG, 2015).

O esquema geral para depuração de nanopartículas é realizado através de três principais mecanismos: renal, hepatobiliar e via Sistema Fagocitário Mononuclear (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2001; YU; ZHENG, 2015).

É provável que nanopartículas não degradáveis e de tamanho maior sejam absorvidas e retidas pelo SFM (Figura 3). Se as nanopartículas são degradáveis intracelularmente pelo SFM, elas podem escapar ao sequestro e retornar à circulação sanguínea para eventual depuração hepatobiliar ou renal (YU; ZHENG, 2015).

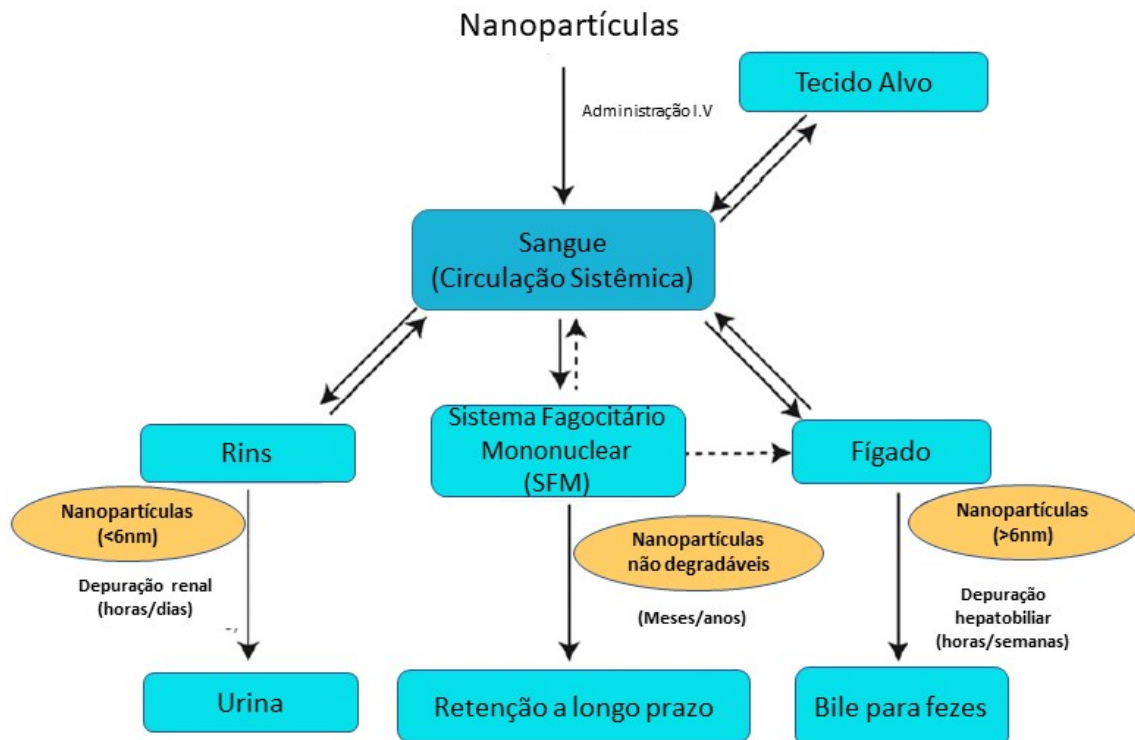


Figura 3 - Esquema das vias de eliminação de nanopartículas. As nanopartículas são eliminadas através do sistema renal, hepatobiliar e do sistema fagocitário mononuclear. Setas sólidas indicam as interações, setas tracejadas indicam possíveis interações. O sistema fagocitário mononuclear inclui fagócitos do fígado. Adaptado de YU; ZHENG, 2015.

1.3.1 Depuração Renal

Os rins são responsáveis por filtrar o sangue circulante e, portanto, as barreiras envolvidas na filtração renal estão relacionadas com a depuração das nanopartículas. Depois de atravessar o endotélio fenestrado com poros de 70 a 100 nm, as nanopartículas passam através da membrana basal glomerular, uma espessa camada de matriz extracelular que fica entre o endotélio capilar e os podócitos que permitem a liberação de partículas de aproximadamente 6 nm (CHO et al., 2008; VON ROEMELING et al., 2017).

A membrana basal glomerular é carregada negativamente e, portanto, nanopartículas catiônicas de 6 a 8 nm exibem maior depuração do que aquelas carregadas negativamente ou neutras do mesmo tamanho (LIU et al., 2013). Essa depuração acentuada é observada pelos tempos de meia-vida bastante curtos, reflexo da remoção das nanopartículas da circulação sanguínea pelos glomérulos renais.

1.3.2 Depuração Hepatobiliar

O fígado é uma rede complexa de células inter-relacionadas. Cerca de 60–80% das células parenquimatosas são hepatócitos. As outras células incluem células de Kupffer, células imunitárias residentes, colangiócitos, células endoteliais sinusoidais do fígado e células estreladas hepáticas (RACANELLI; REHERMANN, 2006).

Na depuração hepatobiliar, os hepatócitos do fígado eliminam partículas estranhas por endocitose, quebra enzimática e excreção na bile via sistema biliar (LONGMIRE; CHOYKE; KOBAYASHI, 2008). As nanopartículas entram no fígado através das tríades portais. Para transitar com sucesso através do sistema biliar, as nanopartículas devem primeiro evitar serem sequestradas pelas células de Kupffer, pois estas capturam diversos tipos de tamanhos de nanopartículas (HE et al., 2010).

.O processamento hepático e a excreção biliar geralmente é lenta, variando de horas a meses ou mais tempo (LONGMIRE; CHOYKE; KOBAYASHI, 2008)

1.3.3 Depuração pelo sistema fagocitário mononuclear

O SFM pode ser definido como células que se originam na medula óssea, são transportadas pela corrente sanguínea e se localizam nos tecidos. É composto, em

circunstâncias normais, por monoblastos, pró-monócitos e monócitos na medula óssea, monócitos no sangue e macrófagos no tecido (LASSER, 1983). São estes macrófagos do SFM que contribuem para a maior perda de dose injetada das nanopartículas (LI; HUANG, 2008).

As células de Kupffer produzem 80-90% da população total de macrófagos corporais (WANG et al., 2015) e são responsáveis pela maioria da atividade fagocitária no fígado (BERTRAND; LEROUX, 2012). As células de Kupffer estão posicionadas nos sinusóides do fígado e estão relacionados com a imunidade inata e regulação do sistema imunológico associado (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

. Os macrófagos residentes do fígado (Células de Kupffer) fagocitam e destroem patógenos, reciclam eritrócitos e digerem células apoptóticas. Monócitos circulantes no sangue também se aderem ao tecido hepático e são polarizados em células de Kupffer com receptores de superfície altamente diferenciados que facilitam a ligação ou absorção de materiais estranhos (DAVIES; JENKINS, 2013).

A depuração através do SFM refere-se à remoção de nanopartículas pelas células fagocitárias no sangue e tecidos (AMOOZGAR; YEO, 2012). Alguns fatores acabam aumentando a depuração pela via do SFM, como por exemplo, o tamanho das nanopartículas. Estudos mostraram que a captação de nanopartículas de ouro de 90 nm pelos macrófagos do fígado (células de Kupffer) foi aumentada em quatro vezes em comparação com aquelas com um terço do tamanho em experimento com macrófagos J774A.1 *in vitro* (WALKEY et al., 2012).

As nanopartículas são reconhecidas pelas células de Kupffer como um material estranho e podem ser internalizadas através de múltiplos receptores do tipo *scavenger*. Elas podem ser absorvidas pelos mecanismos de macropinocitose, mediados por clatrina, endocitose mediada por caveolina e por outras vias de endocitose (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007).

Quando as nanopartículas passam pelo fígado, os receptores do tipo *scavenger* das células de Kupffer reconhecem as opiosinas adsorvidas nas nanopartículas e levam à endocitose (WANG; WU; REINHARD, 2012). Devido suas características as células de Kupffer do SFM rapidamente sequestram a maioria das nanopartículas e continuam sendo uma barreira no tratamento do câncer com a utilização da nanobiotecnologia (CHRASTINA; MASSEY; SCHNITZER, 2011).

Grande parte das doses de nanopartículas são sequestradas por órgãos de filtração e nunca alcançam o alvo desejado. (GUSTAFSON et al., 2015). Cerca de 99% da dose injetada ficam no fígado e baço, estes órgãos contêm macrófagos residentes que formam o SFM, os quais reconhecem e englobam as nanopartículas, tornando esta a principal estratégia biológica para menor depuração de nanomateriais, aumentando o tempo de circulação e, por conseguinte, melhor entrega nos tecidos tumorais alvos (ZHANG et al., 2016).

1.4 Estratégias para aumentar o tempo de meia-vida de nanopartículas na circulação sanguínea

É um grande desafio melhorar o desenvolvimento de agentes nanoterapêuticos devido ao sequestro de nanopartículas pelo SFM e consequentemente a baixa acumulação no tecido tumoral desejado. Porém, estratégias têm sido elaboradas como alternativas para reduzir ou contornar completamente a fagocitose de nanopartículas pelas células de Kupffer, e algumas serão brevemente abordadas logo abaixo.

1.4.1 Modificação da Superfície de nanopartículas

A modificação da superfície de nanocarreadores com polietilenoglicol (PEG) é uma das estratégias para diminuir a internalização de nanopartículas pelo SFM (Figura 4A). Isso aumenta a dispersão de fármacos hidrofóbicos, minimiza a captação inespecífica, e prolonga o tempo de circulação na corrente sanguínea (VAN VLERKEN; VYAS; AMIJI, 2007).

1.4.2 Modificação de propriedades mecânicas

Propriedades mecânicas (especialmente de elasticidade e deformabilidade) de nanopartículas também influenciam a eficiência da fagocitose e o tempo na circulação sanguínea (BERTRAND; LEROUX, 2012). Macrófagos preferem absorver partículas rígidas em vez de mais suaves (BENINGO; WANG, 2002). Ao sintetizar partículas de hidrogel com elasticidade ajustáveis e um tamanho e forma semelhantes aos glóbulos vermelhos, os resultados mostram que, a meia-vida no sangue pode ser aumentada em um fator de trinta (MERKEL et al., 2011), podendo ser vantajoso para minimizar o sequestro pelo SFM.

1.4.3 Modificação da forma

A modificação da forma das nanopartículas pode influenciar o seu comportamento na corrente sanguínea e na biodistribuição. No entanto, não existem dados consistentes para sugerir que a forma é definitivamente melhor para reduzir o sequestro pelo SFM. Apesar se alguns estudos evidenciarem que o formato de haste das nanopartículas pode reduzir significativamente a absorção pelo SFM quando comparado com formas esféricas (ARNIDA et al., 2011; DECUZZI et al., 2010).

1.4.4 Saturação de Macrófagos

O princípio de saturar os receptores das células de Kupffer administrando previamente nanopartículas atóxicas antes da administração de nanoterapêuticos pode melhorar sua entrega aos tecidos de interesse (Figura 4B). Lipossomas compostos por fosfatidilcolina e colesterol foram utilizados para saturar a fagocitose de macrófagos (LIU et al., 2015).

1.4.5 Depleção de macrófagos

É um método mais agressivo para manipular o microambiente do sinusoide do fígado. Geralmente é chamado de técnica do "suicídio" dos macrófagos (VAN ROOIJEN, 2008). Essa técnica tem como premissa o uso de lipossomos para encapsular diclorometileno-bisfosfonato ou clodronato (Figura 4C).

Quando esses lipossomas são absorvidos pelos macrófagos, a bicamada de fosfolipídeo dos lipossomas são digeridas por fosfolipases lisossômicas que liberam clodronato para inibir a translocase de ADP/ATP nas mitocôndrias e, finalmente, desencadeiam a apoptose desses macrófagos, impedindo assim a endocitose de nanopartículas (LEHENKARI et al., 2002).

1.4.6 Camuflagem biológica

Abordagens de camuflagem em tecidos biológicos são estudadas para reduzir a captação de nanopartículas pelo fígado. Essas técnicas usam membranas fosfolipídicas de hemácias, leucócitos e monócitos circulantes (precursores de macrófagos). Nesta estratégia nanopartículas são recobertas não covalentemente com as membranas de eritrócitos evitando assim a rápida captura pelos macrófagos

residentes do fígado (Figura 4D), aumentando seu tempo na circulação sanguínea e entrega no tecido alvo (ANSELMO et al., 2013). Além disso, em outro estudo, nanopartículas de ouro foram carregadas em macrófagos associados a tumores, servindo como "Cavalos de Tróia" para fornecer nanopartículas a tumores sólidos enquanto minimizam seu sequestro pelo SFM (CHOI et al., 2012).

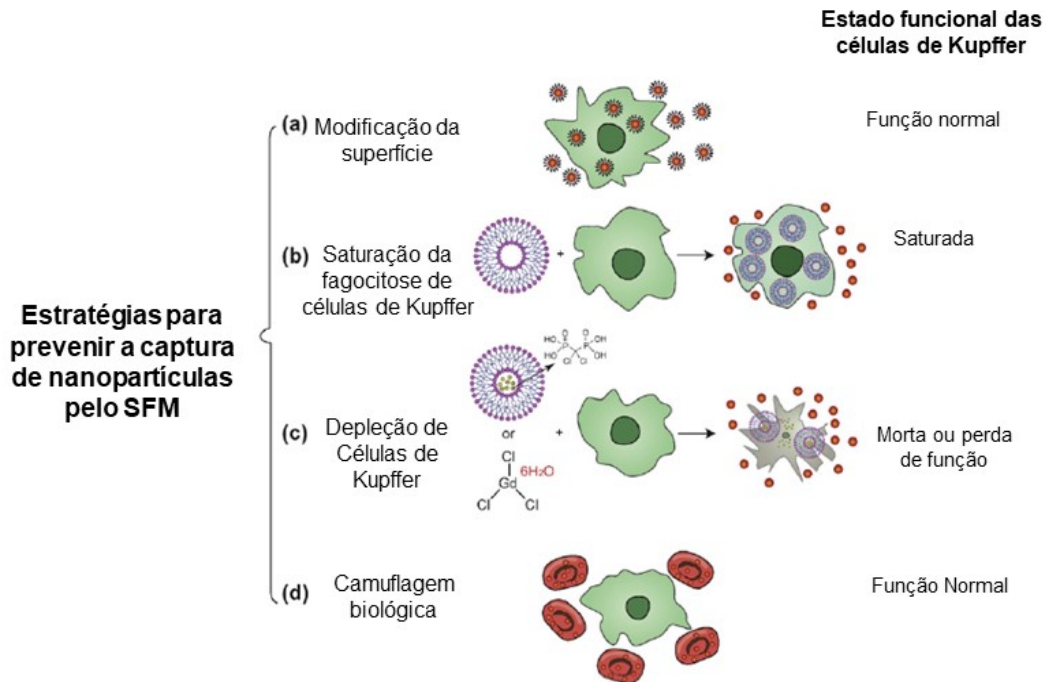


Figura 4 - Diferentes estratégias para aumentar as nanopartículas na circulação sanguínea. Adaptado de ZHANG, Y.-N. et al 2016.

1.5 Abordagem com o uso da Cloroquina

O fármaco Cloroquina (CQN), que será utilizado na presente dissertação de mestrado, é um antimalárico solúvel em água e clinicamente aprovado (Figura 5). Foi descoberto na década de 40, mas com uma história que remonta desde o século XVII com a utilização do princípio ativo pelos jesuítas na América do Sul e até mesmo uma disputa para a produção do fármaco antimalárico durante a primeira e segunda guerra mundial (MAGILL, 2016). É importante ressaltar, no entanto, que esse fármaco é amplamente utilizado para outros fins, inclusive *in vitro* como inibidor

da atividade viral do causador do mais recente surto de COVID-19 (WANG et al., 2020).

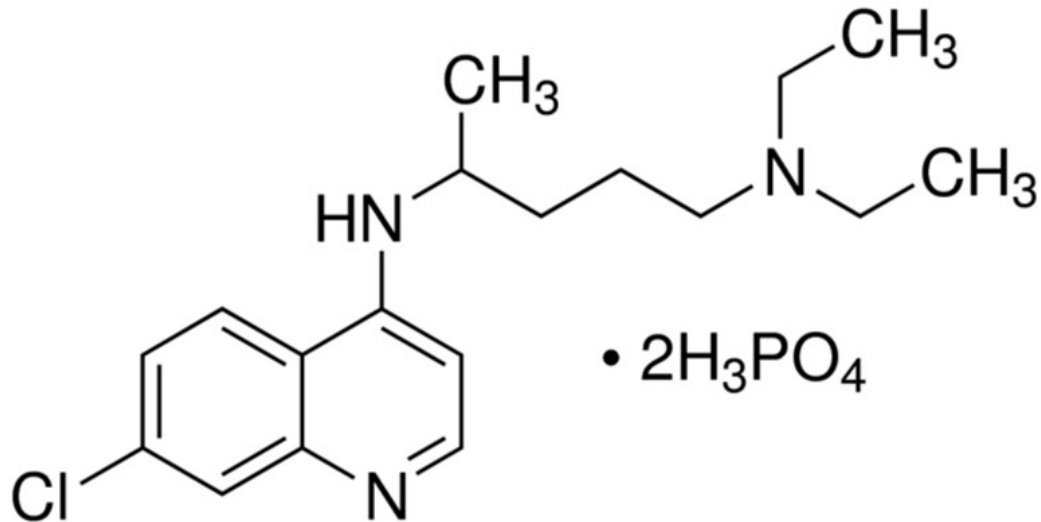


Figura 5 - Difosfato de Cloroquina. Adaptado de BHATTACHARJEE et al., 2002.

A CQN tem várias vantagens sobre outros medicamentos antimaláricos: seu baixo custo o tornou amplamente disponível para todos; tem baixa toxicidade, sendo seguro para crianças e mulheres grávidas (as vítimas mais vulneráveis da malária); sua boa eficácia e fácil administração garantiam um tratamento simples (NUWAHA, 2001). Entretanto, a resistência se desenvolveu em cerca de uma década e se espalhou a tal ponto que hoje a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a CQN não seja usada no tratamento da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, exceto em áreas específicas (WHO, 2009).

Na infecção por malária, a Cloroquina inibe a formação de hemozoína nos parasitas do gênero *Plasmodium*, levando ao acúmulo do grupo heme livre, substância tóxica para o parasita (HEMPELMANN, 2007). Este medicamento se acumula no vacúolo digestivo de parasitas causadores da malária do gênero *Plasmodium*, onde interfere na degradação da hemoglobina (HEMPELMANN, 2007).

O comportamento lisossomotrópico também é evidente nas células animais, onde a Cloroquina aumenta o pH lisossômico e já demonstrou induzir a formação de vacúolos nas células devido à disfunção lisossômica (WIBO; POOLE, 1974; GENG et al., 2010; YOON et al., 2010). Em estudos com microscopia confocal foi avaliado que a Cloroquina induz a formação de vacúolos nas células de Kupffer, indicando

que a função lisossômica foi interrompida. Conquanto, as células se recuperaram após a remoção da Cloroquina do meio de cultura celular, demonstrando que a disfunção lisossômica induzida pela Cloroquina é um processo reversível (WOLFRAM et al., 2017).

O lisossomo é geralmente o compartimento final do processo de endocitose, que é o mecanismo mais comum de internalização de nanopartículas em células (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010). Portanto, este fármaco pode interferir com estágios posteriores do tráfico endossômico de nanopartículas. Contudo, o fármaco utilizado nessa dissertação afeta não somente os estágios tardios da endocitose, pois foi comprovado que a CQN inibe a proteína de montagem de Clatrina de ligação ao fosfatidilinositol (PMCLFI). De fato, a literatura já havia comprovado que a depleção de PMCLFI – uma proteína de estágio inicial de endocitose – inibe a endocitose dependente de clatrina (MILLER et al., 2015; WOLFRAM et al., 2017).

É importante salientar que as células cancerosas desenvolveram mecanismos de proteção para evitar a morte celular após a exposição de medicamentos, o que permanece um problema apesar do uso de nanocarreadores (PELT et al., 2018). O aprimoramento da autofagia em resposta ao estresse celular pode ter efeitos anti-apoptóticos que dessensibilizam as células cancerosas à terapia (CHEN et al., 2010). Uma vez que a Cloroquina inibe a autofagia, a exposição de células cancerosas à Cloroquina pode levar à inibição do crescimento tumoral e apoptose (CAREW et al., 2007; DEGENHARDT et al., 2006; KATAYAMA et al., 2007; (TORGERSEN et al., 2013; WHITE; DIPOLA, 2009).

Este medicamento é uma base fraca que se torna desprotonada e se aprisiona nos lisossomos, causando um aumento do pH lisossômico (AMARAVADI et al., 2011). Essa elevação do pH inibe as etapas finais da autofagia, levando ao acúmulo de vesículas autofágicas no citoplasma, que impedem a produção e reciclagem de nutrientes e metabólitos importantes e leva a danos e, finalmente, a morte celular (AMARAVADI et al., 2011; GONZÁLEZ-POLO et al., 2005).

A CQN bloqueia a autofagia celular (Figura 6) através do impedimento das etapas finais deste processo (GONZÁLEZ-POLO et al., 2005; REDMANN et al., 2017), subsequentemente tornando as células tumorais mais suscetíveis à apoptose induzida por drogas (AMARAVADI et al., 2007). Além disso, a Cloroquina pode causar a normalização da vasculatura do tumor, o que melhora a administração do

agente terapêutico (MAES et al., 2014). Portanto, ao longo dos anos, a Cloroquina demonstrou capacidade de interferir em processos fisiológicos em células de mamíferos, uma propriedade que pode ser explorada para a terapia do câncer.

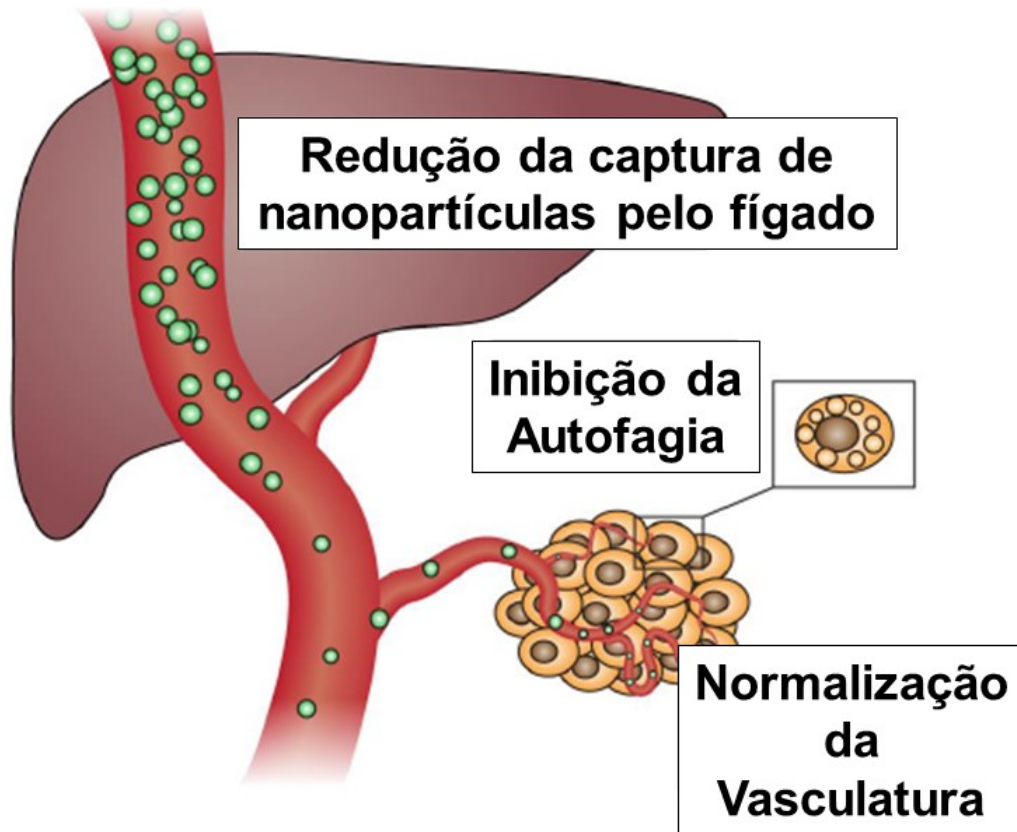


Figura 6 - Efeitos gerais da Cloroquina como modulador da biodistribuição de nanopartículas. Adaptado de PELT et al., 2018.

Assim, uma variedade de abordagens na construção de nanopartículas tem sido utilizadas para reduzir ou atrasar a captação pelo SFM, sendo o mais amplamente empregado a peguilação (PASUT; VERONESE, 2012). No entanto, estratégias como essas resultaram em um menor nível de biodistribuição (KNOP et al., 2010).

Apenas o fígado tem aproximadamente 80% de todos os macrófagos do SFM, conhecidos como células de Kupffer, tornado este órgão a principal barreira na utilização eficaz de nanocarreadores com drogas terapêuticas (BIOZZI; STIFFEL, 1965; ZHANG et al., 2016). Porém, o fármaco antimalárico Cloroquina (CQN), clinicamente aprovado e usado em pacientes por mais de 60 anos, foi identificada

como um inibidor eficaz da captação de nanopartículas por macrófagos do fígado. Descoberta que pode alterar a maneira de se tratar diversos tipos de cânceres (WOLFRAM et al., 2017).

São necessárias propostas de estratégias para a entrega melhor de nanocarreadores com a redução temporária da atividade de macrófagos do SFM através da inibição farmacológica da endocitose. Especificamente, o fármaco antimalárico Cloroquina bastante estudado e clinicamente aprovado (SCHLITZER, 2007) foi identificado como um inibidor eficaz da captação de nanopartículas em macrófagos (WOLFRAM et al., 2017). Portanto, é importante que estudos tentem avaliar o desempenho da Cloroquina como um agente de pré-condicionamento de macrófagos para melhorar a biodistribuição de nanopartículas *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do fármaco Cloroquina no perfil de biodistribuição de nanoemulsões lipídicas em modelos animais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a modulação do processo de fagocitose *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 após a exposição ao fármaco Cloroquina;
- Avaliar a modulação do processo de fagocitose *in vitro* de uma nanoemulsão lipídica pelos macrófagos RAW 264.7 após a exposição ao fármaco Cloroquina;
- Analisar a biodistribuição *in vivo* de uma nanoemulsão lipídica em modelos animais após a exposição ao fármaco Cloroquina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foi feito os experimentos *in vitro* para avaliar a toxicidade da cloroquina nas células (Figura 7A) e a possível inibição da fagocitose de partículas zimosan e nanoemulsão (Figura 7B). Logo após, foi feito o experimento *in vivo* para avaliar o efeito da cloroquina na captura de nanopartículas pelo sistema fagocitário mononuclear (Figura 7C).

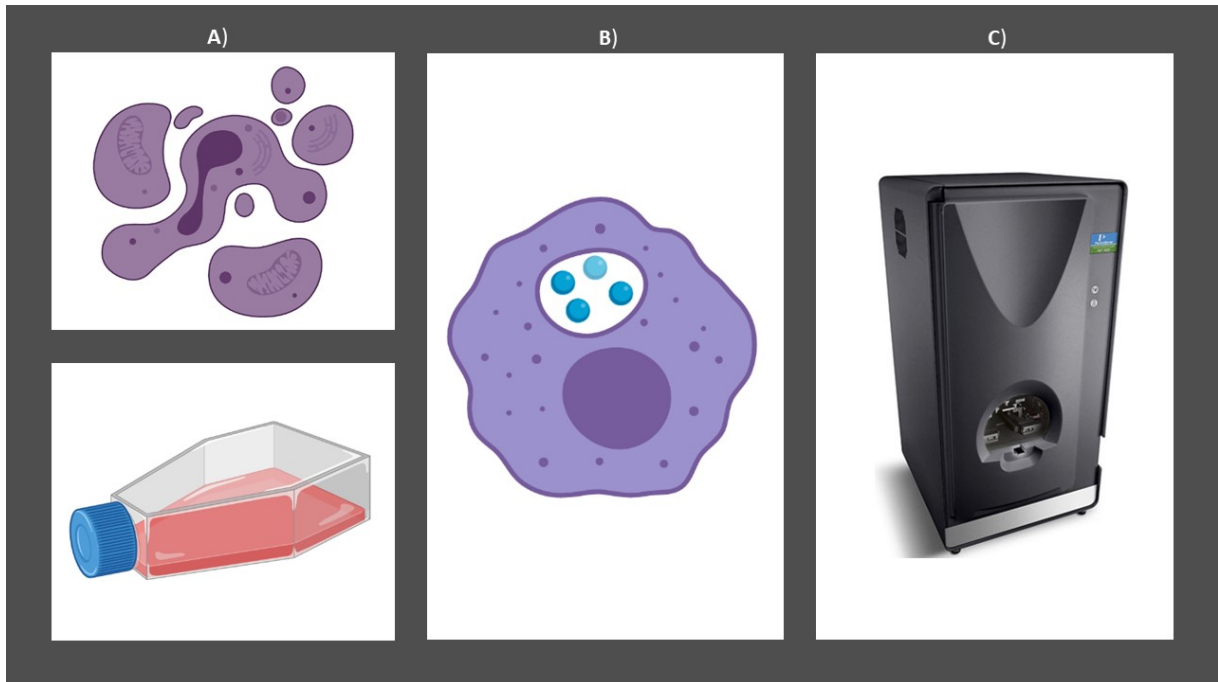


Figura 7 - Delineamento experimental simplificado. A) Células RAW 264.7 foram cultivadas para avaliar a toxicidade na presença de cloroquina. B) Avaliação da fagocitose de Zimosan e nanoemulsão. C) Análise da modulação da cloroquina pelo sistema fagocitário mononuclear por tomografia de fluorescência molecular.

3.1 Preparo de materiais para o experimento *in vitro*

3.1.1 Manutenção das Células

A linhagem celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™), derivada de macrófagos murinos foi mantida em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e estreptomicina e mantida em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Quando atingiam confluência, eram realizados repiques a fim de garantir a manutenção das células. Para isso foram desprendidas da garrafa por ação mecânica através de um *Cell Scrapper*. As células foram mantidas até atingirem um número suficiente para os experimentos *in vitro*, e a quantidade de células desejadas foi estimada por meio

de contagem utilizando câmara de *Neubauer* com o método de exclusão por azul de tripan para estabelecer o número de células viáveis. 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, tudo seguindo o *datasheet* para a RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™).

3.1.2 Preparo do Zimosan

Partículas de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas como controle positivo da fagocitose (Zimosan-Sigma-Aldrich) na concentração de 100 µg/mL dissolvida em PBS a 100 °C. A solução foi então centrifugada por 5 min a 1000 rpm, ressuspendido em PBS estéril, adicionado 1% de penicilina e estreptomicina e armazenado a temperatura de – 20°C.

As células expostas ao Zimosan foram coradas com 5 µM do fluoróforo Laranja de Acridina (LA) para facilitar a identificação das estruturas fagocíticas ácidas. Segundo dados da literatura, o LA emite luz fluorescente vermelha ou alaranjada quando está contido no interior de lisossomos (PIERZYŃSKA-MACH; JANOWSKI; DOBRUCKI, 2014). Para o processo de fagocitose, estas vesículas são importante alvo de rastreamento, pois se fundem às vesículas de fagocitose, formando os fagossomos, logo após o processo de fagocitose.

3.1.3 Preparo de inibidores da fagocitose

O fosfato de Cloroquina (Sigma-Aldrich) foi utilizado na concentração de 100 µM dissolvida em água, esterilizada em filtro 0,22 µm e armazenada a temperatura de 6°C. Foi preparado também a Citocalasina D (CTK) na concentração de 20 µM dissolvida em meio de cultura suplementado (DMEM) e utilizada imediatamente na placa de 96 poços.

3.1.4 Preparo da nanoemulsão com a sonda fluorescente rodamina

O preparo da nanoemulsão branca (NE) foi realizado de acordo com o descrito por (MUEHLMANN et al., 2015). Foram pesados em um béquer de 10 mL 360 mg de cremophor e 120 mg de óleo de rícino, este conjunto compõe a fase oleosa da nanoemulsão. Estes foram submetidos à agitação magnética por 10 minutos a 300 rpm.

Para os estudos de fagocitose *in vitro*, a nanoemulsão foi preparada com o corante fluorescente Rodamina 6G. Para tal, após o procedimento de homogeneização da fase oleosa, foi adicionado 500 μL de uma solução etanólica contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de Rodamina 6G. Após a evaporação completa do etanol, foi adicionado 5 mL de PBS estéril e este conjunto foi mantido sob agitação por 10 minutos. (Figura 8).

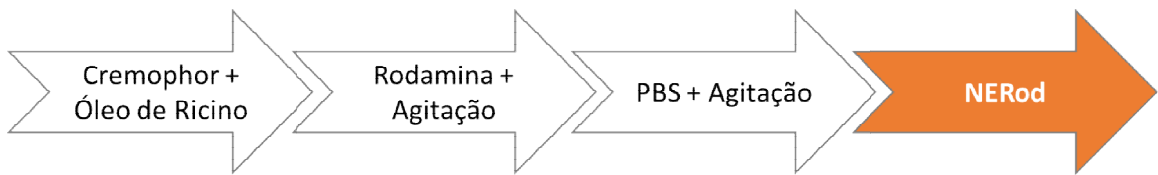


Figura 8 - Esquemática do processo de Formulação da nanoemulsão com rodamina.

As quantidades em massa ou concentração dos reagentes utilizados na experimentação *in vitro* estão dispostas na tabela 1 para uma melhor visualização.

Tabela 1 - Discriminação de reagentes utilizados *in vitro*

	Cremophor (mg)	Óleo de Rícino (mg)	Concentração (μM)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
CQN	-	-	100	-
Zimosan	-	-	-	100
CTK	-	-	20	-
NE	360	120	-	-
Rodamina	-	-	-	50
LA	-	-	5	-

3.2 Procedimentos experimentais *in vitro*

3.2.1 Plaqueamento

Células RAW 264.7 foram cultivadas em garrafas de 75 cm^2 até chegarem a 70% de confluência, desprendidas por ação mecânica através do *Cell Scrapper*, e estimado o número de células pela câmara de *Neubauer* com azul de tripan. Foram então plaqueadas 15000 células por poço em placa de 96 poços contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina e aguardado 24h.

3.2.2 Teste de MTT

O Protocolo de Ensaio de MTT foi executado para testar a viabilidade das células RAW 264.7 em diferentes concentrações de CQN. Para este experimento o fosfato de Cloroquina foi utilizado em triplicata na concentração de 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M dissolvido em água; além de triplicatas de poços para controle com RAW 264.7 apenas com o meio DMEM.

Então o ensaio seguiu os seguintes passos em triplicata para cada poço mencionado – Controle, 50, 100 e 200 μ M de CQN.

- 1) As células RAW 264.7 foram cultivadas e plaqueadas em placa de 96 poços contendo um volume final de 180 μ l / poço;
- 2) As células nas placas foram incubadas pelo período de exposição de 24h;
- 3) Adicionou-se 18 μ l de solução MTT por poço para obter uma concentração final de 0,45 mg / ml;
- 4) Foram incubados por 4 horas a 37 ° C;
- 5) 150 μ l de solução de solubilização foram pipetados a cada poço para dissolver os cristais de formazan e misturados para garantir uma completa solubilização;
- 6) Registrado a absorbância a 570 nm.

Após o último passo do teste de MTT foram coletadas as leituras de absorbância de cada poço e quantificado a viabilidade das células em cada concentração. Foi tomado como parâmetro da viabilidade de 100% a média da triplicata do controle quando comparado com cada triplicata da absorbância nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M

3.2.3 Grupos experimentais do teste de endocitose

Após 24h, foram separados dois grandes grupos, um chamado de Zimosan e o outro de NERod.

A) Zimosan

Neste grupo continham seis (6) sub-grupos: Controle, Zimosan (Zim), Cloroquina (CQN), Cloroquina e Zimosan (CQN + Zim), Citocalasina (CTK),

Citocalasina e Zimosan (CTK + Zim), em triplicatas na placa de 96 poços com volume final de 180 μL (Tabela 22).

Tabela 2 - Grupo experimental com Zimosan

Grupos	DMEM (μL)	ZIM (μL)	CQN (μL)	CTK (μL)
Controle	180	-	-	-
Zim	180	6,2	-	-
CQN	180	-	22,5	-
CQN + ZIM	180	6,2	22,5	-
CTK	180	-	-	18
CTK + Zim	180	6,2	-	18

Nos grupos CQN + Zim, CTK + Zim, foram adicionados primeiramente os inibidores da fagocitose (Cloroquina e Citocalasina) em seus respectivos poços e aguardado 30 minutos para o seu efeito antes de se adicionar os outros componentes desses poços. Após 30 minutos foi adicionado o Zimosan nos grupos CQN + Zim e CTK + Zim e aguardados 15 minutos para avaliar a inibição da fagocitose nesses grupos.

B) NERod

Neste grupo também tinha 6 subgrupos: Controle, Zimosan (Zim), Cloroquina (CQN), nanoemulsão com Rodamina (NERod), Cloroquina e nanoemulsão com Rodamina (CQN + NERod), Citocalasina (CTK), Citocalasina e nanoemulsão com Rodamina (CTK + NERod), em triplicatas na placa de 96 poços com volume final de 180 μL (Tabela 3).

Tabela 3 - Grupo experimental da nanoemulsão com rodamina

Grupos	DMEM (μL)	CQN (μL)	NERod (μL)	CTK (μL)
Controle	180	-	-	-
CQN	180	-	22,5	-
NERod	180	-	3	-
CQN + NERod	180	22,5	3	-
CTK	180	-	-	18
CTK + NERod	180	-	3	18

Nos grupos CQN + NERod, CTK + NERod, foram adicionados primeiramente os inibidores da fagocitose (Cloroquina e Citocalasina) em seus respectivos poços e aguardado 30 minutos para o seu efeito antes de se adicionar os outros componentes desses poços. Após 30 minutos foi adicionada a nanoemulsão com Rodamina nos grupos CQN + NERod e CTK + NERod e aguardados 15 minutos para avaliar a inibição da fagocitose nesses grupos.

3.2.4 Avaliação no EVOS

Após o tempo total de inibição e fagocitose (45 minutos) foi adicionado Laranja de Acridina ($5 \mu\text{M}$) nos poços que não contém Rodamina e incubados durante 15 minutos para avaliar o efeito do experimento em cada grupo no microscópio *Invitrogen EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific)*. Para os grupos tratados com o corante Rodamina, a própria fluorescência do corante foi utilizada para rastrear a nanoemulsão lipídica. O Laranja de Acridina foi utilizado para facilitar a identificação das estruturas celulares, bem como das vesículas ácidas envolvidas no processo de fagocitose. Foram utilizados a fonte de excitação azul ($\sim 480 \text{ nm}$) para a detecção dos corantes fluorescentes.

3.2.5 Quantificação das partículas de Zimosan Internalizadas

Para mensurar o efeito dos inibidores de endocitose CQN e CTK sob as partículas de Zimosan foram contabilizadas em triplicata a quantidade de Zimosan internalizada a cada 70 células dos grupos Zim, CQN + Zim e CTK + Zim (Figura 9).

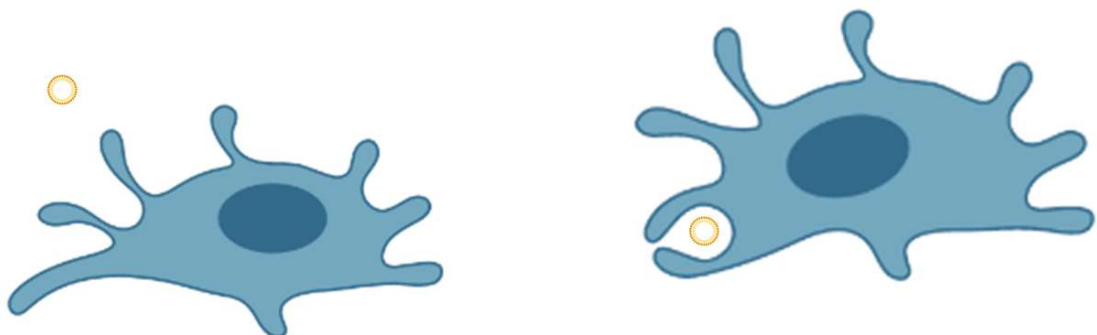


Figura 9 - Esquema ilustrativo da fagocitose por macrófagos murinos RAW 264.7. Imagem criada com *BioRender.com*.

O desenho experimental *in vitro* pode ser mais bem visualizado na Figura 10. Os experimentos *in vitro* seguiram de cultivo com linhagem celular RAW 264.7 em meio DMEM com garrafas T75 cm² (Figura 10A) em estufa com condições de temperatura e concentração de CO₂ adequadas (Figura 10B) para posterior plaqueamento e desafio com Zimosan, NERoD e os inibidores de endocitose CQN e CTK. (Figura 10C). Após essas etapas as placas do grupo Zim (coradas previamente com LA) e NeRod foram lidas no equipamento EVOS (Figura 10D) para análise e quantificação de partículas fagocitadas.

Todos os procedimentos para o preparo de materiais e experimentos na sala de cultivo seguiram condições estéreis para não permitir contaminação com nenhum grupo estudado.

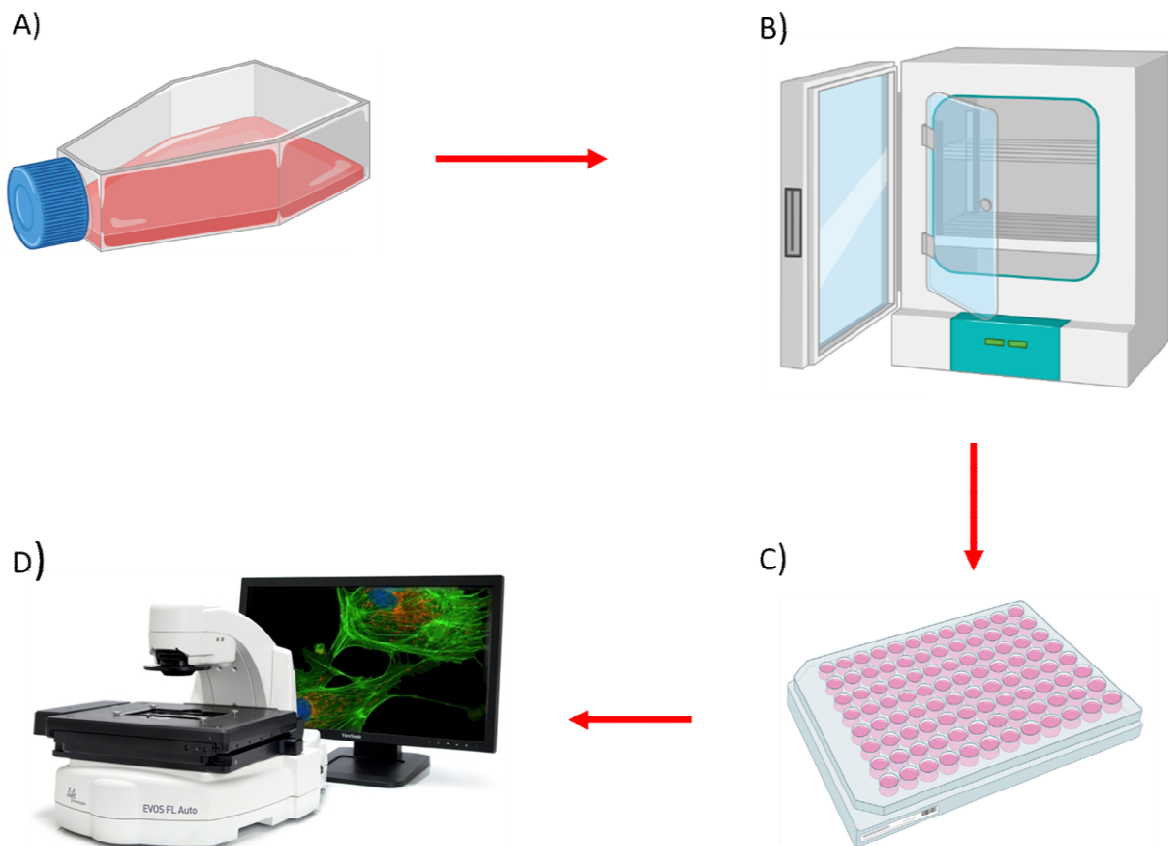


Figura 10 - Esquema experimental *in vitro*. A) Placas T75cm² utilizadas para o cultivo de RAW 264.7. B) Incubadora para cultivo das células de macrófagos murinos. C) Plaqueamento das células em placa de 96 poços para avaliação da modulação da Cloroquina *in vitro*. D) Microscópio EVOS utilizado para o imageamento das células. . Imagem criada com *BioRender.com*.

3.3 Preparo de materiais para o experimento *in vivo*

3.3.1 Aquisição e manutenção dos animais

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA/UnB) sob o protocolo de n.º 105/2019 (ANEXOS II).

Foram utilizados 20 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. Durante a quarentena e o experimento os animais foram mantidos em caixas plásticas separados em quatro grupos de cinco animais cada. As dietas dos animais foram feitas com ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Foram também mantidos em temperatura controlada de 23 °C, umidade (50% ± 10%), ciclo circadiano automatizado (12 horas de ciclos claro-escuro) e filtragem de ar individual. Os animais possuíam a mesma idade (aproximadamente 9 semanas) e apresentavam entre 25 e 27 g.

3.3.2 Preparo da Cloroquina e da nanoemulsão com sonda fluorescente DiR

O preparo da nanoemulsão (NE) foi realizado de acordo com o descrito por (MUEHLMANN et al., 2015). Foram pesados em um béquer de 10 mL 360 mg de cremophor e 120 mg de óleo de rícino. Estes foram submetidos à agitação magnética por 10 minutos a 300rpm.

Após obtenção da nanoemulsão, foram adicionados 0,8 mg/kg de Xenolight DiR (1,1'-*dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine Iodide*) em solução alcoólica no béquer de 10 mL contendo a amostra de NE, antes de se adicionar PBS, submetido à agitação magnética por 20 minutos a 300 rpm a fim de homogeneizar e promover a associação da sonda fluorescente às nanogotículas lipídicas presentes na nanoemulsão. Após homogeneização dos componentes foram adicionados 5mL de PBS pH 7,2 e submetidos à agitação magnética por 20 minutos produzindo assim a NEDiR. O processo dessa formulação pode ser visualizado segundo a sequência da Figura 111.

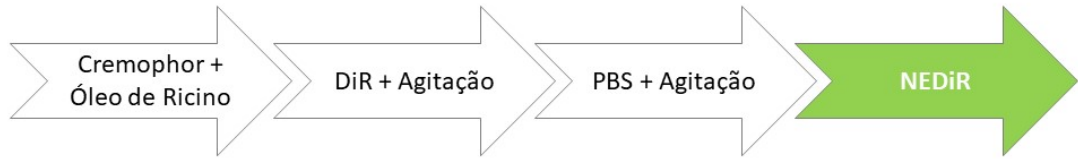


Figura 11 - Esquemática do processo de formulação da amostra de nanoemulsão com DiR.

O DiR livre (0,8 mg/kg) em solução alcoólica foi diluído em um béquer de 10 mL contendo o volume de 5 mL de PBS pH 7,2, submetido à agitação magnética por 20 minutos a 300 rpm e injetados 200 μ L em cada animal para atingir a concentração desejada.

A Cloroquina foi preparada na concentração de 30 mg/mL dissolvida em água, esterilizada em filtro de 0,22 μ m e injetados 50 μ L da solução para atingir a concentração de 60 mg/kg em cada animal experimental.

3.4 Caracterização da nanoemulsão branca e com Rodamina e DiR

Foi realizada o espalhamento dinâmico de luz para a caracterização da NE, NERod, NEDiR a fim de avaliar a manutenção dos parâmetros descritos por (Muehlmann *et al.*, 2015) após associação com a sonda fluorescente.

As amostras foram diluídas em PBS na proporção de 1:20 e depositada em cubeta de polietileno para seguinte análise de espalhamento dinâmico de luz utilizando o aparelho ZetaSizer ZS90 (Malvern). Para a análise foram utilizados parâmetros de 120 segundos de estabilização, temperatura de 25°C, com 3 sequências de 10 leituras de 30 segundos cada, com emissão de luz à 90°, sem intervalo de pausa entre elas.

Para a análise do potencial zeta as nanoemulsões foram diluídas em PBS na proporção de 1:20, foram aferidas seu pH, em triplicata, utilizando pHmetro e então foi depositadas em cubetas de polietileno com eletrodos, específica para a análise. O potencial zeta foi mensurado utilizando o aparelho ZetaSizer ZS90 (Malvern) e os parâmetros utilizados foram de 120 segundos de estabilização, com três sequências de 20 leituras no modo automático (Figura 12).

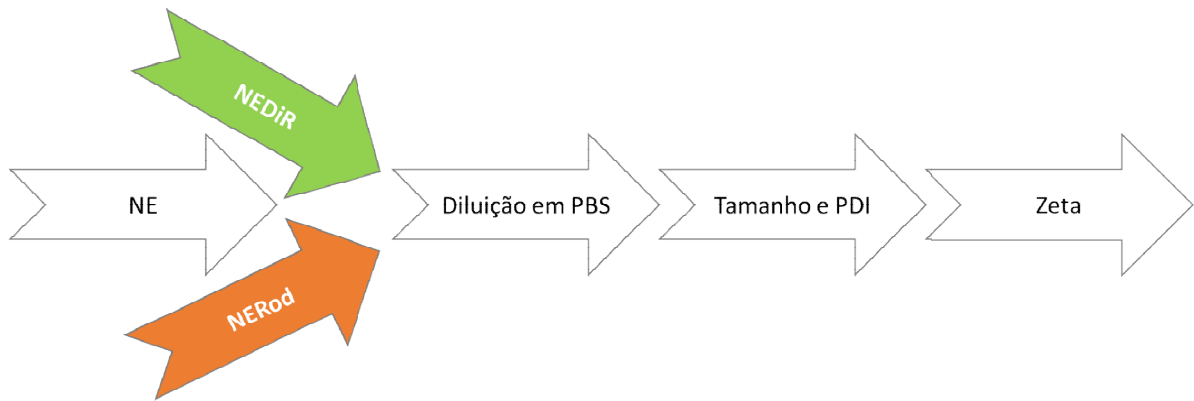


Figura 12 - Fluxo de caracterização das nanopartículas. A caracterização da nanoemulsão com DiR e rodamina seguiram os mesmos protocolos representados nesta figura. Após a síntese das nanoemulsões foram diluídas em PBS para leitura no ZetaSizer e mensurado o tamanho, PDI e potencial Zeta

3.5 Procedimentos experimentais *in vivo*

3.5.1 Grupos experimentais

Foram separados quatro grupos (DiR, CQN + DiR, NEDiR, CQN + NEDiR) com cinco animais cada para o experimento *in vivo* (Tabela 4). No grupo DiR cada animal recebeu apenas 0,8 mg/kg da sonda fluorescente livre, o grupo CQN + DiR recebeu 60 mg/kg de Cloroquina 1 hora antes de receber DiR, o grupo NEDiR recebeu a nanoemulsão com DiR carregado na nanoemulsão e o grupo CQN + NEDiR em que houve a administração prévia de Cloroquina (60 mg/ kg, 1 hora antes) para depois administrar a NEDiR. Todas as administrações foram realizadas pela via intraperitoneal (I.P.).

Tabela 4 – Grupos experimentais *in vivo*

Grupos	Número de animais
DiR	5
CQN + DiR	5
NEDiR	5
CQN + NEDiR	5

A proporção e concentração de reagentes utilizada em cada grupo esta descrita na tabela 5.

Tabela 5 - Discriminação de reagentes utilizados *in vivo* em cada grupo

Grupos	Cremonophor (mg)	Óleo de Ricino (mg)	Xenolight DiR (mg/kg)	Cloroquina (mg/kg)
DiR	-	-	0,8	-
CQN + DiR	-	-	0,8	60
NEDiR	360	120	0,8	-
CQN + NEDiR	360	120	0,8	60

3.5.2 Avaliação na Tomografia por Fluorescência Molecular

Após passar 1h de ação da Cloroquina nos grupos CQN + DiR e CQN + NEDiR os animais foram injetados intraperitonealmente com as sondas fluorescentes DiR e NEDiR. Os animais receberam por via intraperitoneal 200 μ L de solução de NEDiR ou DiR. A intensidade de fluorescência foi avaliada nos tempos de 04, 08, 24 e 48 horas após a administração no equipamento de Tomografia por Fluorescência Molecular (Figura 13). Durante o processo da medida da intensidade da fluorescência nos tempos mencionados os animais foram mantidos sob anestesia inalatória com câmara sob atmosfera de isoflurano 1,5%.

A avaliação da intensidade de fluorescência foi realizada utilizando o 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 1,5% e posicionado em um cassete que é inserido no aparelho. As leituras foram realizadas utilizando laser de 80 mW do canal 750 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*.

Durante todo este processo os animais continuaram recebendo os tratamentos adequados segundo o comitê de Bioética da UnB para não haver alteração experimental entre os diferentes grupos devido a fatores ambientais ou biológicos.

O ventre dos animais foi depilado com creme depilatório para melhor visualização do sinal fluorescente no FMT e não haver interferência do pelo durante

a leitura. Os animais tiveram de ficar imobilizados durante a depilação então foi utilizado anestésico por via intraperitoneal com 80 μL de volume total de solução de cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilazina a 2%, 80mg/kg e 10mg/kg, respectivamente.

Avaliação na FMT

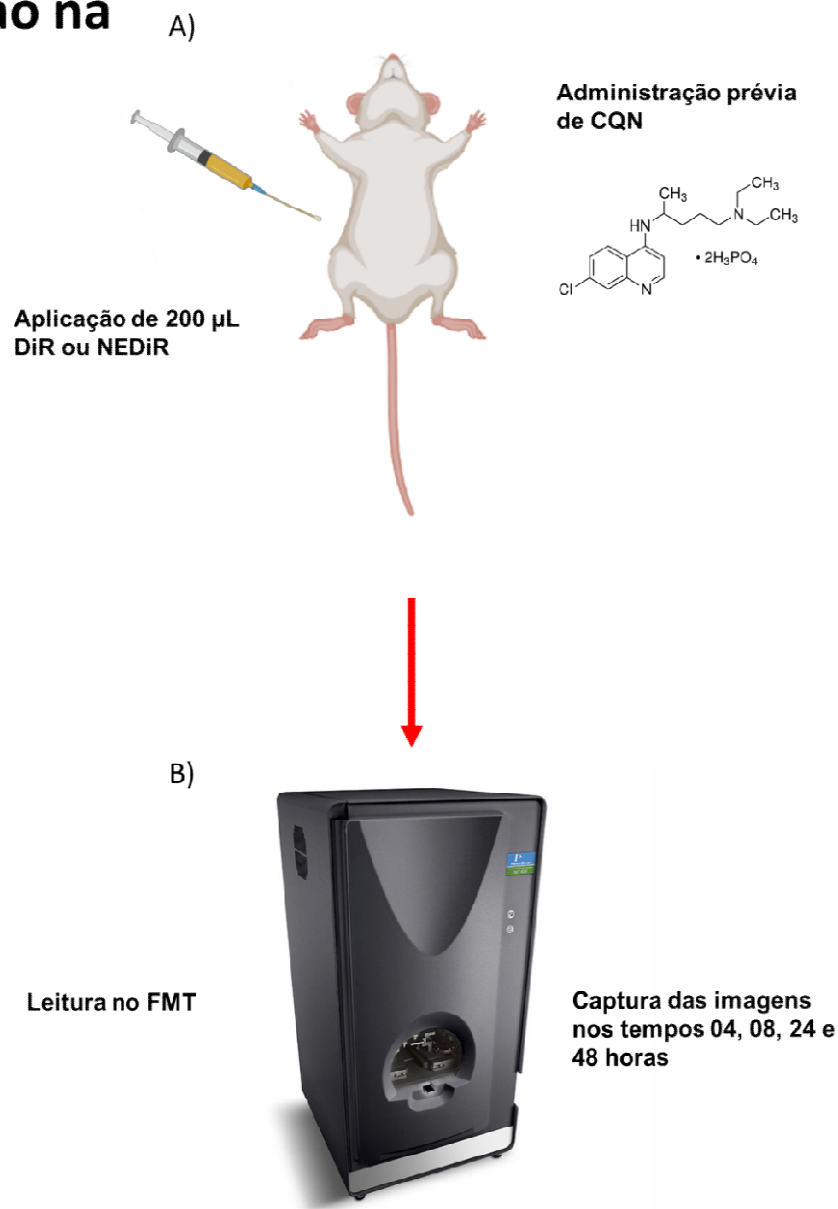


Figura 13 - Avaliação no equipamento de Tomografia por Fluorescência Molecular *in vivo*. A) Os grupos CQN + DiR e CQN + NEDiR foram administrados previamente com Cloroquina e aguardado 30 minutos para a ação do fármaco, logo após foi adicionado 200 μL de DiR nos grupos DiR e CQN + DiR e 200 μL de NEDiR nos grupos NEDiR e CQN + NEDiR. B) Foi feito a captura das imagens nos tempos de 04, 08, 24 e 48 horas. Imagem criada com *BioRender.com*

3.5.3 Quantificação da intensidade de fluorescência

No experimento, obteve-se tomografias 2D dos camundongos em diferentes tempos (04, 08, 24 e 48h) para demonstrar quantitativamente a biodistribuição de NEDiR e DiR livre com e sem Cloroquina. Em todos os tempos analisados foram realizadas três leituras na região ventral de cada animal para quantificar a fluorescência das regiões onde se localizam o tórax (que corresponde à região pulmonar), região abdominal direita (que corresponde à região do fígado) e região pélvica esquerda (área de administração intraperitoneal de DiR e NEDiR). A quantificação foi feita usando o *software TrueQuant* 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 14).

Quantificação

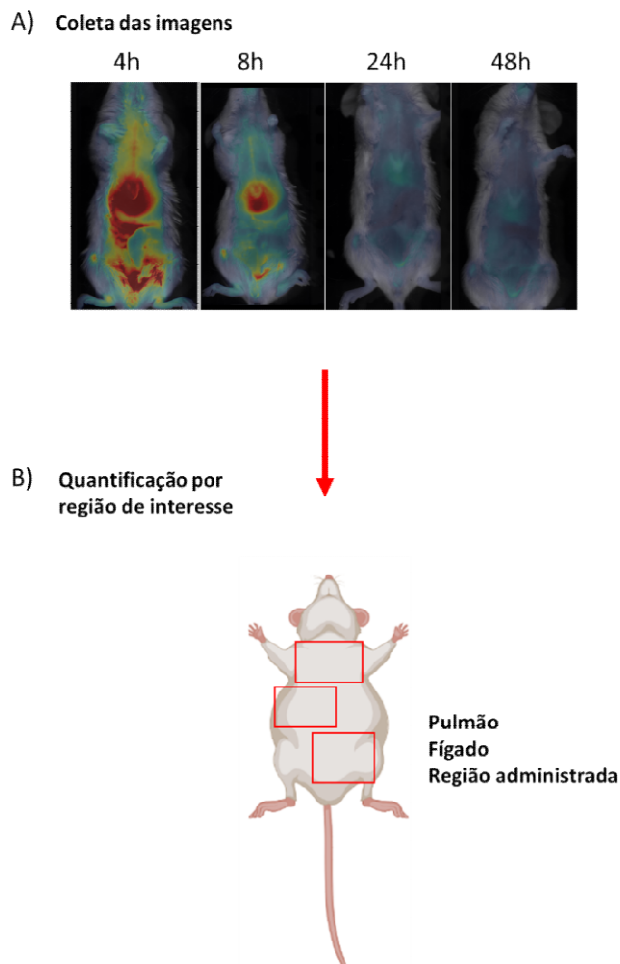


Figura 14 - Segunda etapa da experimentação *in vivo*. A) Foram feitas as coletas das imagens capturadas do tempos 4, 8, 24 e 48h para a quantificação. B) Representação ilustrativa das Regiões de Interesse (ROI) delimitadas em áreas do pulmão, fígado e região administrada para análise da intensidade de fluorescência e sua quantificação. *Imagem criada com Biorender.com.*

3.6 Análise estatística

Os resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram analisados no software GraphPad Prisma® 7.0 e foram submetidos a testes estatísticos específicos com confiança estatística de 95% ($p < 0,05$). Diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes one e Two-way ANOVA, aplicando pós-testes de múltiplas comparações de Tukey's. Os resultados quantitativos foram descritos como média \pm erro padrão. Também foi calculada a área sobre a curva dos resultados gráficos gerados para analisar o efeito ao longo de todo o experimento ao invés de somente um tempo específico. Estes resultados foram submetidos ao one-way ANOVA e pós-testes de múltiplas comparações de Tukey's com confiança estatística de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 *In vitro*

4.1.1 Teste de MTT

Utilizando o teste de MTT, foi possível avaliar o efeito das diferentes concentrações de Cloroquina na porcentagem de viabilidade celular em células RAW 264.7 após 24h de exposição ao fármaco inibidor de endocitose (Figura 15). A concentração utilizada no teste *in vitro* para avaliar aspectos de metabolismo nas células de RAW 264.7 foi de 100 μM , portanto essa concentração promove uma redução na viabilidade celular de 30% em comparação ao grupo controle, sem exposição à Cloroquina. Em contrapartida, a concentração de 200 μM reduz em cerca 80% a viabilidade das células.

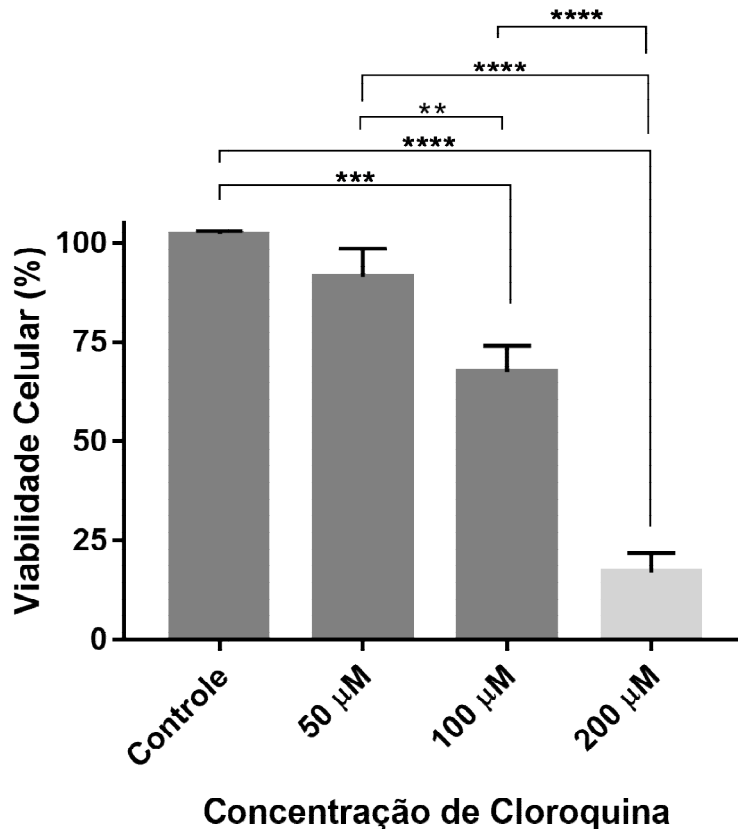


Figura 15 – **Teste de viabilidade celular.** Viabilidade celular dependente da concentração de Cloroquina após 24h de exposição. ** $p < 0,005$, *** $p = 0,0005$, **** $p = 0,0001$.

4.1.2 Caracterização da nanoemulsão com Rodamina

As nanopartículas NERod foram caracterizadas com relação ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta com a finalidade de avaliar a

possível interferência do corante fluorescente (Rodamina 6G) na caracterização das nanogotículas dispersas na nanoemulsão utilizada no experimento *in vitro*. Os resultados da dispersão de tamanho e do potencial zeta estão representados na Figura 16.

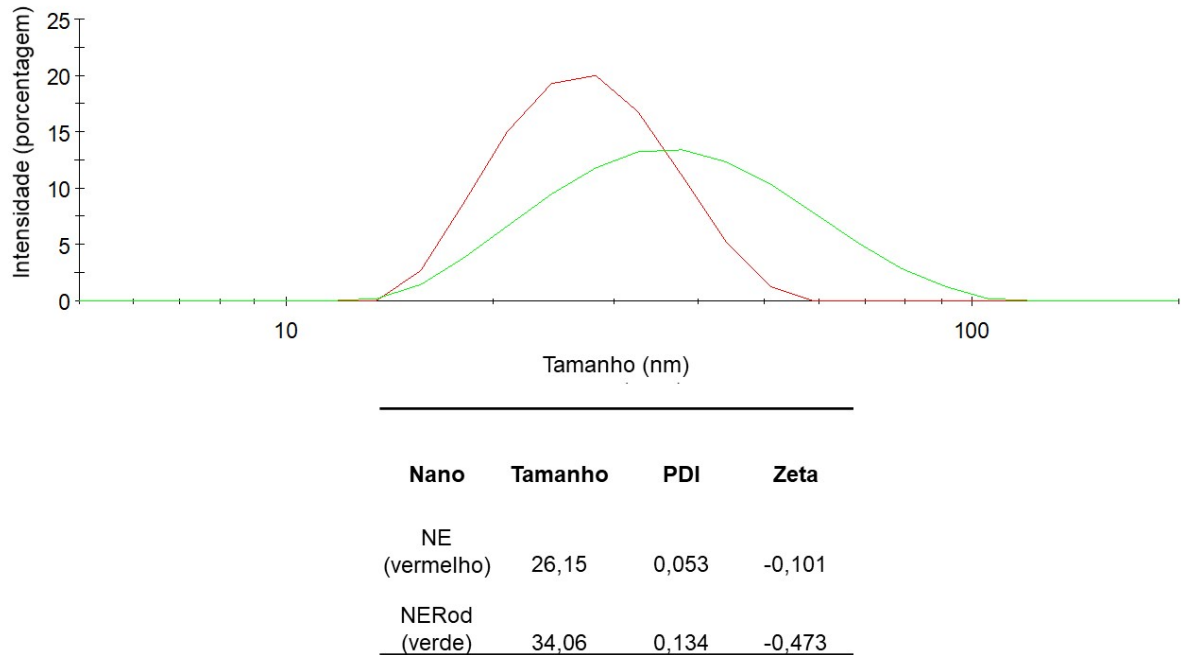


Figura 16 - Caracterização da nanoemulsão branca e nanoemulsão com rodamina. Distribuição e avaliação do tamanho, PDI e potencial zeta de NE e NERod. O gráfico representado em vermelho se refere à NE branca e em verde à NERod.

4.1.3 Avaliação no EVOS do grupo Zimosan

Os resultados para avaliar a modulação da Cloroquina na fagocitose e mudanças morfológicas nas células de macrófagos murinos RAW 264.7 utilizando o equipamento EVOS para captura microscópica das células em cada grupo e efeito de comparação mostrou algumas diferenças entre os grupos (Figura 17).

A Figura 17 demonstra que a Cloroquina não provocou alterações morfológicas significativa nas células RAW 264.7 (Figura 17C) em comparação às células do grupo controle (Figura 17A). Quando as células são expostas ao Zimosan, observamos um acúmulo de vesículas fagocitárias vermelhas dispostas no citoplasma das células RAW 264.7 (Figura 17B). Não obstante, ao aplicar a Cloroquina antes do Zimosan, estas vesículas vermelhas não são observadas no citoplasma das células (Figura 17C). Como controle experimental, as células

expostas a Citocalasina, um inibidor clássico de fagocitose, também inibe a fagocitose das partículas de Zimosan (Figura 17F).

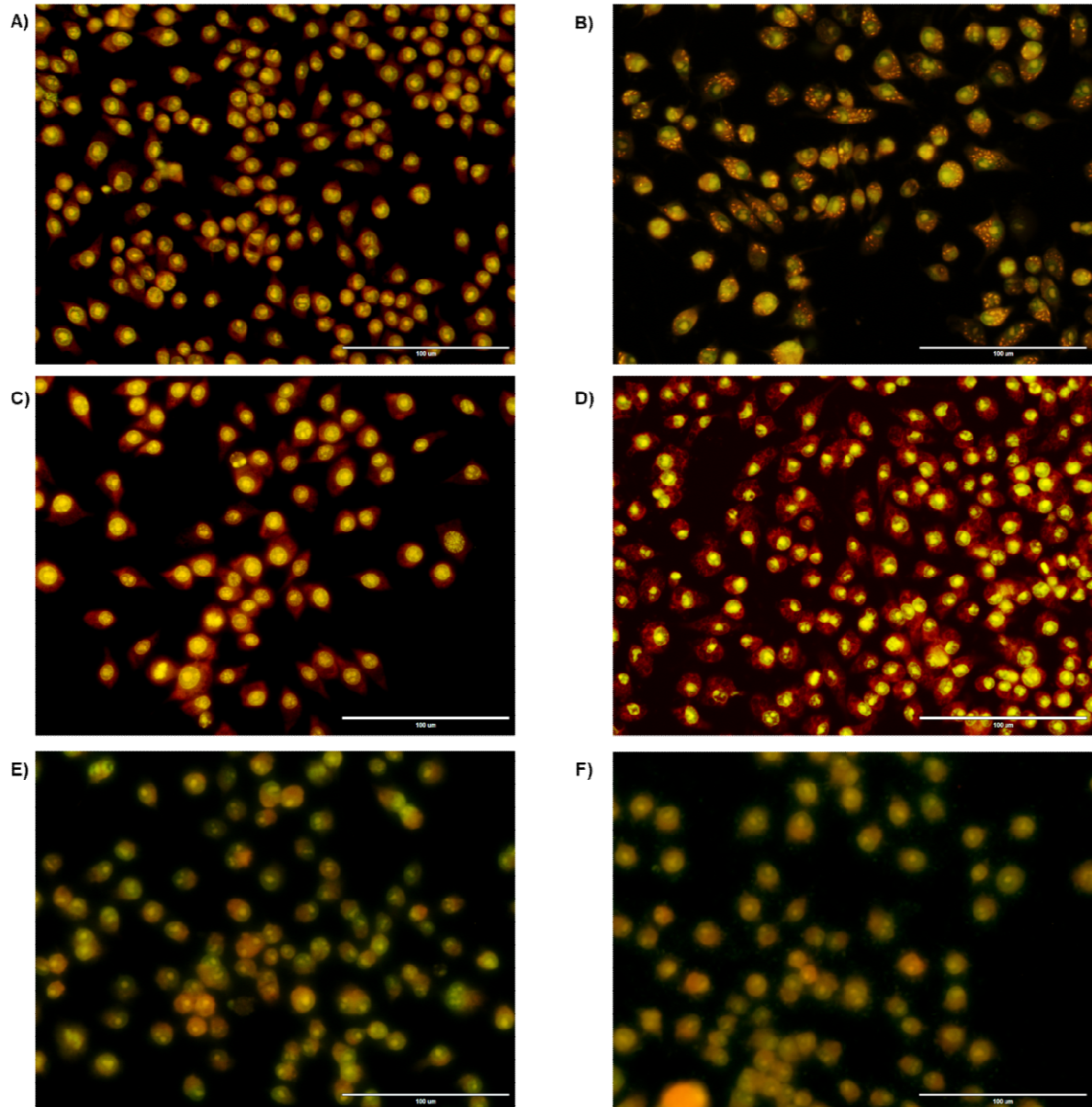


Figura 17 - Avaliação do efeito da Cloroquina com o Zimosan. A) Controle. B) Zimosan. C) CQN. D) CQN + Zimosan. E) CTK. F) CTK + Zimosan. As células foram coradas com 5 μM de Laranja de Acridina. Aumento de 40x, barras representam 100 μm.

Quando é comparado a fagocitose de partículas de Zimosan em luz com contraste de fase é possível visualizar as partículas que não foram fagocitadas. Selecionando os filtros para detectar o vermelho e o verde do Laranja de Acridina as partículas de Zimosan extracelulares não são identificadas, tornando possível a melhor visualização entre partículas fagocitadas e não fagocitadas (Figura 18).

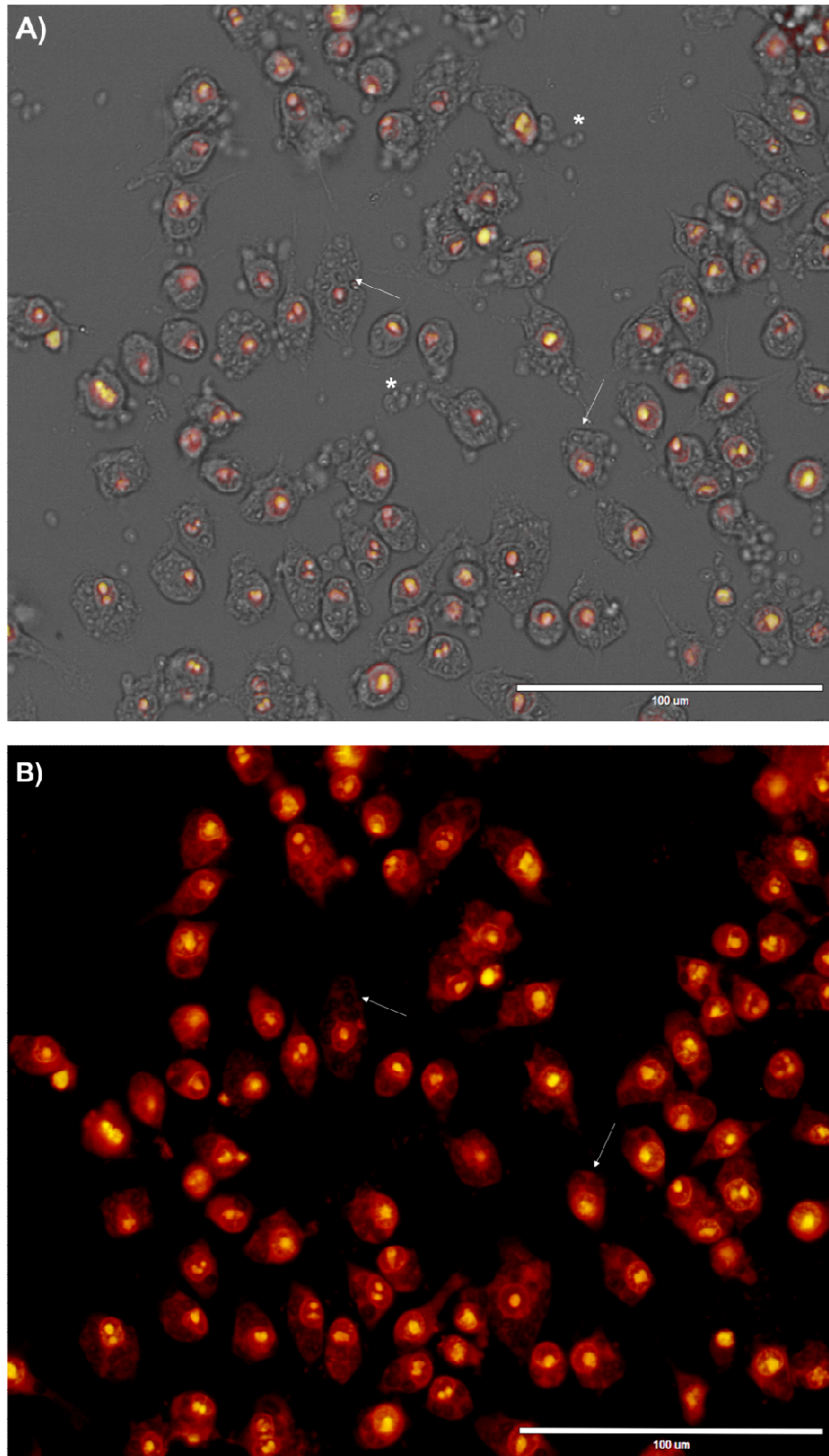


Figura 18 - Zimosan fagocitado por RAW 264.7 com diferentes métodos de microscopia. A) Microscopia por contraste de imagem do grupo CQN + Zim. **B)** Microscopia de fluorescência do grupo CQN + Zim. As setas indicam o Zimosan sendo fagocitado e os asteriscos representam o Zimosan extracelular. Aumento de 40x, barras representam 100 µm.

As partículas de Zimosan quando são fagocitadas adquirem a cor vermelha ou alaranjada nos fagossomos, desde que não haja a presença de Cloroquina ou Citocalasina (Figura 19A). Quando é inserida a Cloroquina no meio são apenas identificados os fagossomos com o Zimosan, mas sem a cor vermelha (Figura 19B).

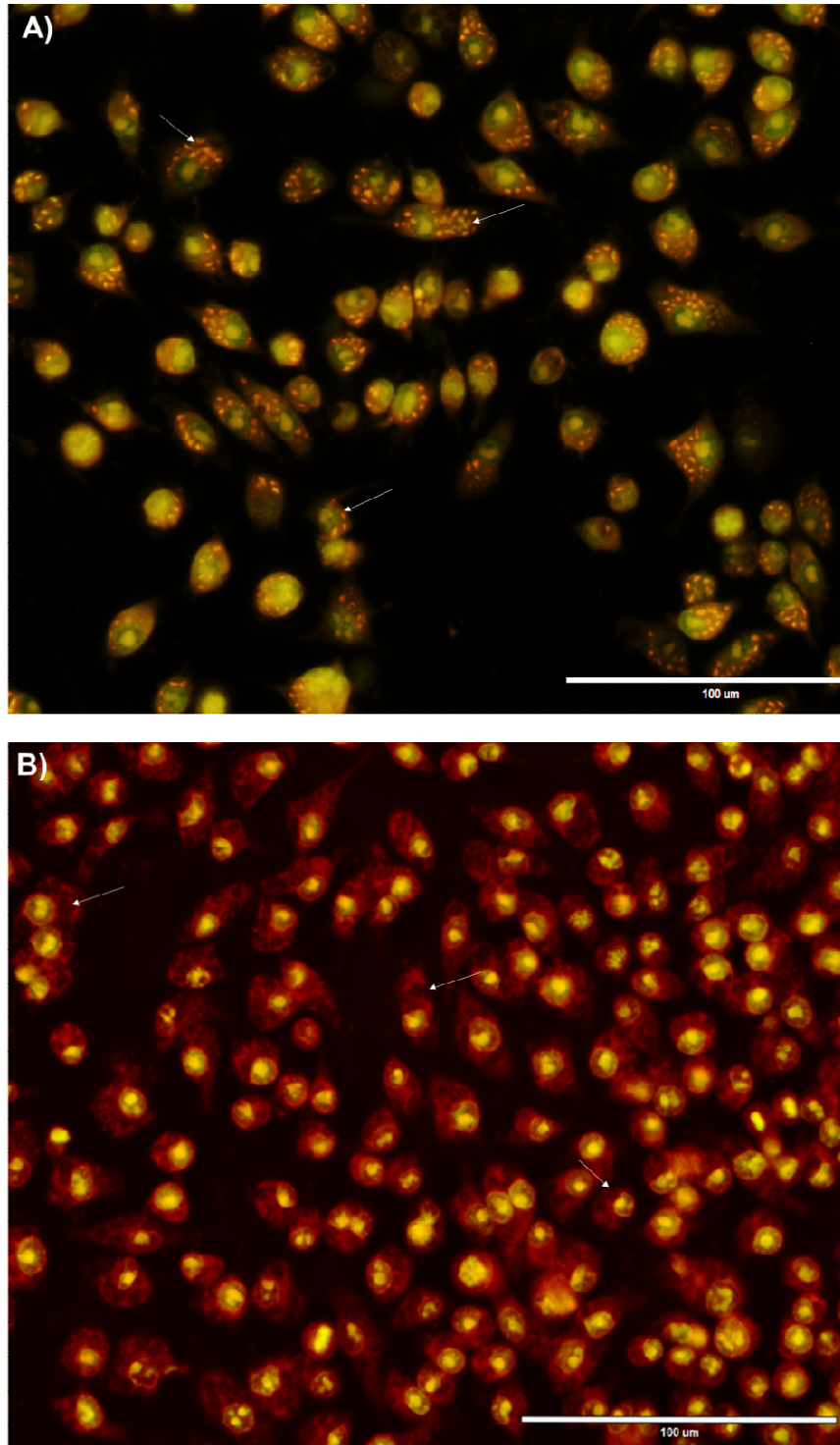


Figura 19 - Comparação entre RAW 264.7 fagocitando Zimosan em meio ácido e menos ácido. A) Representa o grupo Zim, as setas nas regiões vermelhas indicam o Zimosan sendo fagocitado em meio ácido. B) grupo CQN + Zim fagocitando Zimosan em meio menos ácido, as setas indicam Zimosan sendo fagocitado em meio menos ácido. Aumento de 40x, barras representam 100 µm.

Desta maneira, a CQN alterou *in vitro* a forma como o Zimosan é incorporado em células de macrófagos murinos RAW 264.7. Para as células tratadas com CTK não observamos nem o Zimosan, nem as vesículas de fagocitose formadas, indicando que o processo de fagocitose é inibido em diferentes pontos do processo (Figura 17F).

4.1.4 Quantificação de partículas fagocitadas

A fim de avaliar se além da mudança da cor das partículas internalizadas houve mudança no número de fagocitadas foi quantificado o número de Zimosan incorporado pelas células dos grupos Zim e CQN + Zim (Figura 20). De acordo com a Figura 20, houve uma redução na fagocitose das partículas de Zimosan quando as células foram expostas com 100 μ M do fármaco Cloroquina.

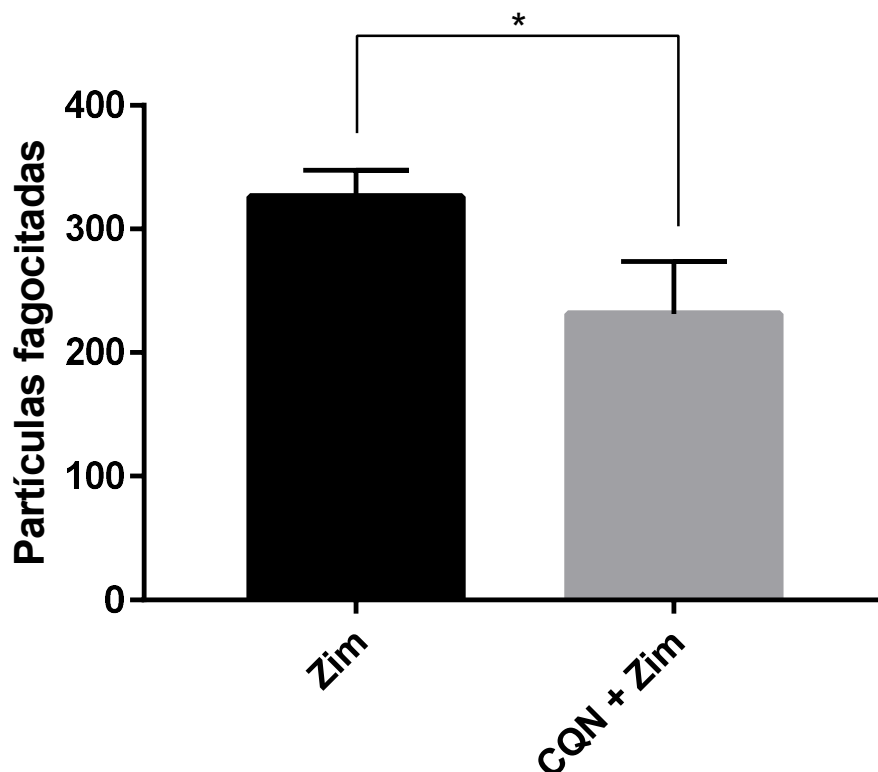


Figura 20 - Internalização de partículas de Zimosan. Comparação da fagocitose de Zimosan entre os grupos Zim e CQN + Zim a cada 70 células de RAW 264.7 em triplicata. * $p < 0,02$.

4.1.5 Avaliação no EVOS do grupo NERod

Para a modulação da Cloroquina na fagocitose e mudanças morfológicas em RAW 264.7 no grupo experimental com NERod foi utilizado o equipamento EVOS, afim de analisar a incorporação de NE através da emissão de fluorescência do marcador fluorescente Rodamina 6G previamente associado à nanoemulsão quando estão em meio com RAW 264.7.

Não foi identificada nenhuma alteração morfológica nas células com a presença de NERod. A NERod foi incorporada nas células RAW 264.7, pois a cor vermelha-alaranjada esta presente no citoplasma (Figura 21).

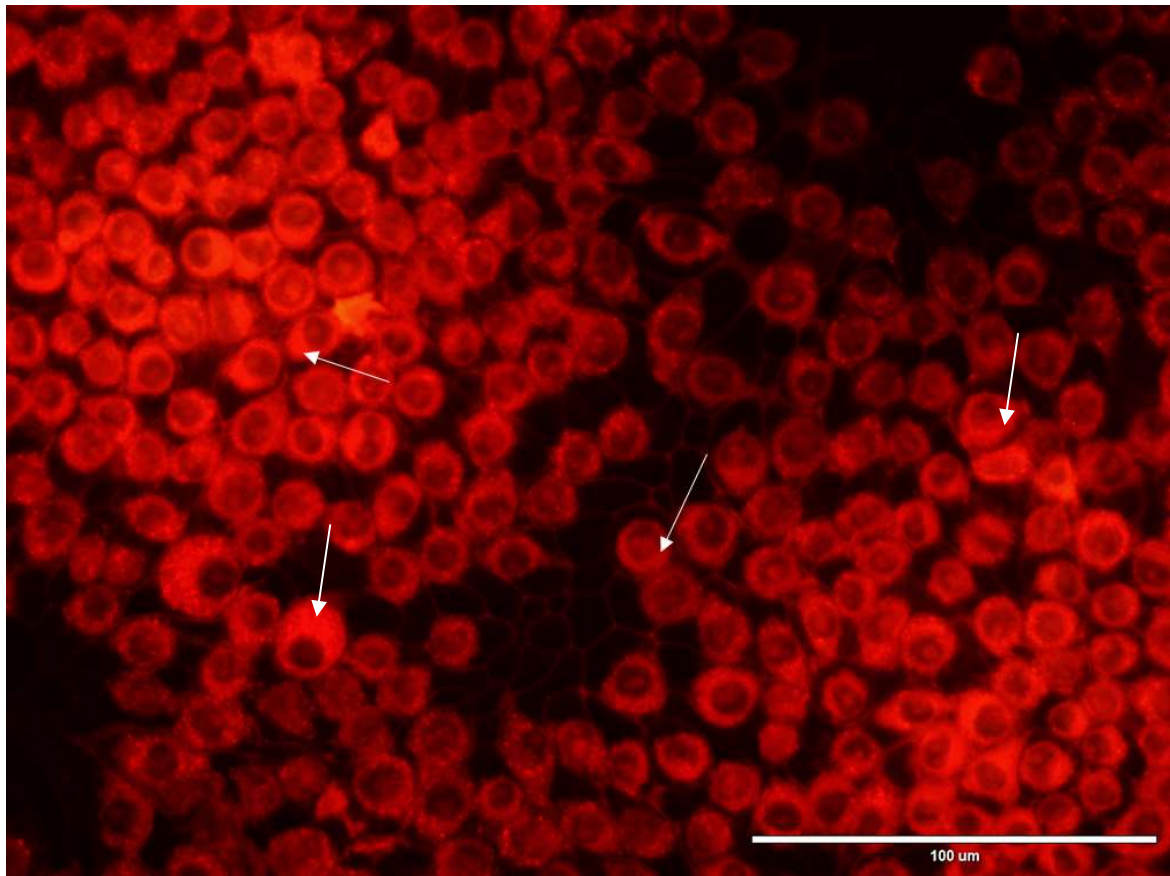


Figura 21 - Células RAW 264.7 incorporando NERod. As setas indicam a coloração da Rodamina 6G no citoplasma, indicando que a NERod foi incorporada. Aumento de 40x, barras representam 100 μ m

A administração dos inibidores de endocitose Cloroquina e Citocalasina não modificaram a forma de incorporação da NERod em células de macrófagos RAW 264.7 *in vitro* conforme demonstra a Figura 22.

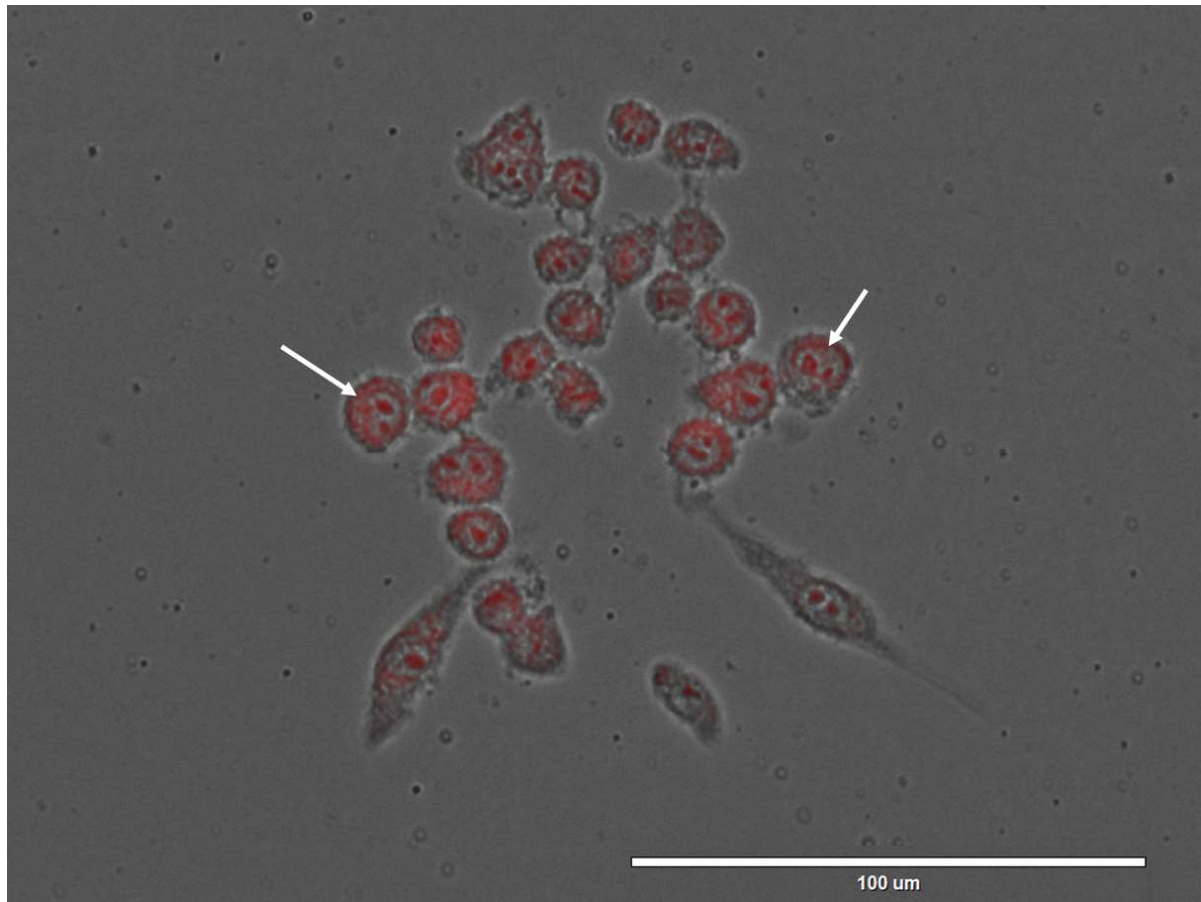


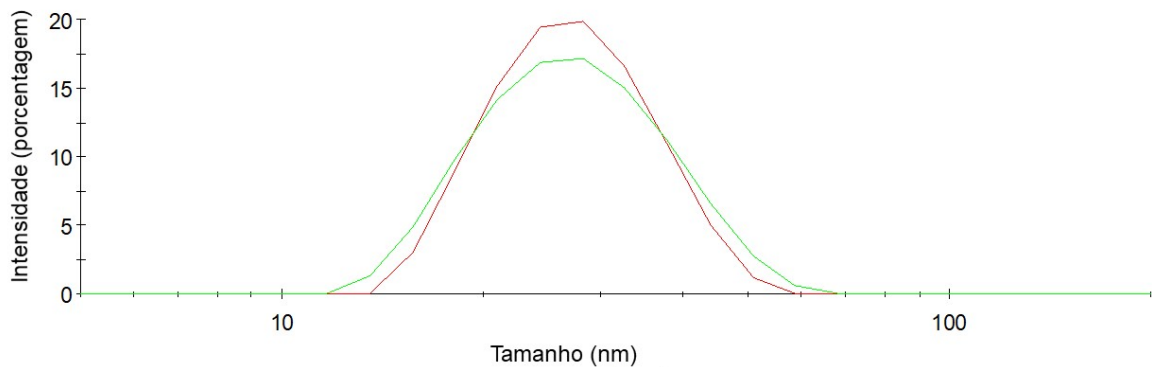
Figura 22 - Avaliação da cloroquina na fagocitose de NERod. Grupo CQN + NERod que recebeu CQN antes da administração de NERod. Setas indicam que NERod se interiorizou apesar do inibidor de endocitose CQN. Os mesmos resultados foram observados com citocalasina.

A NERod continuou sendo incorporada nos macrófagos murinos mesmo após a tentativa de inibição da endocitose, visto que a emissão de fluorescência de NERod no citoplasma das células continuaram sendo detectadas pelo EVOS.

4.2 *In vivo*

4.2.1 Caracterização da nanoemulsão com DiR

A NEDiR foi caracterizada com relação ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial Zeta com a finalidade de avaliar a possível interferência do corante fluorescente DiR na caracterização das nanogotículas dispersas na nanoemulsão utilizada no experimento *in vivo* (Figura 22).



Nano	Tamanho	PDI	Zeta
NE (vermelho)	26,15	0,053	-0,101
NEDiR (verde)	26,05	0,045	-3,62

Figura 23 - Caracterização da NE e NEDiR. Distribuição e avaliação do tamanho, PDI e potencial Zeta de NE e NEDiR. O gráfico representado em vermelho se refere à NE branca e em verde à NEDiR.

4.2.2 Avaliação na Tomografia por Fluorescência Molecular

A administração de DiR e NEDiR com e sem Cloroquina foi realizada com a intenção de analisar o perfil de biodistribuição em regiões do fígado, pulmão e da região de administração em camundongos Balb/C fêmeas (Figura 24). Como a cloroquina tem efeitos de um inibidor de endocitose esperava-se uma menor captura de nanopartículas pelo SFM do fígado em camundongas Balb/C.

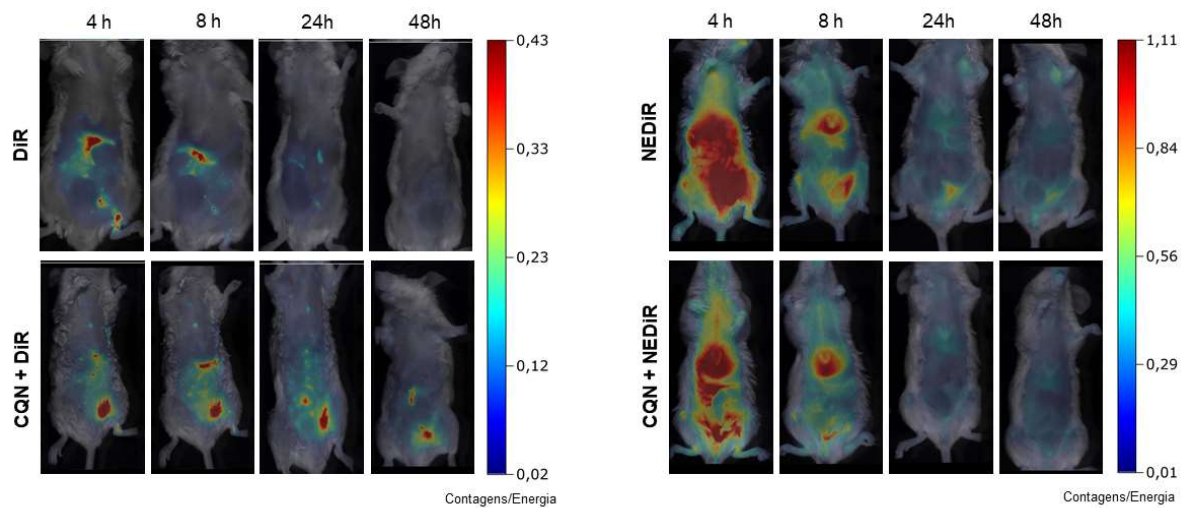


Figura 24 - Imagens *in vivo* das regiões ventrais de camundongos. Visualização das imagens capturadas nos tempos de 04, 08, 24 e 48 horas após a injeção intraperitoneal de NEDiR e DiR livre com e sem a administração prévia de CQN.

Nos grupos que receberam NEDiR é possível identificar visualmente uma maior intensidade de fluorescência em comparação com o grupo administrando com DiR livre.

4.2.3 Quantificação da intensidade de fluorescência

Após a coleta no FMT das tomografias 2D dos camundongos em diferentes tempos demonstrou-se quantitativamente a biodistribuição de NEDiR e DiR livre com e sem o inibidor de endocitose Cloroquina. Em todos os tempos analisados foram realizadas três leituras na região ventral de cada animal para quantificar a fluorescência da região da área administrada, fígado e pulmão. Essa quantificação da fluorescência foi dada na unidade Contagens/Energia.

Os dados da quantificação de Contagens/Energia na região administrada demonstraram que não houve diferença significativa em nenhum grupo ao longo dos tempos do experimento de 4, 8, 24 e 48h (Figura 25A), contudo ao gerar o gráfico da área sob a curva dos gráficos gerados constatou que ao longo do tempo houve diferença significativa entre os grupos que recebeu DiR ou NEDiR (Figura 25B).

A área sob a curva (integral) dos gráficos de Contagens/Energia pelo tempo do experimento fornece um resultado ao longo de todo o experimento e não só pontualmente em um tempo estudado.

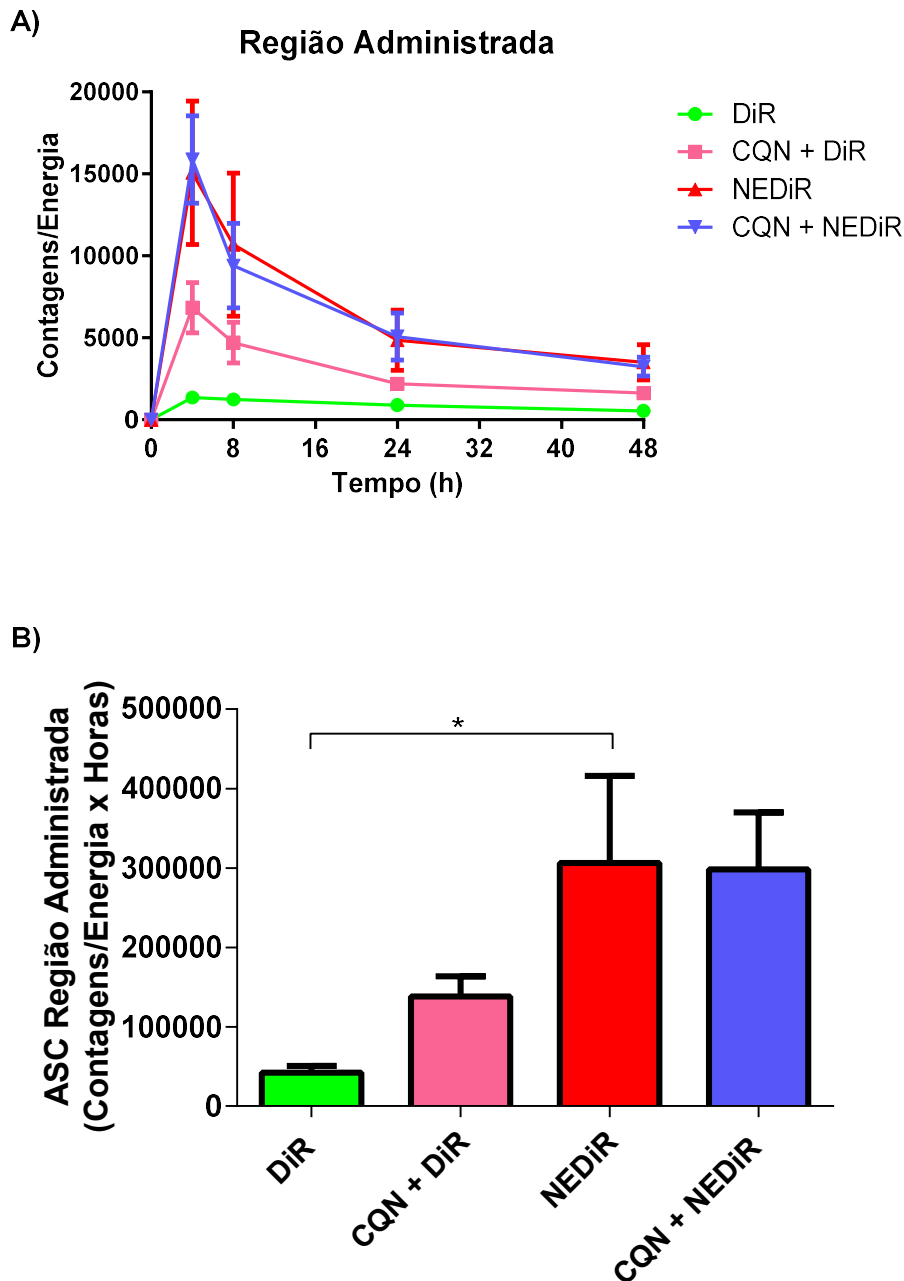


Figura 25 - Intensidade de fluorescência na região administrada após injeção intraperitoneal de DiR livre e NEDiR. A) O gráfico representa quantitativamente a intensidade de fluorescência na região de administração nos tempos 04, 08, 24 e 48h. B) Área sob a curva da região de administração ao longo do tempo de 04, 08, 24 e 48h. Asterisco (*) indica $p < 0,05$.

A quantificação de Contagens/Energia na região do fígado provou que houve diferença significativa nos grupos NEDiR e CQN + DiR ao longo do tempo de 8, 24 e 48h (Figura 26A). O gráfico da área sob a curva (ASC) desse experimento mostrou, todavia, que houve diferença significativa ao longo do tempo total do experimento entre todos os grupos (Figura 26B).

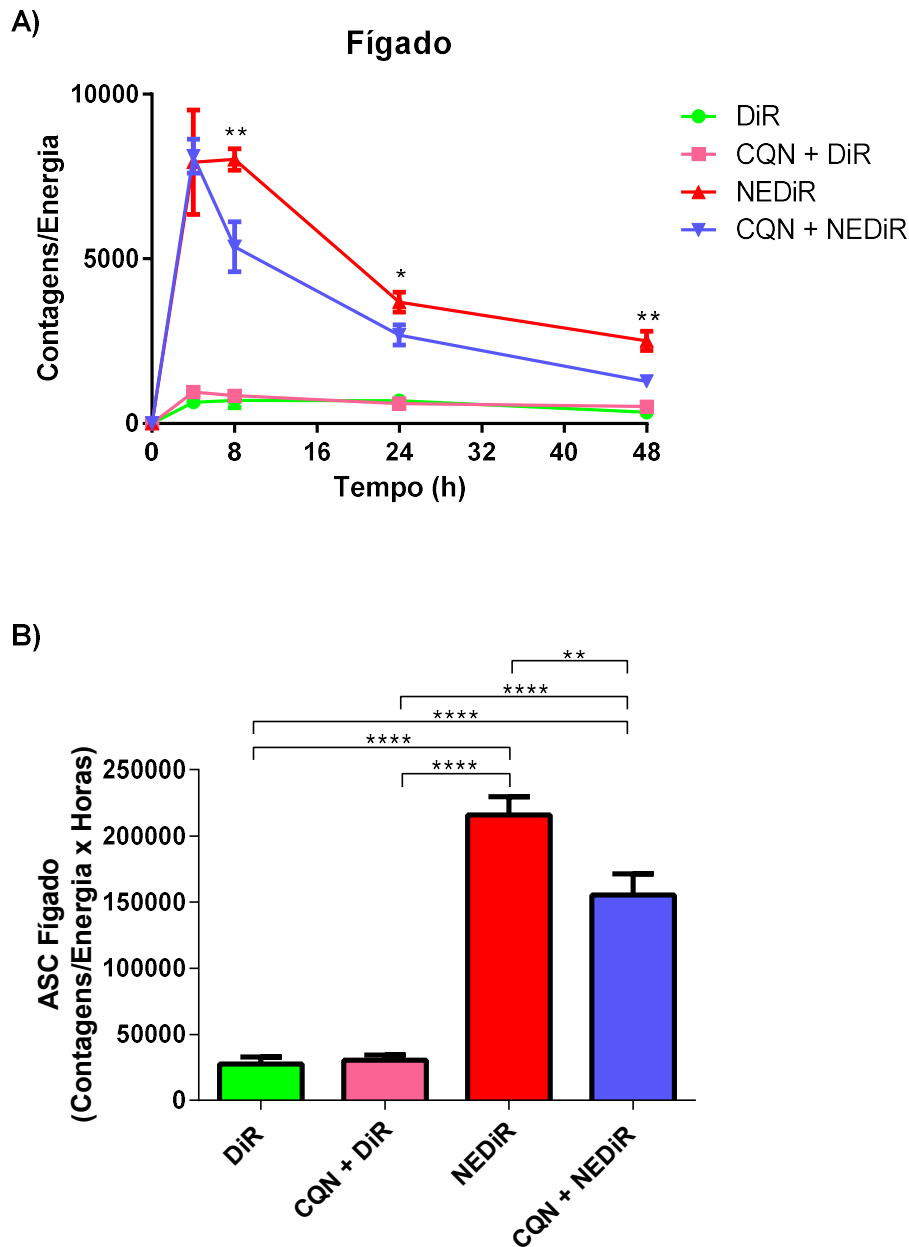


Figura 26 - Intensidade de fluorescência no fígado após injeção intraperitoneal de DiR livre e NEDiR. A) O gráfico representa quantitativamente a intensidade de fluorescência nos tempos 04, 08, 24 e 48h. Os asteriscos do gráfico A representam em 24h (*) $p=0,028$, em 8h (**) $p=0,0023$ e 48h $p=0,0016$. B) Área sob a curva da região do fígado ao longo do tempo de 04, 08, 24 e 48h. Os asteriscos do gráfico B representam ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$.

A quantificação da fluorescência na região do pulmão indicou que somente ocorreu aumento significativo no grupo CQN + NEDiR quando comparado com NEDiR no tempo de 4h (Figura 27A). Apesar disso, o gráfico da área sob a curva desse experimento, indicou que houve diferença significativa ao longo do tempo total

do experimento entre todos os grupos, exceto quando se correlaciona CQN + NEDiR e NEDiR (Figura 27B).

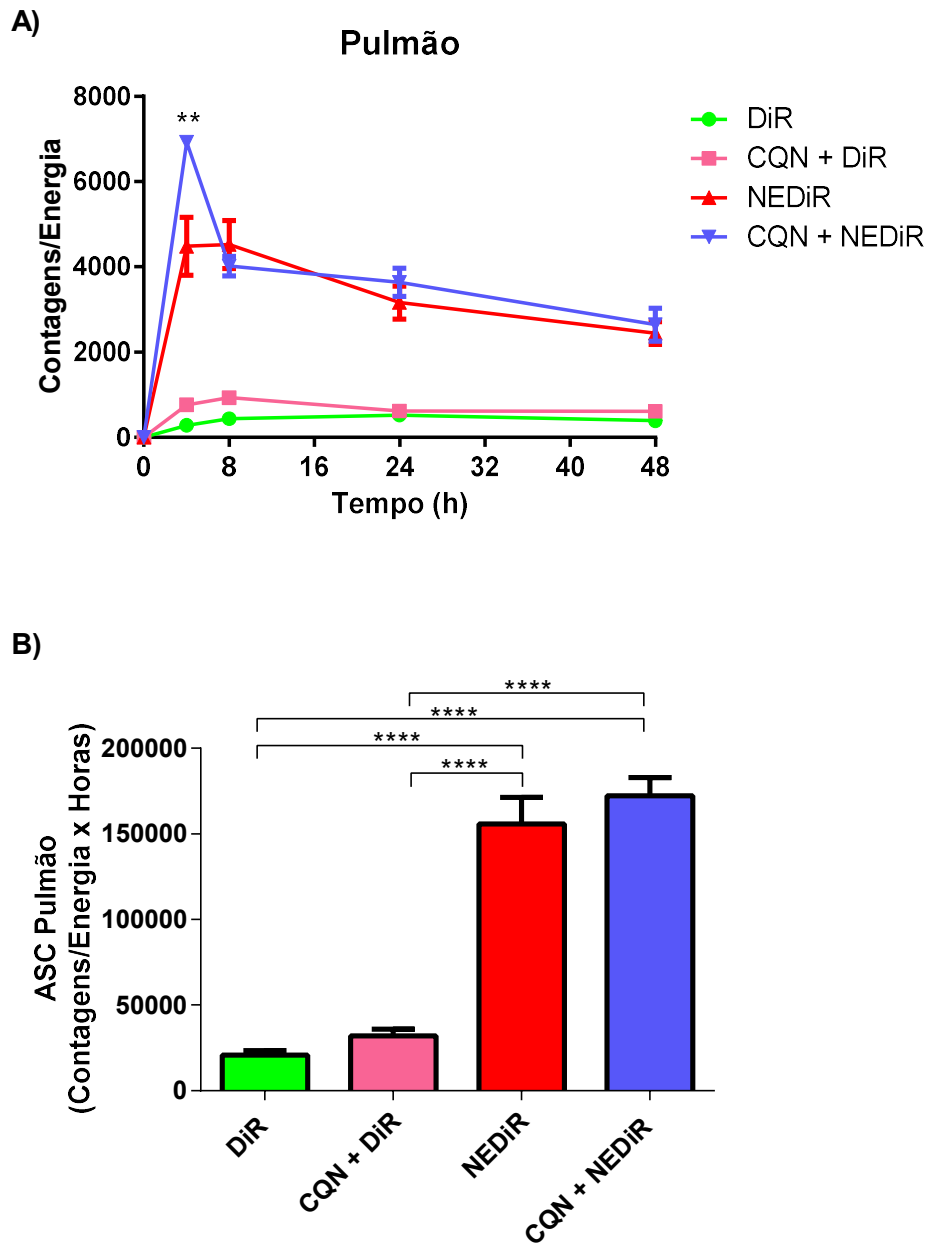


Figura 27 - Intensidade de fluorescência no pulmão após injeção intraperitoneal de DiR livre e NEDiR. A) O gráfico representa quantitativamente a intensidade de fluorescência nos tempos 04, 08, 24 e 48h. Os asteriscos do gráfico A (**) representam $p = 0,0023$. B) Área sob a curva da região do pulmão ao longo do tempo de 04, 08, 24 e 48h. Os asteriscos do gráfico B (****) representam $p < 0,0001$.

Os dados da quantificação do peso dos animais ao longo de todo o experimento demonstrou que não houveram diferenças significativas em nenhum

grupo (Figura 28A). Ao gerar o gráfico da área sob a curva da Figura 28A também se constatou que ao longo do tempo não houve diferença significativa entre nenhum grupo experimental (Figura 28B).

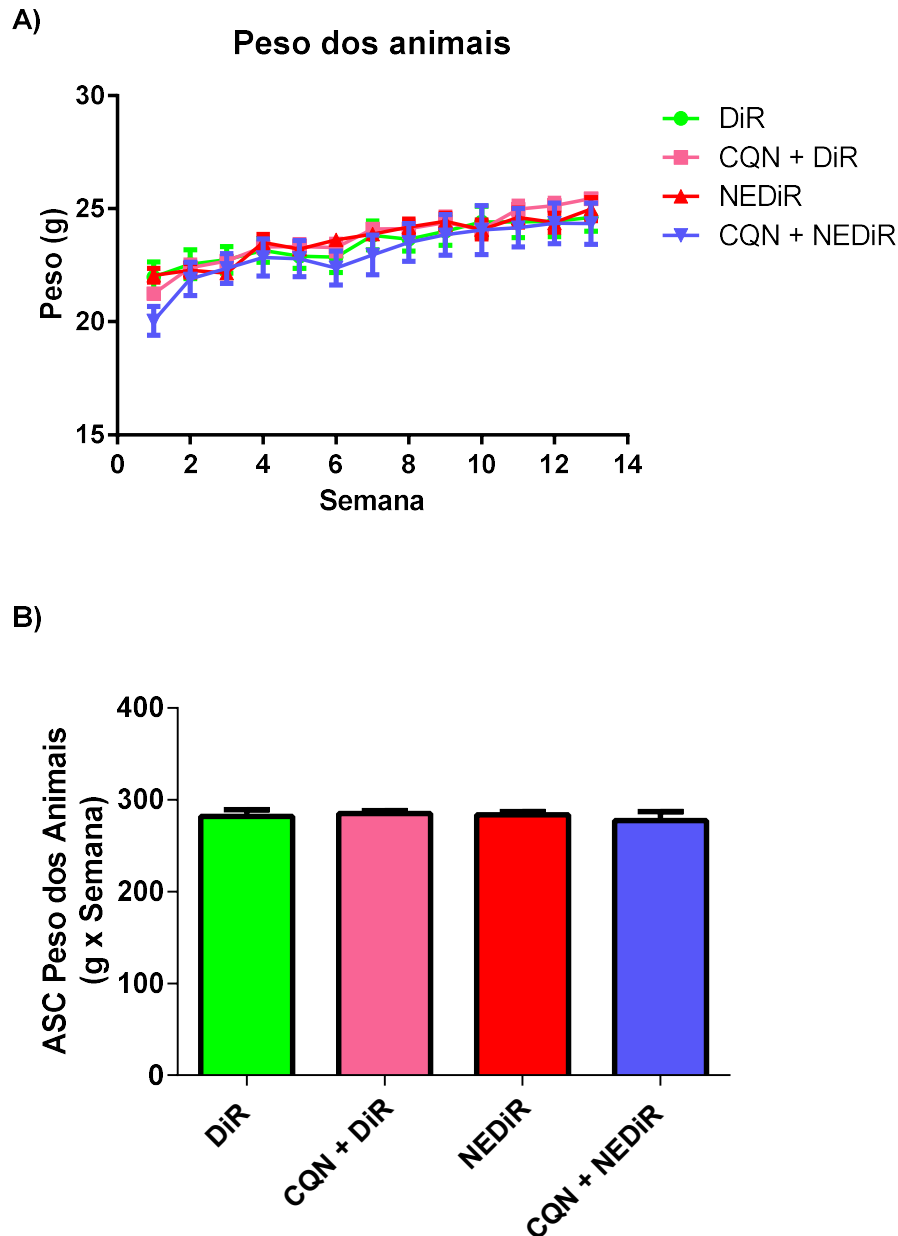


Figura 28 - Peso dos animais ao longo do experimento. A) Peso dos animais ao longo de todo o experimento. B) Área sobre a curva ao longo de todo o tempo do experimento. Não houve diferença estatística em nenhuma semana.

Os dados da quantificação da intensidade de fluorescência demonstraram que não houve diferença significativa nos grupos DiR e CQN + DiR em nenhuma

região nos tempos de 4, 8, 24 e 48h, portanto não houve nenhum efeito na biodistribuição de DiR ao se administrar a Cloroquina previamente. Todavia nos grupos NEDiR e CQN + NEDiR houve diferença significativa de NEDiR tanto no fígado, ao longo do tempo, quanto no pulmão no tempo de 4h.

Ao integrar, separadamente, os dados dos gráficos 24A, 25A, 26A e 27A e obter as áreas sob as curvas e dispor-as em gráficos de coluna (24B, 25B, 26B, 27B) é possível analisar o efeito desse experimento ao longo de todo o tempo e não só pontualmente.

5 DISCUSSÃO

Os fagócitos são componentes chaves que determinam aspectos importantes na exposição de nanopartículas, iniciando a depuração e afetando a biodistribuição. O estudo das correlações na captação de nanopartículas por mecanismos de processamento e depuração por macrófagos fornecem uma base para superar décadas de frustração na entrega e direcionamento sistêmico de nanopartículas e facilita o desenvolvimento de novos nanossistemas mais eficazes e mais seguros (GUSTAFSON et al., 2015).

A associação de nanopartículas com o meio biológico *in vivo* esta altamente relacionada com o sistema fagocitário mononuclear devido a opsonização de partículas em contato com sangue e rápido reconhecimento dessas opsoninas via SFM (MORTIMER et al., 2014). Isto é particularmente observado nas células de Kupffer do fígado e macrófagos esplênicos (BRILEY-SAEBO et al., 2004).

Diante dessa barreira posta pelo SFM a Cloroquina foi utilizada neste estudo para bloquear temporariamente a ação desses fagócitos e aproveitado o seu direcionamento específico para macrófagos do SFM, visto que em ratos, verificou-se que a Cloroquina se acumula em altos níveis no fígado e baço (ADELUSI; SALAKO, 1982; YOON et al., 2010).

A concentração de Cloroquina 100 μM utilizada nos estudos *in vitro* foi baseada em publicações prévias da literatura (WOLFRAM et al., 2017). Esta concentração demonstrou ser uma concentração tolerável pelas células RAW 264.7, tendo promovido uma citotoxicidade próxima a 30% nos ensaios realizados. A toxicidade apresentada pode estar relacionada ao bloqueio transitório das atividades endocíticas e bloqueio de algumas vias lisossomais, o que prejudica algumas vias metabólicas necessárias para o bom funcionamento da maquinaria celular. Apesar desta toxicidade no nível de culturas celulares, a Cloroquina vem sendo utilizada clinicamente há décadas para o tratamento de diferentes tipos de doenças (PASCOLO, 2016).

Após a determinação das concentrações para o uso da Cloroquina, avançamos para as avaliações da atividade deste fármaco nos processos de fagocitose *in vitro*. Para tal, selecionamos uma metodologia clássica, que utiliza o Zimosan como modelo de fagocitose *in vitro*. O Zimosan é um fragmento de parede celular fúngica utilizada como modelo de estudo de fagocitose em macrófagos,

inclusive na linhagem RAW 264.7 (J; M, 1978; SIGOLA et al., 2016). Neste trabalho a Cloroquina alterou o perfil de fagocitose de Zimosan pelos macrófagos murinos no teste *in vitro* para o grupo Zimosan, mostrando ter um efeito inibitório da atividade fagocitária das células RAW 264.7.

A alteração dessa atividade fagocitária pode ser qualitativamente confirmada com o marcador utilizado no teste *in vitro*. O Laranja de Acridina emite luz fluorescente vermelha ou alaranjado quando está contido no interior de lisossomos ácidos (PIERZYŃSKA-MACH; JANOWSKI; DOBRUCKI, 2014). Sabendo que a CQN inibe a fusão entre autofagossomos e lisossomos bloqueando a degradação lisossômica via aumento do pH intralissossômico (RUBINSZTEIN et al., 2009), pode ser que esse bloqueio e mudança do pH tenha alterado a cor dos fagossomos não ácidos quando não há somente a presença do Zimosan.

A CQN é uma base fraca que se torna desprotonada e se aprisiona nos lisossomos, causando uma disfunção, aumentando o pH lisossômico (AMARAVADI et al., 2011). Uma vez que o lisossomo é geralmente o compartimento final do processo de endocitose (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010) é provável que por esse motivo as células RAW 264.7 tenham sofrido alteração na fagocitose de Zimosan. Entretanto, a CQN inibe proteínas envolvidas com estágios iniciais da endocitose (WOLFRAM et al., 2017), assim sendo também pode ser um dos fatores para a menor atividade fagocitária das partículas de Zimosan.

Dentro do contexto do estudo de inibição de fagocitose *in vitro*, utilizamos controles para avaliar este processo. Como controle positivo, foi utilizado a citocalasina, um composto com atividade de inibição de endocitose. A citocalasina é um inibidor de amplo espectro da polimerização dependente de actina, e já foi demonstrado que é capaz de bloquear fagocitose, macropinocitose, endocitose dependente de clatrina e endocitose dependente de caveolina (GRATTON et al., 2008). Nesse sentido, este bloqueador endocítico atua em processos celulares diferentes aos da Cloroquina, o que pode ajudar a explicar alguns resultados obtidos que serão discutidos em seguida.

Como resultados experimentais, nossos dados revelam que a citocalasina impediu a fagocitose de qualquer Zimosan visível, mas não alterou a captação de NERod. Como um dos mecanismos da citocalasina está relacionado a remodelação do citoesqueleto para a execução do processo endocítico (SCHLIWA, 1982), nossos

dados sugerem que parte da internalização das NERod ocorreu por um processo independente de endocitose. Dados prévios do nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS CÂMARA et al., 2017) corroboraram este resultado, onde foi observado que uma nanoemulsão muito semelhante à utilizada na presente dissertação era internalizada por um processo de difusão passiva pela membrana celular.

Após a realização desta primeira etapa de experimentos *in vitro*, passamos para a avaliação de biodistribuição *in vivo*. Nesta etapa experimental, utilizamos sistemas de rastreamento *in vivo* das nanoemulsões, o que permitiu ter uma ideia clara sobre a cinética de biodistribuição dos nanocarreadores com ou sem a exposição à Cloroquina, que é o objetivo central desta dissertação.

O imageamento *in vivo* tem a capacidade de estudar vários processos biológicos e químicos de maneira não invasiva com muitos fluorocromos. Por esse motivo, as tecnologias de imageamento são amplas e tornaram-se parte integrante do programa de avaliação de medicamentos e são comumente usadas nos estágios pré-clínico e clínico (BECKMANN; KALTASHOV; WINDHORST, 2017).

Anteriormente, os fluorocromos emitiam luz em comprimento de onda visível, muito absorvido pelos tecidos biológicos, o que mascarava a captação dos sinais fluorescentes. Um dos principais impactos na geração de informações moleculares do imageamento *in vivo* veio do desenvolvimento de fluorocromos que absorvem a luz próximo do infravermelho (MAHMOOD; WEISSLEDER, 2003). Isto posto, o fluorocromo DiR foi empregado aqui como corante para a biodistribuição *in vivo*, em razão de absorver a luz próximo do infravermelho.

Uma das vantagens relacionadas à utilização de sistemas de imageamento *in vivo* é a possibilidade de utilizarmos um número reduzido de animais, o que está de acordo com as tendências contemporâneas dos comitês de ética em pesquisa ao redor do mundo. Como este tipo de estratégia experimental, utilizamos os animais experimentais ao longo de todo o experimento, o que torna cada animal o seu próprio controle individual. Além disso, por existir uma variabilidade grande entre animais experimentais, reduzimos este erro, utilizando o mesmo animal experimental ao longo de todo o experimento. Nestas situações, o erro experimental, típico de metodologias envolvendo animais vivos é significativamente reduzido, o que aumenta a qualidade dos dados e confiança nos resultados (MCGRATH; MCLACHLAN; ZELLER, 2015).

Ademais, para estudos de imageamento *in vivo*, a utilização de fluoróforos infravermelhos é muito importante, pois emissões de fluorescência em outros comprimentos de onda são fortemente absorvidas pelas biomoléculas que compõem os tecidos biológicos. Nestas situações, os sinais fluorescentes não são captados pelos detectores dos equipamentos. Como solução, os corantes infravermelhos, emitem luz fluorescente em comprimentos de onda que apresentam pouca interferência com os tecidos biológicos, o que facilita o seu rastreamento em protocolos de imageamento *in vivo* (WEISSLEDER, 2001).

Os estudos de biodistribuição foram realizados com a nanoemulsão lipídica incorporando DiR (NEDiR) e com o marcador fluorescente infravermelho hidrofóbico livre (DiR). O DiR foi selecionado devido a sua afinidade com o ambiente hidrofóbico do núcleo da nanoemulsão, o que ajudou a marcação deste nanocarreador. Assim, o DiR é fácil e preferencialmente incorporado aos componentes lipídicos da NE (DE LIMA et al., 2018).

Com relação aos resultados obtidos, a grande diferença na detecção de fluorescência entre grupos que receberam somente DiR ou NEDiR indica que adveio da diferença de captação de DiR e NEDiR. Essa alteração pode ser verificada em trabalhos anteriores, pois resultados mostram que o sinal de DiR nas primeiras semanas são maiores que de NEDiR, o oposto do aqui verificado (RADICCHI et al., 2018).

No que diz respeito à atividade da Cloroquina, ponto central desta dissertação, observamos que ela modulou negativamente a captação de NEDiR pelo fígado. Essa redução foi estatisticamente significativa, corroborando a nossa hipótese central. O elemento que suporta este resultado é a grande concentração de células fagocitárias no tecido hepático (ZHANG et al., 2016). Como destacado anteriormente, os macrófagos residentes no fígado, denominados de células de Kupffer, perfazem aproximadamente 80% dos macrófagos do SFM (BIOZZI; STIFFEL, 1965). Devido a esta alta concentração de macrófagos, é natural que a Cloroquina, como um ativo inibidor de endocitose, tenha impacto sobre este órgão.

Além disso, os resultados obtidos para a biodistribuição do tecido pulmonar reforçam a ideia de inibição das células de Kupffer. Apesar do aumento pontual no pulmão no grupo CQN +NEDiR no tempo de 4h, na análise da área sob a curva indicando o acúmulo total de material, não observamos estas diferenças. Nossa

hipótese para este fato é que apesar do pulmão apresentar uma vascularização maior que o fígado, este órgão aéreo não apresenta a quantidade de macrófagos residentes, como ocorre no fígado. Nesse sentido, a CQN não teria alvos celulares suficientes para impactar a concentração de NEDiR no pulmão.

Uma observação importante é que atribuímos esse aumento de fluorescência no pulmão no tempo de 4h no grupo CQN + NEDiR pelo fato dele ter recebido o antimalárico, com isso teve uma menor captação da nanoemulsão pelas células de Kupffer hepáticas e maior disponibilidade para o pulmão durante algum tempo. Este e outros resultados sustentam o fato de que o antimalárico, com um perfil de segurança conhecido e usado em pacientes há mais de 70 anos, é capaz de diminuir a depuração de nanopartículas pelo SFM (KITCHEN; VAUGHN; SKILLMAN, 2006).

Em termos gerais, a CQN utilizada nesta dissertação de mestrado promoveu uma redução na captação de 30% de partículas de Zimosan fagocitadas *in vitro*, porém a CQN não foi capaz de inibir a endocitose da NERod nos modelos de cultura de células. Apesar deste resultado *in vitro*, os nossos dados *in vivo* demonstram que a CQN foi capaz de reduzir em 29% a captação de NEDiR pelos tecidos hepáticos. Comparando com a literatura, observamos resultados semelhantes com redução de até 58% na captação de partículas de silicone pelas células de Kupffer *in vitro* e 22% de redução da mesma partícula no fígado quando se administra previamente a CQN (WOLFRAM et al., 2017). Isso comprova que estes nossos resultados são comparáveis aos dados de referência da literatura.

O efeito da CQN observado na captação da nanoemulsão *in vivo* não foi o mesmo observado *in vitro*; provavelmente porque em *in vivo* a NEDiR é envolta em proteínas plasmáticas, formando a proteína corona mudando assim o perfil de química de superfície e consequente captação das nanopartículas pelas células de Kupffer. Ademais, também é possível que a molécula DiR incorporada com a NE esteja alterando sua interação com proteínas plasmáticas e por conseguinte o seu reconhecimento pelo SFM.

Estratégias similares ao uso da Cloroquina foram testadas por outros grupos da literatura. Este é o caso da administração prévia de Clodronato Dissódico, um inibidor da atividade fagocitária de macrófagos. No entanto, apesar de ter uma maior redução na captação de nanopartículas comparado com a Cloroquina foi

demonstrado que a depleção completa das células de Kupffer causa efeitos colaterais adversos e até óbitos em camundongos. O uso da Cloroquina se apresenta mais vantajoso, pois inibe a atividade fagocitária de forma transitória. Nesse sentido, após o efeito do fármaco, a atividade dos macrófagos retorna ao seu estado normal (LI et al., 2016; WOLFRAM et al., 2017).

Outro ponto de interesse foi com relação às concentrações de CQN utilizadas. Os camundongos deste estudo receberam uma dose de Cloroquina seguindo os padrões do *Food and Drug Administration* (FDA) e menor que a dose humana padrão para o tratamento da malária (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008). Notavelmente, em condições clínicas, a CQN é administrada diariamente em pacientes com várias condições de doenças autoimunes. A grande preocupação de segurança nesses pacientes é o dano ocular devido à acumulação de Cloroquina no epitélio pigmentar da retina (RAINSFORD et al., 2015).

Vale ressaltar que tratamentos contra o câncer com altas doses de Cloroquina em combinação com quimioterapia por longos períodos de tempo demonstraram perfis de toxicidade aceitáveis em pacientes com câncer (MONTANARI et al., 2014). Logo, é provável que a combinação da Cloroquina com nanoterapêuticos para o câncer, com objetivo de reduzir a captação hepática e aumentar o tempo de meia-vida plasmática dos quimioterápicos, seja tolerável e confira vantagens terapêuticas em protocolos de administração de nanocarreadores para a área de oncologia.

6 CONCLUSÃO

A Cloroquina é um medicamento clinicamente aprovado, administrado por via oral, usado para prevenir ou tratar pacientes com malária. Este medicamento solúvel em água pode ser usado para controlar os níveis de endocitose por partículas *in vitro* e *in vivo*. Dentro dos objetivos e hipóteses apresentadas nesta dissertação, podemos concluir que:

1. Os experimentos *in vitro* mostraram que o processo de fagocitose de Zimosan por macrófagos RAW 264.7 foi alterado após a exposição prévia das células ao fármaco Cloroquina;
2. Apesar da conclusão anterior, este efeito não foi observado ao se utilizar a NERod após a exposição prévia do fármaco;
3. A administração da Cloroquina intraperitoneal em camundongos balb/C antes de se injetar a NEDiR foi capaz de diminuir a quantidade de nanoemulsão retida no fígado alterando assim o perfil de biodistribuição dessa nanopartícula *in vivo*.

Portanto, alterando o perfil de biodistribuição é possível transpor esse tipo de técnica para o tratamento do câncer a fim de diminuir o efeito de retenção de nanopartículas pelo sistema fagocitário mononuclear e, por conseguinte, direcionando os nanoterapêuticos para outras regiões de interesse.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELUSI, S. A.; SALAKO, L. A. Tissue and blood concentrations of chloroquine following chronic administration in the rat. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 34, n. 11, p. 733–735, 1982.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 593–623, 1999.

AMARAVADI, R. K. et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 2, p. 326–336, 2007.

AMARAVADI, R. K. et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. **Clinical cancer research**, v. 17, n. 4, p. 654–666, 2011.

AMOOZGAR, Z.; YEO, Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 4, n. 2, p. 219–233, 2012.

ANSELMO, A. C. et al. Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells. **ACS nano**, v. 7, n. 12, p. 11129–11137, 2013.

ARNIDA, M. M. et al. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 417, 2011.

BECKMANN, N.; KALTASHOV, I. A.; WINDHORST, A. D. In vivo imaging in pharmacological research. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 511, 2017.

BENINGO, K. A.; WANG, Y. Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. **Journal of cell science**, v. 115, n. 4, p. 849–856, 2002.

BERTRAND, N.; LEROUX, J.-C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 2, p. 152–163, 2012.

BIOZZI, G.; STIFFEL, C. Chapter 13 - The Physiopathology of the Reticuloendothelial Cells of the liver and Spleen. In: POPPER, H.; SCHAFFNER, F. (Eds.). . **Progress in Liver Diseases**. [s.l.] Butterworth-Heinemann, 1965. p. 166–191.

BRILEY-SAEBO, K. et al. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. **Cell and tissue research**, v. 316, n. 3, p. 315–323, 2004.

CAREW, J. S. et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl--mediated drug resistance.

Blood, The Journal of the American Society of Hematology, v. 110, n. 1, p. 313–322, 2007.

CHEN, S. et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1806, n. 2, p. 220–229, 2010.

CHO, K. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical cancer research**, v. 14, n. 5, p. 1310–1316, 2008.

CHOI, J. et al. Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors. **Biomaterials**, v. 33, n. 16, p. 4195–4203, 2012.

CHRISTINA, A.; MASSEY, K. A.; SCHNITZER, J. E. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 4, p. 421–437, 2011.

CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, n. 6927, p. 37, 2003.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J. Allen JE, Taylor PR. **Tissue-resident macrophages. NAT IMMUNOL**, v. 14, n. 10, p. 986–995, 2013.

DE LIMA, L. I. et al. Self-nanoemulsifying drug-delivery systems improve oral absorption and antischistosomal activity of epiisopiloturine. **Nanomedicine**, v. 13, n. 7, p. 689–702, 2018.

DECUZZI, P. et al. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 320–327, 2010.

DEGENHARDT, K. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer cell**, v. 10, n. 1, p. 51–64, 2006.

DIXON, L. J. et al. Kupffer cells in the liver. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 785–797, 2013.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature nanotechnology**, v. 2, n. 8, p. 469, 2007.

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**, v. 12, n. 15, p. 1751–1765, 2017.

GENG, Y. et al. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 5, p. 473–481, 2010.

GERMAIN, R. N. An innately interesting decade of research in immunology. **Nature medicine**, v. 10, n. 12, p. 1307, 2004.

GONZÁLEZ-POLO, R.-A. et al. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. **Journal of cell science**, v. 118, n. 14, p. 3091–3102, 2005.

GRATTON, S. E. A. et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 33, p. 11613–11618, 2008.

GUSTAFSON, H. H. et al. Nanoparticle uptake: the phagocyte problem. **Nano today**, v. 10, n. 4, p. 487–510, 2015.

HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657–3666, 2010.

HEMPELMANN, E. Hemozoin biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. **Parasitology research**, v. 100, n. 4, p. 671–676, 2007.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 17, p. 2873–2896, 2009.

HO, B. N.; PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Update on nanotechnology-based drug delivery systems in cancer treatment. **Anticancer research**, v. 37, n. 11, p. 5975–5981, 2017.

IVERSEN, T.-G.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. **Nano today**, v. 6, n. 2, p. 176–185, 2011.

J, S.; M, B. Role of phagocytosis in the activation of macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 148, n. 6, p. 1449–1457, 1978.

KATAYAMA, M. et al. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 3, p. 548–558, 2007.

KITCHEN, L. W.; VAUGHN, D. W.; SKILLMAN, D. R. Role of US military research programs in the development of US Food and Drug Administration--approved antimalarial drugs. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. 1, p. 67–71, 2006.

KNOP, K. et al. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 36, p. 6288–6308, 2010.

KUPFFER, C. VON. Ueber Sternzellen der Leber. **Archiv für mikroskopische Anatomie**, v. 12, n. 1, p. 353–358, 1876.

LASSER, A. The mononuclear phagocytic system: a review. **Human pathology**, v. 14, n. 2, p. 108–126, 1983.

LEHENKARI, P. P. et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. **Molecular pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 1255–1262, 2002.

LEMIEUX, J.; MAUNSELL, E.; PROVENCHER, L. Chemotherapy-induced alopecia and effects on quality of life among women with breast cancer: a literature review. **Psycho-Oncology**, v. 17, n. 4, p. 317–328, 2008.

LI, S.-D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 496–504, 2008.

LI, Z. et al. The macrophage-depleting agent clodronate promotes durable hematopoietic chimerism and donor-specific skin allograft tolerance in mice. **Scientific reports**, v. 6, p. 22143, 2016.

LIU, J. et al. Renal clearable inorganic nanoparticles: a new frontier of bionanotechnology. **Materials Today**, v. 16, n. 12, p. 477–486, 2013.

LIU, T. et al. RES blockade: A strategy for boosting efficiency of nanoparticle drug. **Nano Today**, v. 10, n. 1, p. 11–21, 2015.

LONGMIRE, M.; CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. 2008.

MAES, H. et al. Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. **Cancer cell**, v. 26, n. 2, p. 190–206, 2014.

MAGILL, A. J. **For the record: a history of malaria chemoprophylaxis** **Yellow Book** Oxford University Press New York, NY, , 2016.

MAHMOOD, U.; WEISSLEDER, R. Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. **Molecular cancer therapeutics**, v. 2, n. 5, p. 489–496, 2003.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 11, p. 592–599, 2009.

MCGRATH, J. C.; MCLACHLAN, E. M.; ZELLER, R. Transparency in Research involving Animals: The Basel Declaration and new principles for reporting research in BJP manuscripts. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 10, p. 2427–2432, 2015.

MERKEL, T. J. et al. Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 586–591, 2011.

MILLER, S. E. et al. CALM regulates clathrin-coated vesicle size and maturation by directly sensing and driving membrane curvature. **Developmental cell**, v. 33, n. 2, p. 163–175, 2015.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 283–318, 2001.

MONTANARI, F. et al. **A phase II trial of chloroquine in combination with bortezomib and cyclophosphamide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma**American Society of Hematology Washington, DC, , 2014.

MORTIMER, G. M. et al. Cryptic epitopes of albumin determine mononuclear phagocyte system clearance of nanomaterials. **ACS nano**, v. 8, n. 4, p. 3357–3366, 2014.

MUEHLMANN, L. A. 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**, v. 13, n. 1, p. 36, 2015.

NAITO, M. et al. Differentiation and function of Kupffer cells. **Medical Electron Microscopy**, v. 37, n. 1, p. 16–28, 2004.

NUWAHA, F. The challenge of chloroquine-resistant malaria in sub-Saharan Africa. **Health policy and planning**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2001.

OH, N.; PARK, J.-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. **International journal of nanomedicine**, v. 9, n. Suppl 1, p. 51, 2014.

ORGANIZATION, W. H. **Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009**. [s.l.] World Health Organization, 2009.

PASCOLO, S. Time to use a dose of chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. **European journal of pharmacology**, v. 771, p. 139–144, 2016.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 461–472, 2012.

PELKMANS, L.; KARTENBECK, J.; HELENIUS, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. **Nature cell biology**, v. 3, n. 5, p. 473–483, 2001.

PELT, J. et al. Chloroquine and nanoparticle drug delivery: A promising combination. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 191, p. 43–49, 2018.

PIERZYŃSKA-MACH, A.; JANOWSKI, P.; DOBRUCKI, J. W. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. **Cytometry Part A**, v. 85, n. 8, p. 729–737, 2014.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, v. 43, n. S1, p. S54--S62, 2006.

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. **J. Mater. Chem. B**, v. 6, n. 44, p. 7306–7316, 2018.

RAINSFORD, K. D. et al. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 231–269, 2015.

RAO, J. Shedding light on tumors using nanoparticles. **ACS nano**, v. 2, n. 10, p. 1984–1986, 2008.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2008.

REDMANN, M. et al. Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. **Redox biology**, v. 11, p. 73–81, 2017.

RUBINSZTEIN, D. C. et al. **In search of an “autophagometer”** Taylor & Francis, , 2009.

SADAUSKAS, E. et al. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. **Particle and fibre toxicology**, v. 4, n. 1, p. 10, 2007.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of controlled release**, v. 145, n. 3, p. 182–195, 2010.

SCHLITZER, M. Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. **ChemMedChem**, v. 2, n. 7, p. 944–986, 2007.

SCHLIWA, M. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. **The Journal of cell biology**, v. 92, n. 1, p. 79–91, 1982.

SIGOLA, L. B. et al. Effects of Toll-like receptor ligands on RAW 264.7 macrophage morphology and zymosan phagocytosis. **Tissue and Cell**, v. 48, n. 4, p. 389–396, 2016.

SUN, T. et al. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 46, p. 12320–12364, 2014.

SUZUKI, R. et al. Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin–PEG–liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1, p. 143–150, 2008.

TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 11, p. 897, 2003.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**,

v. 58, n. 14, p. 1532–1555, 2006.

TORGERSEN, M. L. et al. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t (8; 21) AML cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 122, n. 14, p. 2467–2476, 2013.

TRAN, S. et al. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and translational medicine**, v. 6, n. 1, p. 44, 2017.

VAN ROOIJEN, N. Liposomes for targeting of antigens and drugs: immunoadjuvant activity and liposome-mediated depletion of macrophages. **Journal of drug targeting**, v. 16, n. 7–8, p. 529–534, 2008.

VAN VLERKEN, L. E.; VYAS, T. K.; AMIJI, M. M. Poly (ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 8, p. 1405–1414, 2007.

VON ROEMELING, C. et al. Breaking down the barriers to precision cancer nanomedicine. **Trends in biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 159–171, 2017.

WALKEY, C. D. et al. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 4, p. 2139–2147, 2012.

WANG, H. et al. Diagnostic imaging and therapeutic application of nanoparticles targeting the liver. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 6, p. 939–958, 2015.

WANG, H.; WU, L.; REINHARD, B. M. Scavenger receptor mediated endocytosis of silver nanoparticles into J774A. 1 macrophages is heterogeneous. **Acs Nano**, v. 6, n. 8, p. 7122–7132, 2012.

WANG, M. et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Cell Research**, p. 1–3, 2020.

WANG, Z. et al. Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. **ACS nano**, v. 3, n. 12, p. 4110–4116, 2009.

WEISSLEDER, R. A clearer vision for in vivo imaging. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 316–317, 2001.

WHITE, E.; DIPAOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 17, p. 5308–5316, 2009.

WIBO, M.; POOLE, B. Protein degradation in cultured cells: II. The uptake of chloroquine by rat fibroblasts and the inhibition of cellular protein degradation and cathepsin B1. **The Journal of cell biology**, v. 63, n. 2, p. 430–440, 1974.

WILHELM, S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 5, p. 16014, 2016.

WOLFRAM, J. et al. A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for

improved nanodelivery. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13738, 2017.

YOON, Y. H. et al. Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, n. 11, p. 6030–6037, 2010.

YU, M.; ZHENG, J. Clearance pathways and tumor targeting of imaging nanoparticles. **ACS nano**, v. 9, n. 7, p. 6655–6674, 2015.

ZHANG, L. et al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 5, p. 761–769, 2008.

ZHANG, Y.-N. et al. Nanoparticle--liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. **Journal of controlled release**, v. 240, p. 332–348, 2016.

8 ANEXOS

ANEXO I: Autorização de uso de imagens do *website* “Biorender.com”, utilizado para a produção de algumas Figuras apresentadas na introdução desta dissertação de Mestrado.



Licensing and Usage

	Basic (Free) Account*	Academic Subscription	Industry Subscription
Educational Uses:			
Academic poster	✓	✓	✓
Thesis/dissertation (unpublished)	✓	✓	✓
Internal meetings (lab or team)	✓	✓	✓
Conference presentation	✓	✓	✓
Assignment/Exam	✓	✓	✓
Teaching slides	✓	✓	✓
Personal blog/website posts	✓	✓	✓
Personal social media posts	✓	✓	✓
Publishing Uses:			
Journal publication		✓	✓
Textbook publication (< 5 figures)		✓	✓
Published thesis		✓	✓
Commercial Uses:			
Any uses that generate profit			✓
Textbook publication (5+ figures)			✓
Trade show materials (ie. brochures)			✓
Information packages/User guides			✓

*Watermark must be included in exported figure
 *Free trial on a premium plan recommended for print uses
 For use cases not listed here, please go to biorender.com/contact

Conditions for Publication rights:

1. The figure was exported under a **paid subscription**.
2. Citation of “Created with BioRender.com” anywhere in the publication.

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


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 12 de novembro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOEMULSÕES LIPÍDICAS POR TÉCNICAS DE IMAGEAMENTO IN VIVO DE FLUORESCÊNCIA"**, Protocolo n.º 105/2019, 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: *Mus musculus* (20 fêmeas). A presente declaração é válida pelo período de: 12/11/2019 a 20/6/2020.



Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
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.

9 PRINCIPAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO

1. Publicação de uma nota técnica na Brucker;
2. Apresentação de pôster no I ICONANNO;
3. Ministrante de minicurso no III Simpósio de Farmácia da UnB;
4. Apresentação de pôster no Encontro Nacional de Pesquisa em Oncologia, logrando prêmio de menção honrosa;
5. Fez o curso de Boas Práticas em Cultura de Células do BCRJ;
6. Fez o curso de Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da USP;
7. Revisão de material didático para o site “Passei Direto”;
8. Participou ativamente da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia no evento Disseminano.
9. Impressão 3D de animais para o ensino da Biologia no HUB;
10. Ministrante de Minicurso da XVIII Semana da Biologia da UnB;
11. Apresentação de pôster no simpósio da pós-graduação em Biologia Animal da UnB, ganhando prêmio de melhor pôster;
12. Aula ministrada para uma disciplina de pós-graduação em Biologia Animal;
13. Aula ministrada para uma disciplina de graduação.