ANGÉLICA MARIA PATIÑO GONZÁLEZ

Avaliação da administração intravenosa de solução salina hipertônica 7,5% como estratégia para melhorar a perfusão do tumor e a entrega de moléculas em modelos tumorais em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas
Programa: Oncologia

**São Paulo
2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Patiño González, Angélica Maria

Avaliação da administração intravenosa de solução salina hipertônica 7,5% como estratégia para melhorar a perfusão do tumor e a entrega de moléculas em modelos tumorais em camundongos / Angélica Maria Patiño González. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Administração intravenosa 2.Solução salina hipertônica 3.Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos 4.Determinação do volume sanguíneo 5.Volume sanguíneo 6.Fluxo sanguíneo regional 7.Microbolhas 8.Ultrassonografia 9.Meios de contraste 10.Ultrassonografia Doppler em cores 11.Espectroscopia de luz próxima ao infravermelho 12.Neoplasias

USP/FM/DBD-214/16

Folha de aprovação

AGRADECIMENTOS

A minha família que sempre me anima para ir atrás dos meus objetivos e porque apesar da distancia ficaram próximos de mim com conselhos e conversas cheias de carinho. Pai Raúl, Mae Claudia, irmãos Aleja e Willis e cunhado Adam obrigada por tudo.

Ao Sergio, meu primo querido quem me inspira todo dia para viver intensamente.

A Eli a quem sempre vou admirar pela sua autenticidade e jeito único de olhar cada experiência da vida. Obrigada por todos os ensinamentos que fizeram de mim uma pessoa mais compreensiva e paciente.

A Silvana, obrigada por me transmitir através dos seus conselhos a sabedoria de quem tem vivido plenamente. Agradeço muito pela companhia incrível e por me fazer sentir parte da família.

Ao Prof. Roger Chammas por ter me dado a oportunidade de fazer parte do programa, pelas interessantes discussões que tivemos e pela motivação e apoio para sobressair na minha carreira profissional.

Ao Prof. Gillies e ao grupo do Moffitt pela maravilhosa experiência que tive em Tampa, Florida.

A Re, a quem segui como exemplo de pesquisador e sempre estive disposta para me ajudar no projeto. Agradeço também pelas ideias incríveis que contribuíram no meu trabalho.

A Ka pela maravilhosa amizade que transcende o tempo e as fronteiras. Muito obrigada por todos os conselhos, conversas, risadas e por tua ajuda incondicional.

A Carolita pelas intensas conversas teóricas que me motivaram e por ter me demonstrado que o autentico trabalho em equipo é possível. Agradeço muito por ter me acolhido na sua família também. Algum dia voltarei em Belém!

A Sil, a “roomie” e amiga que sempre teve um conselho não só na parte acadêmica mas também para superar as dificuldades próprias da vida.

As minhas amigas Lizeto e Mayrita pelos lindos momentos que compartilhamos. A maioria das minhas risadas no Laboratório foram por conta de vocês.

A Lu Andrade e Matheus pelos todos os conselhos e experimentos que contribuíram sem duvida no meu projeto.

A MM, por toda sua ajuda. Conteí sempre contigo para muitos dos meus experimentos e além disso você me acolheu no Lab assim eu cheguei. Obrigada!

A Pri, sendo eu uma estagiaria você me ensino muitas das técnicas que usei no meu mestrado. Sua paixão pela ciência é contagiosa.

A todos os meus amigos do grupo BioCel pela colaboração no dia a dia, por ter me ensinado Português e por compartilhar comigo tantos momentos bons.

A todos os funcionários, em especial a Cida, o André e a Mara que sempre tiveram a melhor disposição para me ajudar.

A Capes, pelo apoio econômico que me permitiu morar em São Paulo e viajar aos Estados Unidos.

Ao povo Brasileiro, pessoas de coração aberto que me acolheram calorosamente nesse país incrível.

“Identifying where cancer is constrained is fundamental, because it is at the constraints that variability is reduced”¹

Judah Folkman et al.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações na velocidade do sangue induzidas pela injeção i.v de HSS.....	22
Figura 2. Efeito da administração HSS sobre o volume de sangue no tumor.	25
Figura 3. Resposta tumoral ao tratamento com cisplatina diluída em HSS	26
Figura 4. Resposta <i>in vitro</i> de células tratadas com cisplatina diluída em HSS	27
Figura 5. Imunofluorescência de focos nucleares γ H2AX.....	29
Figura 6. Resposta tumoral ao tratamento com cisplatina e HSS.....	30
Figura 7. Resposta tumoral ao tratamento com doxorrubicina e HSS..	31
Figura 8. Imagem por epifluorescência próximo do infravermelho (NIR)	32

LISTA DE SIGLAS

AT-II	Angiotensina II
AUC	Área sob a curva
CEUS	Ultrassonografia com contraste por microbolhas
CDDP	Cisplatina
CTG	Compensação de ganho tecidual
EPR	Efeito de retenção e permeabilidade aumentada
HIF	Fatores induzidos por hipóxia
HSS	Solução salina hipertônica
IFP	Pressão do Fluido intersticial
IHQ	Hipertensão induzida para quimioterapia
i.p	Intraperitoneal
i.v	Intravenosa
LMW	Moléculas de baixo peso
MI	Índice Mecânico
NIR	Próximo do infravermelho
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Iodeto de Propídio
PW	Onda de pulso
ROI	Região de interesse
SV	Volume de amostra
US	Ultrassonografia

RESUMO

Patiño González AM. *Avaliação da administração intravenosa de solução salina hipertônica 7,5% como estratégia para melhorar a perfusão do tumor e a entrega de moléculas em modelos tumorais em camundongos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 2016.

A administração intravenosa de solução salina hipertônica (HSS) induz alterações sistêmicas circulatórias como o aumento da pressão arterial e do volume circulante efetivo, além de ter efeitos locais sobre a microcirculação. No presente estudo foram analisados os efeitos produzidos pela administração de solução salina hipertônica 7,5% sobre a hemodinâmica do tumor através de estudos de imagem funcional e posteriormente, foi avaliado o seu potencial de otimizar a entrega de moléculas no tumor. A velocidade do sangue nos vasos tumorais estimada por Ultrassom Color Doppler foi aumentada após a injeção da HSS em comparação ao controle PBS em tumores de melanoma (B16F10 ($p=0,019$), SK-MEL-147 ($p=0,028$)) e de mama (4T1 ($p=0,015$)). Este mesmo efeito não foi observado nas artérias segmentarias do rim ($p=0,476$). Ultrassonografia com contraste por microbolhas (CEUS) foi realizada em xenoenxertos de tumor de melanoma (B16F10), carcinoma de cólon (HCT-116) e mama (MDA-MB-231), e como controle foi realizada imagem no rim e no músculo nos animais portadores destes tipos tumorais ($n=3$ por grupo). Após a injeção da HSS, o volume relativo de sangue foi aumentado nos tumores B16F10 ($p=0,022$) e HCT-116 ($P=0,039$), mas o mesmo não foi observado com o tumor MDA-MB-231 ($p=0,186$). Além disso, não houve alterações nos tecidos normais (rim $p=0,957$; músculo $p=0,104$). Todos os testes estatísticos foram bicaudais. Quando a HSS foi utilizada como veículo para entrega de moléculas de baixo peso molecular como cisplatina e doxorrubicina no tratamento de tumores B16F10 e 4T1 respectivamente, não houve aumento da eficácia terapêutica, avaliada através do crescimento tumoral e peso dos tumores. O efeito da HSS sobre a retenção de macromoléculas nos tumores SK-Mel-147 e 4T1, avaliado através de imagem por epifluorescência do contraste ótico IR-783, não foi suficientemente notório para rejeitar a hipótese nula. Assim, a HSS induz um aumento transitório na velocidade do sangue e do volume sanguíneo, de maneira relativamente seletiva para os tumores avaliados, com exceção do MDA-MB-231. Portanto, esta pode ser uma estratégia útil para aumentar a entrega de moléculas e otimizar tanto o efeito terapêutico, quanto o diagnóstico por imagem.

Descritores: administração intravenosa; solução salina hipertônica; critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos; determinação do volume sanguíneo; volume sanguíneo; fluxo sanguíneo regional; microbolhas; ultrassonografia; meios de contraste; ultrassonografia Doppler em cores; espectroscopia de luz próxima ao infravermelho; neoplasias.

ABSTRACT

Patiño González AM. *Evaluation of Hypertonic saline solution 7,5% intravenous administration as a potential strategy to enhance tumor perfusion as well as molecular delivery in mice tumor models* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Intravenous administration of Hypertonic saline solution (HSS) induces systemic circulatory changes including blood pressure rising, effective circulating volume increase as well as local effects on microvasculature. We analyzed the effects produced by Hypertonic Saline 7,5% administration on tumor hemodynamics through functional imaging studies as well as whether it enhances molecular delivery in tumor tissue when used as a vehicle. Blood velocity assessed by Color Doppler Ultrasound was increased after HSS injection compared to PBS in the following tumors: B16F10 ($p=0,019$), SK-MEL-147 ($p=0,028$) and 4T1 ($p=0,015$). No statistical difference was observed on the segmental kidney arteries ($p=0,476$). Dynamic Contrast enhanced ultrasound (CEUS) was done in B16F10, HCT-116 and MDA-MB-231 tumor xenografts, kidney and muscle tissues ($n=3$ per group). After HSS injection, relative blood volume was increased in B16F10 ($p=0,022$) and HCT-116 ($p=0,039$) but not on MDA-MB-231 ($p=0,186$). Changes on normal tissues were not statistically different (kidney $p=0,957$; muscle $p=0,104$). All statistical tests were two-sided. Administration of HSS as a vehicle for low molecular weight molecules cisplatin and doxorubicin in the treatment of B16F10 and 4T1 tumors respectively had no significant improvement of therapeutic efficacy, estimated by tumor growth and tumor weight measurements. Effect of HSS over retention of macromolecules in tumors SK-Mel-147 and 4T1, evaluated by epifluorescence imaging of the optical contrast IR- 783 was not large enough to reject the null hypothesis. HSS induces a transient increase in velocity of the blood as well as the blood volume that is relatively selective for the evaluated tumors with exception of MDA-MB-231. Data suggest that HSS administration might be a useful strategy to increase the delivery of molecules and optimize both therapy and diagnostic imaging.

Descriptors: administration, intravenous; saline solution, hypertonic; response evaluation criteria in solid tumors; blood volume determination; blood volume; regional blood flow; microbubbles; ultrasonography; contrast media; ultrasonography, doppler, color; spectroscopy, near-infrared; neoplasms.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Tumores Sólidos e Pressão de Fluido Intersticial.....	1
1.2 Vasculatura tumoral	2
1.3 Microambientes vasculares no tumor	2
1.4 Mecânica de Fluidos no tumor.....	3
1.5 Transporte e distribuição de moléculas no tumor	5
1.6 Efeito de retenção e permeabilidade aumentada (EPR).....	5
1.7 Solução salina hipertônica.....	6
1.8 Solução salina hipertônica e o fluxo sanguíneo tumoral.....	8
1.9 Solução salina hipertônica e quimioterápicos de baixo peso molecular	9
1.9.1 Cisplatina	9
1.9.2 Doxorubicina	9
1.10 Solução salina hipertônica e entrega de macromoléculas	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAS E MÉTODOS	13
3.1 Cultura Celular	13
3.2 Animais e modelos de tumor	13
3.3 Preparação da solução salina hipertônica	14
3.4 Ultrassonografia.....	14
3.4.1 Ultrassonografia com Doppler Colorido.....	14
3.4.2 Ultrassonografia com contraste por microbolhas (CEUS).....	15
3.5 Terapia com cisplatina.....	16
3.5.1 Tratamento in-vivo com cisplatina diluída em HSS 7,5%	16
3.5.2 Citometria de Fluxo para avaliação de morte celular	17
3.5.3 Imunofluorescência com anticorpo anti γ -H2AX	17
3.5.4 Tratamento in-vivo com cisplatina e HSS 7,5% administradas por vias diferentes	18
3.6 Terapia com doxorubicina.....	18
3.7 Imagem por epifluorescência	19
3.8 Análise estatística	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Efeito da HSS na hemodinâmica tumoral.....	20
4.1.1 A velocidade do sangue nos vasos tumorais é aumentada após a administração i.v de HSS 7,5 %	20
4.1.2 A volume de sangue no tumor aumenta após a administração i.v de HSS 7,5 %	23
4.2 Efeito da quimioterapia quando administrada com HSS.....	25
4.2.1 Cisplatina diluída em HSS 7,5% tem efeito terapêutico e toxicidade in-vivo diminuídas.....	25
4.2.1.1 Morte celular diminui quando as células de melanoma são tratadas com cisplatina diluída em HSS 7,5%.....	26
4.2.1.2 Dano ao DNA é similar nos tratamentos in-vivo com cisplatina/HSS e cisplatina/PBS.....	27

4.2.2 Tratamento com cisplatina/HSS 7,5% administrado por vias diferentes não tem benefício terapêutico in-vivo.....	29
4.2.3 Tratamento com doxorubicina e HSS 7,5% não tem benefício terapêutico in-vivo	30
4.3 Efeito da HSS sobre a entrega de macromoléculas	32
4.3.1 Imagem por epifluorescência in vivo quando HSS é administrada após a injeção de contraste ótico: O tumor não apresenta um aumento substancial no sinal.....	32
5. DISCUSSÃO	33
5.1 Solução salina hipertônica aumenta o fluxo vascular tumoral	33
5.2 Efeito da solução salina hipertônica sobre a entrega de moléculas no tumor.	34
6. CONCLUSÃO GERAL	39
7. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores Sólidos e Pressão de Fluido Intersticial

A arquitetura vascular tumoral consiste em uma rede de vasos sanguíneos desorganizada e anômala com permeabilidade aumentada e vasos linfáticos não-funcionais¹⁻⁴. Portanto é uma vasculatura ineficiente na remoção de fluidos intersticiais, o que resulta no acúmulo destes no tumor. Este acúmulo contribui para o aumento das pressões intersticiais coloide-osmótica e hidrostática^{5,6}, gerando áreas dentro do tumor de alta pressão de fluido intersticial (IFP). Isso, adicionado à pressão mecânica aumentada, que ocorre pelo próprio crescimento do tumor e eventualmente a presença de uma matriz extracelular densa, dificultam substancialmente a perfusão uniforme do tecido tumoral^{7,8}.

O gradiente de pressão transcápilar nos tecidos normais é ligeiramente positivo, a fim de criar um fluxo de saída dos capilares para o interstício, no entanto, este é perdido nos tumores por conta da elevação da IFP⁹. Essa pressão intersticial, predominantemente aumentada no centro do tumor, leva a estase (estagnação do sangue) nos vasos capilares e junto à oclusão dos vasos por forças mecânicas, induz um fluxo convectivo radialmente para fora. Assim, o fluxo de sangue é distribuído preferencialmente na periferia do tumor^{10,11}.

Além do fluxo sanguíneo ser heterogêneo nas diferentes regiões tumorais, este também se altera ao longo do tempo¹². Ocasionalmente, o estresse sólido resultante do crescimento tumoral comprime os vasos e induz vazamento excessivo de plasma; mesmo quando os vasos permanecem com um lúmen aberto o fluxo pode estar parado devido ao alto grau de hemoconcentração¹³.

1.2 Vasculatura tumoral

Além dos vasos tumorais serem tortuosos, irregulares e imaturos, a estrutura das suas paredes também é distorcida¹. O endotélio carece de recobrimento pelos pericitos³ e células musculares lisas, tem maiores junções interendoteliais, aumento do número de fenestrações e ausência ou descontinuidade da membrana basal². Por tanto, esses vasos carecem de tônus, de estabilidade e são altamente permeáveis⁴.

A ausência de comunicação intercelular e a regulação que o fluxo tem sobre o endotélio promovem a geração de *shunts* arteriovenosos^{12,14}, que são vias curtas de baixa resistência e fluxo alto. Em tumores de cabeça e pescoço, por exemplo, de 8% a 43 % do sangue arterial pode passar através desses *shunts* e não participa dos processos de troca na microcirculação¹⁵.

Além das alterações anatômicas, modelos computacionais têm descrito como principais alterações funcionais dos vasos tumorais a perda completa ou quase completa do controle do diâmetro, a maior aleatoriedade nos padrões de reação vasculares e a tendência geralmente superior a crescer¹⁶. Estudos têm demonstrado que a velocidade do sangue nos vasos tumorais é independente do diâmetro, diferente do que acontece nos vasos normais¹⁷.

1.3 Microambientes vasculares no tumor

A fim de fornecer aporte de nutriente requerido para o crescimento do tumor, novos vasos são gerados a partir da ativação do *switch* angiogênico¹⁸. Porém, a taxa de formação de vasos não acompanha a alta taxa de proliferação das células tumorais. Esta desproporção somada a IFP e a pressão mecânica aumentada contribuem para a formação de regiões com diferentes níveis de perfusão sanguínea^{15,19,20}. De acordo com o aporte de oxigênio e nutrientes são favorecidos diferentes fenótipos celulares que formarão diversos microambientes dentro do mesmo tumor^{19,21}.

Células tumorais localizadas próximas aos vasos sanguíneos (<150 μm) estão sob condições ótimas que atuam como força de seleção para células altamente proliferativas e competitivas, mas pouco resistentes à apoptose e as mudanças na disponibilidade de recursos. Essas células, embora apresentem diferenças genotípicas

entre elas, possuem capacidade de se adaptar igualmente ao microambiente e são uma população abundante no tumor²².

Em contrapartida, como as células mais distantes dos vasos sanguíneos são expostas a condições adversas, estas caracterizam-se pela plasticidade fenotípica, pela resistência à apoptose e pela baixa taxa proliferativa^{23,24}. Estas células se adaptam ao microambiente hipóxico através de mecanismos como o *Efeito Warburg*, no qual estabelecem a via glicolítica como principal via metabólica para a geração de energia em detrimento de vias oxidativas^{25,26}.

Além dos microambientes relativamente estáveis descritos previamente, existem microambientes flutuantes, onde as mudanças do aporte sanguíneo podem ser tão rápidas quanto segundos ou horas. Nestes microambientes, os fenótipos favorecidos são de células que proliferam rapidamente, apresentam alta avidéz por recursos e têm maiores taxas de dispersão^{27,28}.

Dependendo do microambiente tumoral a resposta à terapia pode ser diferente. Em termos gerais, as células perivasculares são mais responsivas aos tratamentos com quimioterapia enquanto as células em hipóxia são altamente resistentes²⁹. Isto pode ser resultado da limitada distribuição de fármacos intravasculares no tumor, assim como a falta de formação de radicais livres pela ausência de oxigênio nessas áreas, o que diminui o efeito terapêutico de alguns fármacos anticancerígenos. Além disso, a baixa taxa proliferativa das células em regiões de hipóxia faz com que estas não sejam alvo de drogas com toxicidade seletiva para células em divisão. Algumas destas células são células-tronco que podem repovoar o tumor após a terapia e inclusive induzir metástase⁵.

1.4 Mecânica de Fluidos no tumor

A lei de Poiseuille é comumente usada como uma aproximação didática para estimar as variáveis do fluxo sanguíneo tumoral. Segundo esse modelo o fluxo é determinado proporcionalmente pela diferença de pressões entre os extremos arterial e venoso e inversamente proporcional a resistência. A resistência geométrica³⁰ é relativa à complexidade morfológica da rede vascular enquanto a resistência viscosa³¹ é atribuída principalmente à concentração do sangue e à taxa de cisalhamento (*shear rate*). Como

nos tumores ambas as resistências são aumentadas³² e o gradiente de pressões diminuído, a perfusão global resultante no tumor é menor que na maioria de tecidos normais.

Além disso, a presença de *shunts* arteriovenosos em alguns tumores faz com que o fluxo seja preferencialmente derivado através destes por apresentarem menor resistência e, portanto, com que não exista aporte nenhum de oxigênio e nutrientes ao tecido.

Com relação à microvasculatura, a hemodinâmica é extremamente heterogênea e complexa. Esta depende de diferentes fatores tais como a arquitetura da rede vascular, a resistência ao fluxo em cada segmento, o tamanho e concentração das hemácias dentro dos vasos individuais, assim como a sua repartição nas bifurcações³³.

Em vasos com diâmetro menor que 300 μm , as hemácias influenciam significativamente o fluxo sanguíneo. Segundo o efeito Fahraeus e o efeito Fahraeus-Lindqvist, existe redução no hematócrito e na viscosidade à medida que o diâmetro do vaso é reduzido³⁴. Esses fenômenos ocorrem porque existe uma tendência das hemácias a se localizarem no centro do vaso, ficando um espaço fino livre de células próximo à parede do capilar. Esse espaço tem, dessa forma, uma viscosidade reduzida que diminui a resistência ao fluxo e reduz a viscosidade global (Fahraeus-Lindqvist). Além disto, a velocidade média das hemácias dentro do vaso é maior do que a velocidade do plasma dentro do capilar (Fahraeus), o que produz uma redução relativa do hematócrito total.

O fluxo microvascular é alterado nos tumores porque o diâmetro dos vasos tende a ser maior e as propriedades reológicas do sangue diferem das observadas em tecidos normais. Ao invés de redução da viscosidade dentro dos vasos tumorais, esta é aumentada por conta da perda de fenômenos como Fahraeus e Fahraeus-Lindqvist³¹, que dependem da diminuição do diâmetro nos capilares³², assim como da presença de células tumorais intravasculares que interagem com outras células e com a parede do vaso, de hemácias que são mais rígidas e têm maior tendência a agregarem-se, e níveis aumentados de fibrinogênio e globulinas séricas no plasma. Esse fluxo sanguíneo alterado não só contribui para a heterogeneidade tumoral mas também induz o extravasamento das células tumorais e de leucócitos pelas paredes vasculares que favorece o processo de metástase.

1.5 Transporte e distribuição de moléculas no tumor

Por conta deste incremento na IFP e do fluxo altamente heterogêneo de sangue no tumor, a penetração de moléculas nos tumores sólidos é substancialmente comprometida⁵.

Normalmente as moléculas de baixo peso (<1000 g/mol) são transportadas dos vasos para o interstício principalmente por difusão, tendo como determinantes principais a permeabilidade do vaso e o gradiente de concentração da molécula. Ao mesmo tempo, as moléculas de alto peso são transportadas por convecção⁹, onde a condutividade hidráulica (facilidade de um fluido para movimentar-se em espaços porosos) e o gradiente das pressões intersticial e vascular, desempenham um papel muito importante^{10,35}.

A perturbação histológica e fisiológica da rede vascular observada em tumores sólidos limita predominantemente o fluxo convectivo desde os capilares ao interstício⁹. Assim, o transporte das moléculas de elevado peso molecular é altamente comprometido e o transporte por difusão consolida-se como mecanismo principal. Existem estudos que mostram que a modulação da pressão do fluido intersticial do tumor melhora a entrega de moléculas tanto de alto quanto de baixo peso molecular³⁶.

1.6 Efeito de retenção e permeabilidade aumentada (EPR)

Semelhante a um estado inflamatório, no microambiente tumoral encontram-se aumentados fatores de permeabilidade tais como bradicinina, óxido nítrico e derivados, prostaglandinas, fator de crescimento endotelial vascular, metaloproteinases; que junto da estrutura irregular dos vasos tumorais, promovem condições de permeabilidade aumentada^{37,38}.

O efeito EPR^{39,40} foi descrito por Matsumura e Maeda em 1986 depois de observarem como as macromoléculas exibiam acumulação seletiva no tumor. O EPR ocorre através do extravasamento aumentado de macromoléculas (tamanho maior a 40kDa), nano-partículas e partículas lipídicas, que ficam retidas no tumor. Essas moléculas caracterizam-se por serem de carga parcialmente negativa ou neutra, por

apresentarem períodos de circulação prolongados e baixa depuração assim como biocompatibilidade (interação reduzida com células ou vasos, baixa antigenicidade e baixa depuração pelo sistema retículo endotelial).

Como o efeito EPR depende da presença de vasos, os tumores de grande volume apresentam acúmulo de macromoléculas predominantemente na periferia tumoral, aonde ocorre o crescimento do tumor e a angiogênese. Em contrapartida, as áreas de necrose e áreas hipovasculares encontram-se preferencialmente no interior da massa tumoral e apresentam menor retenção de macromoléculas.

Um dos mecanismos descritos para aumentar o efeito EPR, e consequentemente a terapia antitumoral, é a infusão de Angiotensina II (AT-II), um hormônio que induz hipertensão sistêmica. Dados da literatura mostram que após a administração de AT-II, o volume de fluxo sanguíneo aumenta nos tumores e não nos tecidos normais⁴¹ e isso está relacionado ao fato dos vasos normais possuírem mecanismos homeostáticos que preservam o fluxo normal.

Em estados hipertensivos, os vasos tumorais são dilatados e os *gaps* intercelulares endoteliais aumentam de tamanho o que, associado às forças hidrodinâmicas aumentadas facilitam o extravasamento de macromoléculas no espaço intersticial dos tumores. Desta forma, o efeito EPR pode ser aumentado em até duas vezes.

Esse método tem sido desenvolvido principalmente por pesquisadores japoneses, e foi denominado Hipertensão induzida para quimioterapia (IHQ)⁴²⁻⁴⁴ quando utilizado como estratégia de melhora da entrega de droga. No ano de 2009 foi realizada uma revisão sistemática onde evidências demonstram que a infusão de AT-II através da artéria hepática aumenta a relação entre o fluxo sanguíneo tumoral e o fluxo sanguíneo nos tecidos não tumorais⁴⁵.

1.7 Solução salina hipertônica

A solução salina hipertônica (HSS) é definida como toda solução que tem níveis elevados de sódio em relação à solução salina normal (Na 154 mmol.l⁻¹). Esta última é amplamente utilizada na clínica com propósito de repor perdas de volume corporais. A

gama de concentrações das diferentes soluções hipertônicas estudadas vai desde 1,8% até 30%. No presente trabalho foi utilizada uma HSS com concentração 7,5% p/v, o que corresponde a um teor de Sódio de 1283 mmol.l^{-1} , aproximadamente 8,8 vezes mais do que o valor fisiológico ($\text{Na } 135\text{-}145 \text{ mmol.l}^{-1}$).

Desde o início do século XX vários estudos têm sido realizados sobre a solução salina hipertônica com objetivo de esclarecer as mudanças fisiológicas que acontecem quando administrada no organismo e sua potencial utilização na prática clínica. Trabalhos experimentais com animais demonstraram que a HSS tem efeitos hemodinâmicos atribuídos as mudanças dos fluidos osmóticos.⁴⁶ Com isso, vários estudos têm sido realizados a fim de formalizar seu uso em pacientes.

1.7.1 Efeitos hemodinâmicos

No organismo existem dois grandes compartimentos líquidos: o extracelular e o intracelular. O espaço extracelular é constituído pelo volume presente dentro dos vasos sanguíneos e o volume intersticial. O sódio, além de ser o íon mais abundante dentro deste espaço é o determinante mais importante do seu volume.

Assim, chama-se solução hipertônica porque além da hiperosmolaridade devido a elevada quantidade de sódio, esta é capaz de induzir movimentação de líquido entre os compartimentos intra e extracelulares.

A administração i.v de HSS gera um efeito transitório onde existe redistribuição dos fluidos dos espaços perivasculares ao intravascular. Esta redistribuição induz a expansão plasmática e um rápido incremento da pressão sanguínea, enquanto a mobilização do fluido intracelular, que vem principalmente das células endoteliais microvasculares e eritrócitos, produz uma redução na resistência hidráulica. Espera-se, portanto, que a administração de HSS seja capaz de aumentar a perfusão sanguínea no tumor⁴⁷.

1.7.2 Outros efeitos

As soluções hipertônicas têm sido principalmente utilizadas em pacientes em estado de choque ou edema cerebral. Dessa forma, a maioria dos estudos com estas soluções são desenvolvidos na presença de alguma destas condições. Nestes cenários não há um aporte sanguíneo adequado, assim como observado em tumores. Acredita-se que muitas dessas observações podem ser relacionadas com a fisiopatologia tumoral.

Nestes estudos têm sido observado que a HSS pode diminuir a perda de fluido microvascular em estados de elevado vazamento microvascular, uma vez que ocorre ativação endotelial, assim como a diminuição da ativação de neutrófilos, da resposta citotóxica, da expressão de moléculas de adesão e de “quinases de estresse”^{48,49}. A HSS tem sido relacionada também com alterações no fluxo de íons intracelulares e na mudança do formato celular, os quais podem ser parcialmente responsáveis pelas modificações observadas na permeabilidade hidráulica^{50,51}.

1.8 Solução salina hipertônica e o fluxo sanguíneo tumoral

Dado que a HSS aumenta o fluxo sanguíneo e que os vasos tumorais carecem de mecanismos de controle, existe a possibilidade que a HSS tenha um efeito mais notável sobre fluxo tumoral. É pequena a probabilidade da HSS induzir fenômenos como a “síndrome de roubo vascular”. Nesta síndrome, vasos normais apresentam receptores que estimulados por uma droga resultam em vasodilatação. Em consequência, o fluxo sanguíneo é desviado com preferência para os vasos dilatados em detrimento dos vasos anômalos. Como o mecanismo de ação da HSS é predominantemente um efeito físico, pode agir tanto em vasos normais quanto anômalos. Esta abrangência de efeito em ambos os tipos de vasos é importante para garantir o aumento de perfusão uma vez que o tumor apresenta muitos vasos anômalos.

Como a maioria das terapias e os métodos de diagnóstico para câncer dependem da circulação sanguínea^{32,52} é muito importante desenvolver estratégias que aumentem o fluxo de sangue no tumor. Este trabalho propõe que aumentos transitórios da perfusão tumoral podem aumentar a efetividade da radioterapia, a entrega de drogas⁵³, assim como a qualidade das imagens para melhor caracterização de regiões tumorais. Ademais, a obtenção de uma melhor distribuição de moléculas terapêuticas no tumor pode permitir a diminuição da dose da droga administrada em pacientes e consequentemente a minimização dos efeitos secundários.

1.9 Solução salina hipertônica e quimioterápicos de baixo peso molecular

As moléculas de baixo peso molecular (<1000 g/mol) são transportadas desde o vaso até o tecido tumoral por difusão a favor de um gradiente de concentração. Devido a essa facilidade no transporte são deslocadas rapidamente do espaço intravascular.

A fim de aumentar a distribuição destas moléculas no tumor e dado que sua principal limitação é o fluxo sanguíneo, espera-se que aumentando o fluxo de sangue no tumor, obtém-se uma melhora na entrega destas⁵⁴.

No presente estudo avaliou-se o efeito dos quimioterápicos: cisplatina e doxorrubicina sobre o crescimento tumoral quando estes são administrados junto com HSS. Visto que essas terapias apresentam alta toxicidade associada à sua distribuição sistêmica, espera-se que a utilização de HSS como veículo destes quimioterápicos possa aumentar transitoriamente o fluxo de sangue especialmente no tumor para melhorar a entrega destas drogas e também limitar a sua toxicidade.

1.9.1 Cisplatina

A cisplatina (CDDP) é uma droga antineoplásica citostática de baixo peso molecular (301.1g/mol) cuja atividade antitumoral é atribuída à ligação no DNA formando adutos e *cross-links* que consequentemente levam a inibição da síntese do DNA⁶⁹.

Por ser uma molécula de baixo peso molecular e ser amplamente utilizada no tratamento de tumores sólidos, tais como câncer de ovário, câncer de bexiga, câncer de células germinais e sarcomas, faz-se interessante testar se o tratamento com cisplatina apresenta efetividade melhorada quando usado junto com solução salina hipertônica.

1.9.2 Doxorrubicina

A doxorrubicina (543.54 g/mol) é uma droga citotóxica que faz parte das antraciclinas e tem como mecanismos de ação a alquilação e intercalação do DNA, a geração de espécies reativas de oxigênio, a inibição da topoisomerase II e interferência das polimerases de RNA e DNA⁵⁵. É usada como tratamento de primeira linha em

câncer avançado de mama e sarcoma de tecidos moles. Como é uma droga fluorescente, sua farmacocinética e distribuição no tumor têm sido bem caracterizadas.

A penetração da doxorrubicina no tumor é limitada em parte pelo sequestro que acontece nos endossomas perinucleares de células próximas à vasculatura, a forte ligação intracelular principalmente no DNA, assim como pelo bombeio da droga para fora da célula por proteínas como glicoproteína-P e outras proteínas de resistência a multidroga.

Apesar destas limitações, a doxorrubicina tem apresentado bons resultados terapêuticos como quimioterapia de tumores sólidos. Como esta é administrada por ciclos, ela pode agir continuamente a partir de camadas mais superficiais até atingir regiões mais profundas no tumor, resultando na diminuição do tumor ao longo dos ciclos de tratamento⁵.

Como o transporte de doxorrubicina ao interstício e a células adjacentes vai depender da concentração intracelular deste quimioterápico nas células próximas aos vasos⁵⁶, espera-se que um aumento transitório do fluxo vascular tumoral melhore o gradiente de concentrações e conseqüentemente, a distribuição da droga.

1.10 Solução salina hipertônica e entrega de macromoléculas

IR-783 é um contraste ótico cuja excitação e emissão ocorrem em frequências de onda próximas do infravermelho (NIR), sendo que por definição NIR está dentro de uma janela de frequências entre 700 a 900 nm. Uma das maiores vantagens do uso *in vivo* de moléculas com espectro NIR é a notável redução da autofluorescência⁵⁷.

O IR-783 consiste em moléculas lipofílicas catiônicas de baixo peso molecular (<1000 Da) que apresentam ligação não-covalente em proteínas como a albumina sérica, comportando-se como biomacromoléculas.

Estudos em camundongos portadores de tumor apontam que este contraste é acumulado preferencialmente nas mitocôndrias e lisossomos das células, provavelmente através dos transportadores de ânions orgânicos (OATP). A relação sinal/ruído do tecido tumoral pode ser de até 20 vezes quando a intensidade da fluorescência é medida

16 horas após a administração de IR-783, sendo que nesse intervalo de tempo esta biomacromolécula já foi depurada na maioria dos tecidos normais⁵⁸.

Dado que o IR-783 tem comportamento biológico de macromolécula, este pode exibir o fenômeno de EPR, discutido previamente. A administração de HSS pode induzir um estado hipertensivo, que através do aumento do efeito EPR facilitaria a captação e retenção deste contraste.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração intravenosa de solução salina hipertônica (HSS) 7,5% na perfusão tumoral em modelo murino com o propósito de desenvolver uma estratégia para melhorar a entrega de moléculas no tumor.

Objetivos específicos

- Avaliar em tempo real os efeitos desencadeados pela HSS 7,5% no fluxo de sangue tumoral através de Ultrassonografia por Doppler colorido e contraste por microbolhas em modelos de tumor de melanoma murino B16F10, melanoma humano SK-Mel-147, câncer de mama murino 4T1, câncer de mama humano MDA-MB-231 e câncer de cólon humano HCT-116.
- Caracterizar a eficácia terapêutica dos quimioterápicos de baixo peso molecular, cisplatina e doxorrubicina, quando administradas junto com HSS no tratamento de tumores B16F10 e 4T1 respectivamente.
- Investigar as alterações provocadas pela administração intravenosa de HSS na entrega do contraste ótico e biomacromolécula, IR-783, no tumor.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

Células de melanoma murino B16F10 e de câncer de mama 4T1-Luc foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, BRL). As células de melanoma humano SK-Mel-147 e de câncer de mama MDA-MB-231 foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco com 4,5 g de glucose por litro (High-glucose DMEM) (Sigma, USA), com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, USA). As células de câncer de colón humano HCT-116 cresceram em meio DMEM/F12 (GIBCO, BRL) igualmente suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, USA).

Todas as linhagens celulares foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Quando as células atingiam 80% de confluência, estas eram tripsinizadas para inoculação nos camundongos.

3.2 Animais e modelos de tumor

O projeto CEP-FMUSP 074/13, Proc FAPESP 2013/06120-8 foi aprovado pela Coordenadoria de Ética em Pesquisa FMUSP-CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para os estudos de Ultrassonografia por Doppler Colorido e de crescimento tumoral, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 e NOD/SCD assim como camundongos fêmeas das linhagens *nude* e BALB/c, todos com 6-10 semanas. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e mantidos no Biotério do Centro de Medicina Nuclear do ICESP sob temperatura e umidade controladas, assim como ciclo de 12h de luz/escuridão e acesso livre à água e ração.

Para os estudos de Ultrassonografia com contraste (CEUS) foram utilizados camundongos fêmeas com 6-8 semanas C57BL/6 (Charles River), SCID-beige (Charles River) e *nude* (Harlan) mantidos no biotério do Moffitt Cancer Center (Tampa, FL) de acordo com o protocolo IACUC.

Para todos os experimentos o inóculo foi implantado na pata esquerda dos animais, com exceção dos tumores 4T1 cuja inoculação foi ortotópica, no *fat pad* mamário.

O inóculo das células de melanoma B16F10 foi feito com 100 μ l de RPMI contendo 5×10^5 células em camundongos C57BL/6. Para tumores 4T1, 5×10^4 células em 100 μ l de PBS foram injetadas em camundongos BALB/c e 100 μ l de meio de Eagle modificado por Dulbecco com 4×10^6 células de melanoma humano SK-Mel-147 foram inoculadas em camundongos *nude*. As células MDA-MB-231 (5×10^6) foram ressuspensas em 100 μ l de PBS e Corning® Matrigel® Matrix na proporção 1:1 e foram inoculados em camundongos SCID-Beige. Por último, para inoculação de células tumorais de tumores de cólon humano HCT-116, foi injetado 100 μ l de PBS contendo 4×10^6 células em camundongos *nude*.

Todos os experimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3 Preparação da solução salina hipertônica

Para preparar 500 ml de HSS 7,5% p/v, foram diluídos 34 g de Cloreto de Sódio em 485 ml de PBS [1x]. O pH foi ajustado para 7,4 e antes do uso alíquotas foram filtradas em filtros de seringa (BD) de 0,5 μ m.

3.4 Ultrassonografia

3.4.1 Ultrassonografia com Doppler Colorido

Ultrassonografia com Doppler Colorido foi realizada para avaliar as alterações na velocidade de fluxo de sangue em vasos tumorais antes e depois da administração intravenosa (i.v.) de HSS 7,5% ou PBS em camundongos com diferentes modelos tumorais. O equipamento utilizado foi o VEVO 2100 que fornece ultrassonografia de alta resolução (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá). A aquisição da imagem foi realizada com a sonda MS-550D (frequência 40 MHz, largura de banda de 22-55 MHz, resolução axial 40 μ M).

Os animais com volume tumoral entre 300-800 mm³ sem presença de áreas ulceradas foram anestesiados com Isoflurano (3% para indução, 1, 5% para manutenção)⁵⁹ e fluxo de 1L/min de O₂. Cada camundongo foi mantido em uma mesa de imagem aquecida com monitoramento de ECG e ventilação.

Foi realizada uma primeira aquisição de imagem em modo-B para medir as dimensões do tumor previamente depilado com creme depilatório. O Modo Doppler colorido foi utilizado para reconhecer os vasos tumorais. Depois de escolher um dos vasos (favorecendo aqueles localizados centralmente), o volume de amostra (*sample volume*) foi corretamente localizado e o ângulo Doppler ajustado (<60°).

O espectro de velocidade foi obtido com Doppler pulsado (PW). A medição foi realizada durante 0,6 segundos ou durante 3 ciclos cardíacos contínuos. Após esta medida inicial, um *bolus* (administração rápida de uma dose única) de HSS ou PBS (4 mL/kg) foi injetado na veia da cauda do camundongo. Novamente foram realizadas medições a cada minuto ou a cada 1, 3, 5 e 10 minutos após injeção, mantendo o mesmo volume de amostra (SV). As configurações da medição foram mantidas constantes para todos os animais (ganho do Doppler de 25dB, filtro de parede de 40Hz, frequência de repetição de pulso (PRF) de 4 KHz). O mesmo protocolo foi aplicado para o Doppler Colorido das artérias segmentares do rim esquerdo dos camundongos.

3.4.2 Ultrassonografia com contraste por microbolhas (CEUS)

Experimentos desenvolvidos por Ultrassonografia com contraste por microbolhas não linear foram feitos durante um estágio de 3 meses no Moffitt Cancer Center, Tampa FL, EU.

A Ultrassonografia CEUS foi realizada utilizando o equipamento VEVO 2100 (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) e o transdutor MS-250 (frequência central de 18 MHz, largura de banda de 13-24 MHz, resolução axial de 75 mm). Os parâmetros de aquisição foram mantidos constantes para todos os experimentos (*Power 4%, gate size of 4, wide beamwidth, 12dB Contrast Gain, 1 Hz Frame rate, 50dB Dynamic range*)⁶⁰⁻⁶³ e a compensação de ganho tecidual (CTGs) fixada.

Cada camundongo foi canulado com um ou dois cateteres 24G (BD, USA) na veia da cauda. Quando foi utilizado apenas um cateter, dois tubos de silicone foram

conectados ao cateter para administrar separadamente o contraste e as soluções. Os animais foram anestesiados com Isoflurano (3% para indução, 1,5% para manutenção) com fluxo de 1L/min de O₂. A temperatura corporal foi controlada e mantida estritamente entre 36-37°C e o transdutor foi alinhado no plano central do tumor usando o micromanipulador.

O contraste Vevo MicroMarker® (VisualSonics, Toronto, ON, Canadá) foi administrado através do cateter com uma bomba de infusão a uma taxa de 10 µl/min. Para os estudos com tumores B16F10 e MDA-MB-231 o contraste foi diluído para uma concentração de 2×10^9 microbolhas/ml. Devido ao baixo sinal de contraste dos tumores HCT-116 a diluição usada foi de $2,5 \times 10^9$ microbolhas/ml.

Para cada tipo de tumor, o tempo para atingir o equilíbrio de intensidade do contraste foi estimado antes da realização do experimento. Uma vez assumido o tempo de *plateau*, foi injetado um *bolus* de HSS ou PBS através do segundo cateter (ou segundo tubo) mantendo constante a infusão das microbolhas através do primeiro cateter (ou primeiro tubo). Foi feito monitoramento em tempo real desde o começo da infusão até 12-15 minutos após para avaliar tanto o nível basal de intensidade do contraste como as alterações posteriores.

3.5 Terapia com cisplatina

3.5.1 Tratamento in-vivo com cisplatina diluída em HSS 7,5%

Camundongos C57BL/6 com tumor B16F10 foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n = 5 por grupo). Os primeiros dois grupos foram tratados com cisplatina (7 mg/kg) diluído em HSS 7,5% ou PBS, os seguintes dois grupos foram tratados com HSS 7,5% ou PBS unicamente. Começando no dia 7 após inoculação das células tumorais, 100 µL do tratamento escolhido foram injetados através da veia da cauda a cada 5 dias até completar três doses. No último dia de tratamento foi realizada coleta de sangue terminal por punção cardíaca (300-400 µL) e os tumores foram extraídos e pesados.

Para todas as curvas de crescimento tumoral, o volume do tumor foi calculado utilizando a fórmula de um esferoide prolato: $V = \pi / 6 \times L \times W \times D$.

A nefrotoxicidade do tratamento nos camundongos foi avaliada através dos

níveis de creatinina sérica medidos pelo Laboratório Central da FMUSP nas amostras de sangue coletadas.

3.5.2 Citometria de Fluxo para avaliação de morte celular

Numa placa de 12 poços foram colocadas aproximadamente 8×10^4 células/poço de células B16F10 e em outra placa de 12 poços, 5×10^4 células/poço de células SK-MEL-147. Quatro grupos de tratamento foram delineados. Dois grupos foram tratados com cisplatina (50 mM para B16F10 e 25 mM para SK-MEL-147) sendo que em um dos grupos a cisplatina foi diluída em HSS 7,5% e no outro em PBS. Os outros dois grupos foram tratados com HSS 7,5% ou com PBS exclusivamente. A duração do tratamento foi de 24 e 48 horas para as células B16F10 e apenas 24 horas para SK-MEL-147. A percentagem de morte celular foi estimada através da quantificação de iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo (BD Biosciences FACS Calibur). A análise dos dados foi feita com o *software* BD Cell Quest Pro.

3.5.3 Imunofluorescência com anticorpo anti γ -H2AX

Doze dias após a inoculação de células tumorais B16F10, os camundongos foram aleatoriamente distribuídos nos diferentes grupos de tratamento. Dois grupos receberam 100 μ l de cisplatina (7 mg/kg)⁶⁴ por via intraperitoneal (i.p.) e 2-3 minutos depois 4 ml/kg de HSS ou de PBS administrados na veia da cauda. Os grupos controle receberam 100 μ l de PBS i.p e depois HSS ou PBS i.v (4 mL/kg). Seis horas mais tarde, os camundongos foram sacrificados, os tumores extraídos e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise por imunofluorescência.

Amostras de tumor de cada grupo (n=3) foram cortadas no criostato para obter secções de 8 μ m que foram fixadas em acetona (-21 ° C) durante 10 min. Depois da secagem, as lâminas foram lavadas com PBS/BSA 1% durante 5 min (3x) e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% e Citrato de sódio 0,1% durante 10 min, e em seguida lavou-se novamente com PBS/BSA 1% durante 5 min (3x). Os cortes foram bloqueados com PBS/BSA 2% durante uma hora e incubados *overnight* a 4 °C em uma câmara úmida com o anticorpo primário anti-fosfo-Histona H2AX-Ser139 (JBW301,

Millipore) previamente diluído 1:200 em PBS/BSA 1%. A incubação com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo Alexa 546 (1:500, Invitrogen) foi realizada durante uma hora à temperatura ambiente junto com o marcador de núcleo Hoechst 33342 (1:800, Sigma). Um controle negativo sem anticorpo primário foi realizado. Finalmente as lâminas foram lavadas com PBS/BSA 1% durante 10 min (3x) e montadas com glicerol/PBS (1:1). Os cortes foram visualizados por microscopia confocal e fotos representativas foram adquiridas⁶⁵⁻⁶⁸.

3.5.4 Tratamento in-vivo com cisplatina e HSS 7,5% administradas por vias diferentes

Foram realizados quatro grupos (n=6) de camundongos C57BL/6 com tumor B16F10. Os primeiros dois grupos foram tratados com cisplatina i.p (4 mg/kg)⁶⁹ e dois minutos depois foi injetado i.v HSS (4ml/kg) em um grupo e no outro PBS (4ml/kg). Os outros dois grupos foram tratados com PBS i.p (4 ml/kg) e dois minutos depois foi injetado i.v HSS (4ml/kg) em um grupo e no outro PBS (4ml/kg). Duas doses em total foram administradas nos dias 7 e 12 após inoculação de células tumorais. No final do experimento os animais foram sacrificados e os tumores coletados para serem pesados.

3.6 Terapia com doxorrubicina

Quatro grupos (n=5) de camundongos BALB/c inoculados com células de câncer de mama murino 4T1 receberam tratamento começando no dia 7 após o inóculo. Para todos os grupos, os animais foram injetados através de uma cânula (Vevo Micromarker TVA, Visualsonics) na veia da cauda. Nos primeiros dois grupos os animais foram injetados com um *bolus* i.v de HSS 7,5% (4ml/kg) ou de PBS (4ml/kg) respectivamente, seguido por doxorrubicina (4 mg/kg). Nos grupos controle o tratamento foi: no terceiro grupo, injeção i.v de HSS 7,5% (4ml/kg) seguido por PBS e no quarto grupo injeção i.v de PBS (4ml/kg) seguido por *bolus* i.v de PBS. Foram administradas três doses no total a cada 5 dias. No dia 29 após o inóculo tumoral os camundongos foram sacrificados e feita extração e peso dos tumores.

3.7 Imagem por epifluorescência

Camundongos *nude* fêmeas (n = 7) e camundongos NOD/SCD machos (n = 7) foram inoculados subcutaneamente com 4×10^6 células SK-MEL-147. Nove dias após o inóculo das células, os camundongos foram injetados através de uma cânula na veia da cauda (Vevo Micromarker TVA, Visualsonics) com o contraste ótico IR-783^{58,70} (Sigma) (4,5mg/kg) e imediatamente após foi administrado um *bolus* de HSS 7,5% ou PBS (4ml/ kg). Aproximadamente 16 horas após, os camundongos foram anestesiados com Isoflurano 2% e colocados na câmara do sistema de imagem *in-vivo* (IVIS-Caliper/PerkinElmer) para aquisição de imagens por epifluorescência (filtro de excitação: 710 nm, filtro de emissão: 820 nm, tempo de exposição: 2 s, Bin: (M) 16/2, f /stop: 2, campo de visão (FOV): 22,6 cm). As imagens foram analisadas com o *software* Living Image. A região de interesse (ROI) foi selecionada no tumor *in-situ* ou *ex-vivo* e normalizada com um ROI de igual tamanho no dorso ou músculo para quantificação da intensidade relativa.

3.8 Análise estatística

Para os experimentos relacionados com imagens funcionais as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism versão 6.0 (*software* GraphPad). O teste de Mann-Whitney U não paramétrico foi aplicado para comparações de dois grupos independentes. Foi utilizado o teste t pareado (taxa) para comparar os grupos de amostra pequena (n=3) emparelhados.

Nos outros experimentos foi utilizado o GraphPad Prism versão 4.0 (*software* GraphPad). As curvas de crescimento de tumor foram analisadas pelo teste de ANOVA medidas repetidas seguido pelo teste de Bonferroni ou de Tukey-Kramer. Para comparações de dois grupos independentes, o teste Mann-Whitney U foi aplicado e para mais de dois grupos independentes foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

Todos os testes estatísticos foram bilaterais e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo⁷¹.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da HSS na hemodinâmica tumoral

Com o propósito de avaliar as alterações causadas pela injeção de HSS sobre a velocidade do sangue dentro dos vasos tumorais e no volume de sangue no tumor, foram usados métodos de imagem funcionais que permitissem monitorar a dinâmica vascular tumoral em tempo real.

Foram injetados em camundongos C56BL/6 um *bolus* de 4ml/kg (3ml/kg para o experimentos de ultrassonografia com contraste por microbolhas), a escolha desta dose foi baseada em estudos prévios nos quais foi administrada a mesma dose de HSS 7,5% em pacientes com choque cardiogênico⁷² e em pacientes saudáveis⁷³. Estes trabalhos mostram que a injeção de HSS resulta em um aumento rápido do volume plasmático e com efeitos adversos toleráveis como dor de cabeça, sensação de calor no peito e tremor do corpo todo.

Contudo, é importante relatar que durante a realização dos experimentos observamos que a injeção rápida de HSS induziu parada cardíaca em alguns dos animais anestesiados. Na literatura^{74,75} a HSS tem sido relacionada a hipotensão aguda devido a uma diminuição rápida da resistência periférica total. Por conta disto, a administração dos *bolus* intravenosos foi realizada lentamente.

4.1.1 A velocidade do sangue nos vasos tumorais é aumentada após a administração i.v de HSS 7,5 %

A ultrassonografia com Doppler colorido fornece informações sobre a direção e velocidade do sangue dentro do vaso. Além disto, o equipamento usado, o Vevo 2100 (VisualSonics Inc , Toronto, Canada) é um equipamento que trabalha a alta frequência (> 20 MHz) e portanto, permite estimar o fluxo em vasos tão pequenos quanto 30 μm ⁷⁶. O estudo foi realizado em três modelos tumorais: melanoma murino B16F10, melanoma humano SK-Mel-147 e câncer de mama murino 4T1. Os volumes dos tumores estudados foram entre 300-800 mm³ sem diferença estatística entre os grupos.

Os tumores B16F10 são caracterizados por serem tumores altamente vascularizados e com microvasculatura bem definida⁷⁷. Os resultados obtidos neste tipo tumoral mostram que após administração de HSS existe aumento da velocidade do sangue dentro dos vasos principalmente dentro dos primeiros três minutos (Figura 1A e 1C) e a mudança da área sob a curva (AUC) da velocidade do sangue neste intervalo de tempo do grupo tratado com HSS (n=9) apresenta um aumento em relação à velocidade inicial (antes do tratamento) (Mediana = 4,16) em comparação com o grupo PBS (n=5; Mediana=2,85) (U=5, p=0,019) (Figura 1G). A maioria destes tumores apresentaram o pico de aumento da velocidade sanguínea durante o primeiro minuto (Figura 1C).

Os tumores SK-MEL-147 são derivados de focos de metástase de melanoma humano e crescem agressivamente em camundongos *nude* atímicos^{78,79}. Quando analisados por imagem com Doppler colorido poucos vasos foram observáveis (Figura 1B). Depois de injetar um *bolus* de HSS ou PBS nos camundongos, foi percebido um incremento na velocidade na maioria dos tumores durante os primeiros cinco minutos (Figura 1D) e a mudança da área sob a curva (AUC) da velocidade do sangue do grupo HSS (n=4, Mediana=9,22) aumentou em comparação ao grupo PBS (n=4, Mediana=4,43) (U=0, p=0,028) (Figura 1G).

Células 4T1 crescem em camundongos Balb/c formando tumores altamente celulares com uma elevada taxa de crescimento, apresentando extensas áreas de necrose central^{80,81}. Observamos que nesse tipo tumoral o grupo tratado com HSS também apresentou aumento da área sob a curva (AUC) da velocidade sanguínea (n=5, mediana = 15,5) em comparação com o grupo PBS (n=5, mediana=10,5) durante 10 minutos (U=1, p = 0,015) (Figura 1E e 1G).

Apesar de terem sido observadas mudanças na velocidade do sangue nos vasos tumorais após administração de HSS, não foi possível observar um efeito notável sobre a velocidade do sangue nas artérias segmentares do rim esquerdo em camundongos C57BL/6. As medianas para grupos HSS e PBS foram 5,66 e 6,42 respectivamente (U=8, p=0,4762) (Figura 1E e 1G). Todos os testes estatísticos foram Mann Whitney bicaudal.

Figura 1. Alterações na velocidade do sangue provocadas pela administração i.v de solução salina hipertônica (HSS) A-B) Imagens representativas de Ultrassonografia com Doppler colorido de vasos tumorais B16F10 e SK-Mel- 147 antes e após a injeção de um *bolus* de HSS de 7,5% (4 ml / kg) C-F) Curvas de razão da mudança da velocidade média sanguínea nos vasos tumorais ao longo do tempo em: C) Camundongos C57BL/6 com tumor B16F10 (n1=9, n2=5) D) Camundongos *nude* atômicos com tumor SK-MEL-147 (n = 4) E) Camundongos Balb/c portadores de tumor 4T1 (n=5) e F) Artérias segmentares do rim esquerdo (n=5) de camundongos C57BL/6 G) Razão de mudança da área sob a curva (AUC) das velocidades do sangue nos diferentes tumores e o rim em relação à linha de base. Pontos de dispersão: Camundongos individuais. Mann Whitney U-teste bi-caudal.

4.1.2 A volume de sangue no tumor aumenta após a administração i.v de HSS 7,5 %

Os achados da Ultrassonografia com Doppler Colorido indicam que a velocidade do sangue no tumor aumenta quando a HSS é administrada. Além disso é necessário avaliar outros parâmetros com relação a hemodinâmica na microvasculatura tumoral. A ultrassonografia com contraste por microbolhas (CEUS) é uma técnica de imagem baseada em agentes que se assemelham as hemácias⁶² e que desse modo, são exclusivamente retidas no espaço intravascular. O agente usado para o presente trabalho foi o Vevo MicroMarker® (VisualSonics, Toronto, ON, Canadá), microbolhas compostas por um centro de gás de nitrogênio e perfluorobutano e coberta exteriormente de Polietileno glicol, fosfolipídios e ácidos graxos, apresentando um tamanho aproximado entre 2,3 e 2,9 μm .

Após a injeção de microbolhas na corrente sanguínea, emite-se um pulso de alta frequência e baixo índice mecânico (MI), através do transdutor do ultrassom, que induz a oscilação não linear nas microbolhas. A energia não linear fundamental e a energia subharmônica liberadas pelas microbolhas são processadas pelo método de modulação de amplitude⁸². Esse método permite distinguir o sinal do contraste em relação ao sinal do tecido e, por conseguinte, a obtenção de informação em tempo real sobre o realce da lesão.

Após uma revisão de literatura observamos que a maioria dos estudos que utilizam CEUS são baseados principalmente em dois modelos: o modelo do *bolus* e o modelo de destruição–reabastecimento do contraste. Como nenhum dos modelos permite avaliar continuamente as alterações do volume de sangue no ROI do tumor, uma nova metodologia foi desenvolvida (Ver *Materiais e métodos*).

Três tipos diferentes de tumor foram estudados no CEUS: B16F10, HCT-116 e MDA-MB-231 (n=3 por grupo). Como as microbolhas foram administradas por infusão, foi possível injetar um *bolus* i.v de HSS 7,5% ou PBS (3 mL/kg) imediatamente após o contraste ter atingido o equilíbrio no tumor. Alteramos o volume de HSS administrado, diminuindo de 4 mL/kg para 3 mL/kg, a fim de reduzir o risco de hipervolemia no animal⁸³. Cada camundongo foi injetado com HSS ou PBS e no dia seguinte o animal que recebeu uma injeção de PBS foi inoculado com HSS e vice-versa. Esta estratégia foi adotada para assegurar que cada animal fosse o seu próprio controle.

Observamos que os tumores B16F10 com volumes de 748 mm³, 200 mm³ e 810 mm³, mostraram um aumento percentual do volume de sangue de 38,29%, 20,79% e 31,38% respectivamente, quando injetados com HSS em comparação ao PBS durante os 3 primeiros minutos ($p = 0,0219$) (Figura 2A e 2E). Estes achados são consistentes com aqueles previamente documentados por Ultrassonografia Doppler.

Nos tumores de cólon humano HCT- 116 (Figura 2D) com volumes de 228 mm³, 200 mm³ e 320 mm³ observamos um incremento do volume sanguíneo de 37,19 %, 56,16 % e 90,01%, respectivamente, durante 5 minutos ($p = 0,0386$) quando injetados com HSS (Figura 2B e 2E).

Tumores de câncer de mama humano MDA-MB-231, com volumes de 432mm³, 345mm³ e 547mm³ não apresentaram mudança alguma ou, pelo contrário, tiveram diminuição do volume em -13,99 % e -10,94 % ($p=0,1858$) na presença de HSS (Figura 2C e 2E).

Já os tecidos normais exibiram alterações sem significância estatística. No rim a diferença foi de -8,23%, -5,47% e 13,88% ($p=0,9575$) enquanto o músculo apresentou aumento no volume de sangue de 8,21%, 3,07 % e 13,36% ($p=0,1045$) (Figura 2E). Todos os testes estatísticos para este estudo foram bicaudais e aplicado o teste t pareado⁸⁴.

Figura 2. Efeito da administração HSS sobre o volume de sangue no tumor A-C). Curvas representativas da razão de mudança da intensidade em relação a linha de base quando injetado PBS ou HSS (3 ml/kg) obtidas a partir de Ultrassonografia com contraste por microbolhas nos seguintes tumores subcutâneos: **A)** B16F10, **B)** HCT-116 e **C)** MDA-MB-231. O mesmo camundongo foi injetado com HSS ou PBS por dia em 2 dias consecutivos. **D)** Imagens representativas do ROI no tumor HCT-116 comparando-se o realce do contraste basal (esquerda) com o realce pico após a injeção de HSS 7,5% (direita). Acima: Imagens no modo de contraste não-linear. Abaixo: Mapas coloridos das imagens de contraste. **E)** Variação percentual do volume de sangue Relativa entre os camundongos tratados com HSS e PBS. Pontos de dispersão: Camundongos individuais.

4.2 Efeito da quimioterapia quando administrada com HSS

4.2.1 Cisplatina diluída em HSS 7,5% tem efeito terapêutico e toxicidade in-vivo diminuídas

Para avaliar os efeitos da HSS sobre a entrega de quimioterapia no tumor, foi administrada cisplatina diluída em HSS (i.v) em camundongos C57BL/6 portadores de tumor B16F10 em um regime de três doses.

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com cisplatina diluída em HSS 7,5 % não apresenta melhoria terapêutica em comparação com cisplatina diluída em PBS. Pelo contrário, a presença de HSS parece diminuir o efeito de cisplatina, pois com esta combinação observamos uma menor redução do volume tumoral e maiores pesos

tumorais (**Figura 3A e 3B**). Além disto, observamos que o volume dos tumores no grupo de HSS eram maiores quando comparados aos outros grupos ($p < 0,01$).

O grupo cisplatina/PBS teve um efeito notável no peso tumoral em relação ao grupo controle PBS (Teste Kruskal-Wallis $p = 0.0035$, *mean rank* de 13 para o grupo PBS e de 2,8 para cisplatina/PBS), indicando que a cisplatina administrada apresentou efeito terapêutico.

O grau de nefrotoxicidade provocada pela terapia com cisplatina⁸⁵ foi avaliada através dos níveis séricos de creatinina. O grupo cisplatina/PBS apresentou maiores níveis séricos de creatinina comparado ao observado no grupo cisplatina/HSS (**Figura 3C**), indicando que não só é diminuído o efeito terapêutico da cisplatina quando administrada com HSS, mas o seu efeito tóxico também é diminuído (Teste Kruskal-Wallis $p = 0.0237$, *mean rank* de 13 para o grupo cisplatina/PBS e de 5,5 para cisplatina/HSS).

Figura 3. Resposta tumoral ao tratamento com cisplatina diluída em HSS. A) Curvas de crescimento dos tumores de melanoma B16F10 para cada grupo de tratamento ($n=5$ por grupo). Os dados são representados como média $\pm$ s.e.m. Teste de medidas repetidas *Two-way* ANOVA e correção de Bonferroni para comparações múltiplas. (** $p < 0,01$) B) Pesos dos tumores de acordo com o grupo de tratamento. Teste de Kruskal-Wallis. (** $p < 0,01$) C) Avaliação da nefrotoxicidade após o tratamento com através dos níveis de creatinina sérica. Teste de Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$)

4.2.1.1 Morte celular diminui quando as células de melanoma são tratadas com cisplatina diluída em HSS 7,5%

A fim de elucidar a redução do efeito da cisplatina quando diluída em HSS e considerando uma possível interação entre a cisplatina e a HSS, foi executado um experimento *in-vitro* em que células de melanoma B16F10 e SKMel-147 fossem expostas diretamente a cada um dos tratamentos.

Observamos que a morte celular (%), medida por ensaio de iodeto de propídeo (PI) no citômetro de fluxo, diminui substancialmente quando ambos os tipos de células de melanoma são tratados com cisplatina diluída em HSS, 24 e 48 horas após o tratamento (**Figura 4**).

Figura 4. Resposta *in vitro* de células tratadas com cisplatina diluída em HSS
 A) Fotomicrografias representativas mostrando células B16F10 cultivadas após 48 horas com HSS e/ou cisplatina e os respectivos controles com PBS. B) Percentagem de morte celular detectada por citometria de fluxo de células coradas com PI para cada grupo de tratamento

4.2.1.2 Dano ao DNA é similar nos tratamentos *in-vivo* com cisplatina/HSS e cisplatina/PBS

Dada a diminuição do efeito terapêutico da cisplatina quando diluída em HSS, o esquema de administração destes tratamentos foi modificado, injetando cada um através de diferentes vias a fim de evitar uma interação direta entre cisplatina e HSS. Portanto, a cisplatina passou a ser injetada por via i.p, pois a sua absorção continua sendo ótima e mantivemos a injeção de HSS ou PBS por via i.v, uma vez que seu efeito é dependente

da sua presença dentro do vaso.

A fim de avaliar se o efeito agudo do tratamento combinado através do grau de dano no DNA, foi primeiro injetada em camundongos com tumor B16F10, uma dose elevada de i.p (7 mg/kg) e aproximadamente após 2-3 minutos, foi realizada uma injeção de HSS i.v na veia da cauda. Após 6 horas os animais foram sacrificados e foi avaliada por imunofluorescência a presença de histona H2AX fosforilada nas secções dos tumores extraídos.

Vários estudos têm mostrado que após exposição a cisplatina existe formação de focos de histona H2AX fosforilada no DNA, mecanismo que ocorre para sinalizar a presença de uma lesão crítica como quebra de dupla fita no DNA e melhorar assim a eficiência no reparo⁶⁷. Embora este seja um fenômeno que usualmente ocorre imediatamente após danos no DNA, a exposição à cisplatina induz a formação destes focos mais tardiamente. Por essa razão o sacrifício dos animais foi realizado 6 horas após o tratamento.

Os resultados do ensaio de imunofluorescência para visualização de γ -H2AX em secções de tumor dos diferentes grupos de tratamento (**Figura 5**), sugerem que o dano agudo ao DNA causado pelo tratamento com cisplatina/HSS parece não ter nenhuma diferença comparado ao tratamento cisplatina/ PBS.

Figura 5. Detecção por imunofluorescência de focos nucleares γ -H2AX em tumores B16F10. Cortes de tumores do grupo de controle foram predominantemente negativos para γ -H2AX. Os camundongos que receberam, 6 horas antes do sacrifício, uma dose de tratamento combinado cisplatina (i.p) com HSS 7,5 % ou PBS (i.v) mostraram um padrão semelhante de focos nucleares de γ -H2AX. (Barra de escala representa 20 μ m)

4.2.2 Tratamento com Cisplatina/HSS 7,5% administrado por vias diferentes não tem benefício terapêutico in-vivo

Para avaliar os efeitos do esquema de tratamento no crescimento tumoral com o esquema de tratamento modificado (administrado por vias diferentes), uma dose sub-terapêutica de cisplatina (4 mg/kg) foi utilizada. A dose de cisplatina foi diminuída considerando que a dose plena pode mascarar um possível efeito sinérgico. No entanto,

o tratamento combinado de cisplatina i.p e HSS i.v não mostrou melhoria alguma no efeito terapêutico em comparação com a cisplatina i.p e PBS i.v em camundongos com tumor B16F10 (**Figura 6**).

Figura 6. Resposta tumoral ao tratamento com cisplatina e HSS administrados por vias diferentes. A) Curvas de crescimento dos tumores de melanoma B16F10 para cada grupo de tratamento (n=6 por grupo). Os dados são representados como média $\pm$ s.e.m. O crescimento tumoral do grupo HSS foi significativamente diferente do grupo tratado com cisplatina/PBS. Teste de medidas repetidas *Two-way* ANOVA e correção de Bonferroni para comparações múltiplas. (*p < 0,05) B) Pesos dos tumores de acordo com o grupo de tratamento. Não houve diferenças significativas. Teste de Kruskal -Wallis.

4.2.3 Tratamento com doxorrubicina e HSS 7,5% não tem benefício terapêutico in-vivo

Visto que nos vasos de tumores 4T1 existe um aumento na velocidade do sangue 4-6 minutos após a injeção de HSS, foi delineado um experimento que levasse em consideração esta demora para aumentar a probabilidade de observar efeito sinérgico com o tratamento combinado (doxorrubicina/HSS). Assim, em cada animal foi colocada uma cânula na qual se injetaram i.v: uma primeira injeção de HSS/PBS e imediatamente após uma dose de doxorrubicina (4mg/kg), sendo que o pico de concentração plasmática da droga ocorre aos 5 minutos⁸⁶. A maioria dos estudos em camundongos com tumor 4T1 utilizaram doses terapêuticas de 8-10 mg/kg⁸⁷⁻⁸⁹, no entanto, embora estes estudos obtiveram bons resultados terapêuticos estes estavam associados à níveis tóxicos elevados, portanto, a dose escolhida para este estudo foi reduzida a fim de alcançar efeito terapêutico e reduzir toxicidade com o tratamento combinado.

Resultados obtidos mostram que o tratamento isolado e os tratamentos combinados reduziram o crescimento tumoral em comparação com o controle PBS ($p < 0,01$). No entanto não existiu uma diferença significativa entre os grupos de tratamento (Figura 7A). Chama atenção o efeito que a HSS isolada teve sobre o crescimento tumoral, pois os tumores tiveram volumes consideravelmente menores quando comparados com o grupo PBS. Este dado sugere que o uso de HSS isolada não é inócuo.

Quando avaliadas as mudanças nos pesos tumorais, só o grupo doxorubicina/HSS teve diferença estatística com o grupo PBS (Teste Kruskal-Wallis $p = 0.0192$, *mean rank* de 17,2 para o grupo PBS e de 6,2 para doxorubicina/HSS) (Figura 7B). Os resultados indicam que ambos os tratamentos com doxorubicina foram efetivos e diferente do observado com cisplatina, a HSS não apresentou interação substancial com a doxorubicina quando administradas conforme o esquema de tratamento planejado (tempos diferentes através de uma cânula). Isto porque previamente foi testado a diluição de doxorubicina em pó diretamente em HSS e foi observada precipitação da droga. Razão pela qual o tratamento foi modificado e aplicado de uma forma onde apresenta-se uma interação menor.

Figura 7. Resposta tumoral ao tratamento com doxorubicina e HSS administrados seguidamente. A) Curvas de crescimento dos tumores de mama 4T1 para cada grupo de tratamento ($n=5$ por grupo). Os dados são representados como média $\pm$ s.e.m. Não houve diferença estatística entre os grupos doxorubicina/HSS e doxorubicina/PBS. Teste de medidas repetidas *Two-way* ANOVA e correção de Bonferroni para comparações múltiplas (** $p < 0,01$). B) Os pesos dos tumores foram estatisticamente diferentes entre os grupos PBS e PBS/HSS (* $p < 0.05$). Teste de Kruskal –Wallis e correção de Dunn para comparações múltiplas.

4.3 Efeito da HSS sobre a entrega de macromoléculas

4.3.1 Imagem por epifluorescência in vivo quando HSS é administrada após a injeção de contraste ótico: O tumor não apresenta um aumento substancial no sinal

Com propósito de avaliar o efeito da HSS sobre a entrega do IR-783, foi injetado este contraste através de um cateter em animais com tumor SK-Mel-147 ou 4T1, e seguidamente um *bolus* de HSS ou PBS. Imagens tardias dos camundongos (16 h após injeção do contraste) foram obtidas no IVIS. A medição da eficiência radiante média do ROI tumoral e a relação ROI tumor/ROI tecido controle, não mostram diferenças significativas entre os grupos de tratamento. Uma vez que o tamanho do efeito não é o suficientemente grande, considera-se que não existe diferença significativa (**Figura 8**).

Figura 8. Imagem por epifluorescência próximo do infravermelho (NIR) A e C). Imagens mostram camundongos *nude* com tumor SK-Mel-147 (linha superior) e camundongos NOD/SCD com tumor 4T1 (linha inferior) 16 horas após injeção do contraste, seguido de um *bolus* de PBS ou HSS. **B)** Eficiência radiante média dos tumores SK-Mel-147 de acordo com o tratamento (n=4 por grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos. Mann Whitney U-teste bi-caudal ($p > 0,5$). **D)** Tumores 4T1 extraídos dos camundongos NOD/SCD (acima). Eficiência radiante média dos tumores 4T1 de acordo com o tratamento (n=3 por grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos. Mann Whitney U-teste bi-caudal ($p > 0,7$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Solução salina hipertônica aumenta o fluxo vascular tumoral

Os resultados obtidos através da ultrassonografia Doppler e com Contraste demonstram que a HSS produz um aumento transitório tanto na velocidade do sangue nos vasos como no volume sanguíneo dos tumores estudados, com exceção do tumor MDA-MB-231. O efeito ocorre preferencialmente na vasculatura tumoral e não na vasculatura normal.

Sugere-se que devido ao efeito da HSS, a pressão hidrostática é elevada dentro dos vasos, enquanto a viscosidade é diminuída, o que permite que o fluido, nesse caso o sangue, flua mais rapidamente⁹⁰.

A HSS aumenta a pressão hidrostática intravascular devido ao efeito hipertônico. A água é extraída a partir do endotélio, das células circulantes e do espaço intersticial para o espaço intravascular, causando um aumento na pressão sanguínea sistêmica⁴⁶. Em um estado hipertensivo muitos dos vasos apresentam mecanismos de auto-regulação para manter o fluxo sanguíneo constante⁹¹. No entanto, o sistema vascular do tumor carece de mecanismos eficientes de regulação do fluxo, assim como exibe uma perda quase completa do controle do diâmetro vascular¹⁶. Desse modo, a HSS pode ter efeitos relativamente seletivos sobre o tecido tumoral³⁹. Propõe-se também que esse aumento transitório da pressão intravascular permita recrutar aqueles vasos tumorais que mesmo com o lúmen aberto, não apresentam fluxo nenhum, seja porque ocorre perda do gradiente de pressão que estimula a fluidez ou porque o grau de hemoconcentração é tal que as hemácias os ocluem.

No tumor a viscosidade do sangue é aumentada por vários fatores. Os efeitos Fahraeus e Fahraeus-Lindqvist (discutidos na *Introdução*) são menos pronunciados em tumores, pois os diâmetros dos vasos tumorais são maiores, circulam um maior número de leucócitos assim como células tumorais e a alta permeabilidade dos vasos tumorais fazem com que o hematócrito seja maior na microvasculatura tumoral³¹. A HSS favorece a redução desta viscosidade, aumentando substancialmente o volume plasmático.

Além disso, a área da secção transversal do vaso tumoral pode ser uma medida estimada, uma vez que não tenha sido obtida uma medição verossímil do diâmetro

através de Ultrassonografia de Doppler colorido devido à natureza transitória do efeito. No entanto, foi documentada vasodilatação em todos os casos após injeção da HSS, fenômeno previamente observado em vários estudos⁴⁶.

A lei de Pouseuille⁹², muitas vezes aplicada a hemodinâmica do tumor é um modelo simplista, no entanto didático^{32,14,93}, que indica que quando a diferença de pressão entre os lados extremos da rede vascular é elevada, a viscosidade do sangue é diminuída e o diâmetro do vaso é aumentado (todas respostas induzidas pela administração de HSS). Isso resultará em um aumento no fluxo de sangue dado que o Fluxo (F) é diretamente proporcional à diferença de pressões e ao raio à quarta potência do vaso (r^4) e é inversamente proporcional ao comprimento (L) do vaso e oito vezes a viscosidade (η) do sangue.

Os dados aqui apresentados mostram notáveis efeitos hemodinâmicos induzidos pela administração i.v de HSS sobre o tumor. Desta forma a HSS 7,5 % pode ser um veículo potencial para aumentar a perfusão de tumores específicos e consequentemente aumentar a captação de moléculas. No entanto, é necessário elucidar o mecanismo subjacente as diferenças observadas na resposta a HSS entre os tipos de tumores e os tumores do mesmo tipo. Sugere-se que a resposta pode estar relacionada a IFP particular para cada tumor, o grau de permeabilidade e maturidade vascular (cobertura pericítica e de células musculares lisas), assim como o nível de compressão dos vasos⁹⁰.

5.2 Efeito da solução salina hipertônica sobre a entrega de moléculas no tumor

Modelos de farmacocinética no tumor apontam os seguintes fatores como limitantes na distribuição de drogas: o fluxo local de sangue, o extravasamento das moléculas através das paredes dos vasos tumorais, o transporte no interstício, a disponibilidade do agente metabólico, o local de ligação, assim como a captação da droga pela mesma célula tumoral. Dependendo do tamanho e das propriedades das moléculas, um dos fatores vai exercer uma influência maior que o outro.

As moléculas de baixo peso molecular que circulam livremente no plasma têm distribuição sistêmica e atingem tanto tecidos tumorais como não tumorais, motivo pelo qual as drogas antineoplásicas de baixo peso molecular tem pouca seletividade tumoral e são mais tóxicas. As propriedades físico-químicas destas moléculas como peso, forma,

carga e hidrofiliçidade determinam a taxa de difusão no tecido assim como o seu consumo⁵. Uma vez extravasadas no tecido tumoral, estas apresentam uma melhor distribuição comparadas, por exemplo, às macromoléculas⁹⁴, pois se movimentam a favor de um gradiente de concentração.

O determinante mais importante na distribuição destas moléculas é capaz de ser modificado é o fluxo local de sangue, pois com um fluxo maior espera-se uma entrega de droga maior. Com isso, hipotetizamos que a distribuição de quimioterápicos de baixo peso molecular poderia ser maior sob efeito da HSS, porque como descrito anteriormente, aumenta o fluxo sanguíneo tumoral com relativa seletividade.

Dado que o efeito da HSS é transitório, foi previamente caracterizado para o tumor B16F10 que o efeito se apresenta durante os primeiros três minutos. Considerando os estudos de farmacocinética e de distribuição tecidual da cisplatina, que indicam que esta é rapidamente distribuída no espaço intravascular com pico de concentração aos 5 min^{95,96}, injetamos a cisplatina diluída em HSS. Desta maneira, garantiríamos que a cisplatina estaria circulando quando ocorresse o efeito da HSS. Essa estratégia, além de ser prática para o delineamento experimental, foi pensada para facilitar a adesão e bem-estar dos pacientes em futuros estudos clínicos.

No entanto, encontrou-se que nesta modalidade o efeito da cisplatina, assim como a toxicidade era reduzida. A redução na toxicidade de cisplatina quando administrada juntamente com HSS já foi descrita na literatura⁹⁷⁻⁹⁹. Embora, durante os anos 80s, vários estudos tenham evidenciado que a utilização de HSS como veículo evita efeitos colaterais de doses de cisplatina aumentadas, ainda não existe algum estudo conclusivo que confirme uma melhora no efeito terapêutico acompanhado de menor toxicidade. Atualmente a informação sobre as causas da falha terapêutica de cisplatina combinada com HSS é limitada.

A cisplatina tem configuração quadrada plana e é constituída por um íon de platina que tem ao redor dois átomos de cloro e duas moléculas de amônio. Uma vez dentro da célula, o mecanismo de ativação da cisplatina depende da substituição de um dos átomos de Cloro por uma molécula de água, sendo deslocada por um átomo de nitrogênio presente nas bases nitrogenadas do DNA (predominantemente do nucleotídeo guanina). Após esta primeira substituição a cisplatina perde o segundo átomo de cloro para se ligar a outro átomo de nitrogênio, formando assim o *cross-linking* de dupla fita.

Assim, a perda do átomo de Cloro da cisplatina ocorre de maneira dependente da concentração de Cloro no meio em que esta se encontra diluída. Desta maneira, a diluição de cisplatina em HSS, uma solução hipercloremica, pode favorecer algum tipo de interação entre a molécula deste quimioterápico e os íons de Cloro em solução. A alteração dos gradientes de concentração de Cloro pode contribuir para a redução da ativação da molécula de cisplatina.

Uma vez confirmada *in-vitro* a diminuição do efeito da cisplatina quando diluída em HSS, o delineamento experimental *in vivo* foi otimizado. No entanto, mesmo alterando as vias de administração nos animais de cisplatina e HSS para diminuir a interação direta entre estas moléculas, não foi obtido aumento do efeito terapêutico deste quimioterápico.

O efeito agudo (dano celular) de cisplatina, avaliado através da fosforilação da histona H2AX, foi similar entre todos os grupos de tratamento com a presença de focos nucleares H2AX positivos seis horas após a exposição à cisplatina. Dado que a fosforilação da histona H2AX após a exposição à cisplatina⁶⁷ é um marcador relacionado com danos severos ao DNA, estes achados se correlacionam com os resultados obtidos após o tratamento combinado sobre o crescimento tumoral e o peso dos tumores nos quais não se evidencia diferença terapêutica entre os tratamentos cisplatina/PBS e cisplatina/HSS.

Visto que o grupo de cisplatina/HSS, quando administrado por vias diferentes, teve resultados similares aos do grupo cisplatina/PBS, é possível que a administração por vias diferentes tenha diminuído a inibição da HSS sobre a cisplatina. No entanto, não podemos excluir a permanência de algum grau de interação entre elas.

Estudos prévios avaliaram o efeito da indução de estados hipertensivos sistêmicos na entrega de moléculas de baixo peso molecular, estes mostram que esta abordagem não resultou em benefício terapêutico. Isto talvez se deva ao fato de que a retenção destas moléculas é muito baixa e estas podem facilmente voltar a circulação por difusão através das paredes dos capilares. Uma das estratégias testadas foi com AT-II¹⁰⁰ e observou-se que o acúmulo de droga no tumor foi mantida por um período inferior à 15 minutos.

Não obstante, também têm sido realizados estudos com Nitroglicerina¹⁰¹⁻¹⁰², nos quais o uso de nitroglicerina combinada com vinorelbina e cisplatina, pode melhorar a resposta global e o tempo de progressão da doença em pacientes com câncer de pulmão

avanzado de células não-pequenas. Embora vários fatores possam estar envolvidos, estes trabalhos revelam aumento do efeito terapêutico de moléculas de baixo peso molecular através de uma estratégia de aumento do fluxo sanguíneo tumoral.

Considerando a possibilidade de “fuga” da cisplatina do tumor para o espaço intravascular e que a rápida depuração plasmática limita a quantidade de droga que penetra o tecido tumoral, torna-se importante avaliar o efeito da HSS na entrega de doxorubicina.

Diferente da cisplatina, o quimioterápico doxorubicina apresenta forte ligação intracelular, o que reduz sua depuração no tecido, tornando possível atingir concentrações maiores de droga no tumor.

Apesar de termos utilizado uma dose de 4mg/kg de doxorubicina para o tratamento dos tumores de mama murino 4T1 a fim de obtermos uma dose subterapêutica, os resultados mostraram que na verdade esta é uma dose bastante efetiva. No grupo doxorubicina/PBS observamos uma regressão quase completa do tumor em 2 de 5 camundongos. Dado que o tratamento combinado doxorubicina/HSS foi igualmente efetivo, com regressão quase completa do tumor em 3 de 5 camundongos, o possível efeito terapêutico do tratamento com HSS pode ter sido mascarado pela eficácia da doxorubicina.

Estudos da distribuição da doxorubicina no tumor indicam que a sua penetração é limitada em parte pela sua alta ligação tecidual. Tem sido descrito que 10 minutos após a injeção de doxorubicina, a maioria da droga é localizada no espaço perivascular e sua fluorescência cai pela metade a distância a partir do vaso de 25-55 μm . Ao longo do tempo a distribuição vai tornando-se mais uniforme mas a intensidade é notavelmente reduzida⁵⁵. Embora espera-se que a HSS aumente o gradiente desta droga no tecido e sua penetração, é possível que, apesar de atingir uma concentração total maior no tumor, a doxorubicina não se distribua homogeneamente e atue predominantemente nas regiões perivasculares.

Curiosamente, o grupo tratado unicamente com HSS teve volumes tumorais significativamente menores quando comparado com o grupo PBS. Além disso, os tumores apresentaram importantes áreas de ulceração após o tratamento com HSS. Assim, sugere-se que a HSS 7,5% pode ter um efeito esclerosante sobre os vasos dos tumores 4T1. A solução já tem sido utilizada com esse o propósito de escleroterapia nas malformações vasculares¹⁰³.

É também importante levar em consideração que o efeito da HSS sobre os tumores 4T1 embora seja uniforme, pois a velocidade do sangue aumenta em todos os tumores, também é altamente heterogêneo, pois a resposta acontece em tempos muito diferentes. Dado que o pico de concentração plasmática da droga acontece aos 5 minutos, foi primeiro injetado um *bolus* de HSS seguido de doxorrubicina a fim de aumentar a probabilidade de se ter presente o efeito hipertônico com uma concentração alta de droga circulante. Apesar das precauções é difícil saber se os fenômenos ocorreram na ordem planejada. Por conta disto, existe a possibilidade de que com a amostra estudada não se tenha conseguido observar a verdadeira diferença entre os tratamentos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a entrega de drogas de baixo peso molecular não é alterada pelo efeito da HSS. Posteriormente avaliamos se a administração da HSS seria uma boa estratégia para melhorar a captação de macromoléculas. Existem vários estudos que descrevem métodos para aumentar o EPR, entre os quais encontra-se a indução de estados hipertensivos. Como o EPR é um efeito que acontece principalmente em macromoléculas e se baseia na retenção aumentada delas no tumor, a HSS poderia favorecer o aumento da concentração destas moléculas através do seu efeito hipertensivo transitório. Adicionalmente, dado que o gradiente de pressões no tumor é perdido; o transporte convectivo do qual dependem as macromoléculas é seriamente comprometido. A HSS também poderia ter um papel na recuperação deste gradiente de pressões.

Observamos que o IR-783, contraste ótico com comportamento biológico de macromolécula, é retido nos tumores SK-Mel-147 e 4T1 por mais de 16 horas após sua administração. No entanto, quando comparados os grupos submetidos a PBS ou HSS, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. O efeito desencadeado pela HSS pode ser muito curto para o EPR, pois este requer maiores períodos de circulação das macromoléculas, e apesar do aumento inicial na captação destas moléculas, quando comparado com o controle horas após sua administração a diferença resultante é mínima. É importante salientar que a amostra aqui avaliada é muito pequena para detectar efeitos não tão grandes. A questão é se mesmo tendo uma diferença estatística significativa, o tratamento com HSS pode produzir resultados clinicamente significativos.

6. CONCLUSÃO GERAL

A administração intravenosa de HSS 7,5%, em dose 4ml/kg e 3ml/kg, apresenta efeitos transitórios que modificam com relativa seletividade à hemodinâmica tumoral. Através das técnicas de imagem funcional, ultrassonografia com Doppler Colorido e com contraste por microbolhas, foi visto que a administração de HSS aumenta a velocidade do sangue nos modelos murinos de tumores de melanoma murino B16F10, melanoma humano SK-MEL-147 e câncer de mama murino 4T1. Além disso, a HSS induz um incremento do volume de sangue nos tumores B16F10 e câncer de cólon humano HCT-116, sem apresentar mudanças significativas nos modelos de câncer de mama humano MDA-MB-231. Apesar que o padrão de resposta à HSS dos tumores estudados é muito variável, a HSS constitui uma estratégia interessante para aumentar o fluxo vascular nos tumores.

A injeção intravenosa de HSS 7,5%, em dose 4ml/kg, não mostrou benefício terapêutico no tratamento dos modelos murinos de tumores B16F10 e 4T1 quando administrada com as drogas de baixo peso molecular cisplatina e doxorrubicina, respectivamente. O uso de HSS também não modificou o sinal *in-vivo* do contraste ótico e biomacromolécula, IR-783 nos modelos murinos de tumores SK-Mel-147 e 4T1. O papel da HSS como estratégia para aumentar a entrega nos tumores de moléculas de baixo peso molecular assim como de macromoléculas ainda permanece por ser definido.

7. REFERÊNCIAS¹

1. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(3):321-331.
2. Dudley AC. Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(3).
3. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*. 2002;160(3):985-1000.
4. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 2000;156(4):1363-1380.
5. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(8):583-592.
6. Stohrer M, Boucher Y, Stangassinger M, Jain RK. Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res*. 2000;60(15):4251-4255.
7. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 2004;427(6976):695.
8. Stylianopoulos T, Martin JD, Snuderl M, Mpekris F, Jain SR, Jain RK. Coevolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression: Implications for vascular collapse. *Cancer Res*. 2013;73(13):3833-3841.
9. Heldin C-H, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):806-13.
10. Baxter LT, Jain RK. Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc Res*. 1989;37(1):77-104.
11. Milosevic MF, Fyles AW, Hill RP. The relationship between elevated interstitial fluid pressure and blood flow in tumors: A bioengineering analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999;43(5):1111-1123.
12. Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014;16:321-46.
13. Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2205-2218.
14. Koumoutsakos P, Pivkin I, Milde F. The Fluid Mechanics of Cancer and Its Therapy. *Annu Rev Fluid Mech*. 2013;45(1):325-355.
15. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review. *Cancer Res*. 1989;49(23):6449-6465.
16. Pries AR, Cornelissen AJM, Sloot AA, et al. Structural adaptation and heterogeneity of normal and tumor microvascular networks. Papin JA, ed. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(5):e1000394.
17. Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res*. 2007;74(2-3):72-84.

¹ Sistema numérico de chamada. De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 10520.

18. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):505-515.
19. Alfarouk KO, Ibrahim ME, Gatenby RA, Brown JS. Riparian ecosystems in human cancers. *Evol Appl*. 2013;6(1):46-53.
20. Horsman MR, Vaupel P. Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment. *Front Oncol*. 2016;6:66.
21. Mark C. Lloyd, Jessica J. Cunningham, Marilyn M. Bui, Robert J. Gillies, Joel S. Brown RAG. Darwinian dynamics of intratumoral heterogeneity: not solely random mutations but also variable environmental selection forces. *Cancer Res*. 2016;76(11):3136-44.
22. Gatenby R a, Gillies RJ, Brown JS. Of cancer and cave fish. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(4):237-238.
23. Hölzel M, Bovier A, Tüting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer*. 2013;13(5):365-76.
24. Kemper K, De Goeje PL, Peeper DS, Van Amerongen R. Phenotype switching: Tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. *Cancer Res*. 2014;74(21):5937-5941.
25. Sheth RA, Hesketh R, Kong DS, Wicky S, Oklu R. Barriers to drug delivery in interventional oncology. *J Vasc Interv Radiol*. 2013;24(8):1201-1207.
26. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-707.
27. Aktipis CA, Boddy AM, Gatenby R a, Brown JS, Maley CC. Life history trade-offs in cancer evolution. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(12):883-92.
28. Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: Radiobiological effects. *Cancer Res*. 1987;47(2):597-601.
29. Tannock IF. Tumor physiology and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2001;20(1-2):123-132.
30. Sevick EM, Jain RK. Geometric resistance to blood flow in solid tumors perfused ex vivo: Effects of tumor size and perfusion pressure. *Cancer Res*. 1989;49(13):3506-3512.
31. Sevick EM, Jain RK. Viscous resistance to blood flow in solid tumors: Effect of hematocrit on intratumor blood viscosity. *Cancer Res*. 1989;49(13):3513-3519.
32. Jain RK. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res*. 1988;48(10):2641-58.
33. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature. *Cardiovasc Res*. 1996;32(4):654-667.
34. Pries AR, Secomb TW. Blood Flow in Microvascular Networks. In: *Microcirculation*. Elsevier Inc.; 2008:3-36.
35. Jain RK. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu Rev Biomed Eng*. 1999;1(96):241-263.
36. Gade TPF, Buchanan IM, Motley MW, Mazaheri Y, Spees WM, Koutcher JA. Imaging intratumoral convection: Pressure-dependent enhancement in chemotherapeutic delivery to solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2009;15(1):247-255.
37. Maeda H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2012;88(3):53-71.
38. Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement

- in solid tumor: Various factors, mechanisms involved and its implications. In: *International Immunopharmacology*. Vol 3. ; 2003:319-328.
39. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(3):136-151.
 40. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release*. 2000;65(1-2):271-284.
 41. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today*. 2006;11(17-18):812-818.
 42. Sato H, Sugiyama K, Hoshi M, Urushiyama M, Ishizuka K. Angiotensin II (AII) induced hypertension chemotherapy (IHC) for unresectable gastric cancer: With reference to resection after down staging. *World J Surg*. 1995;19(6):836-842.
 43. Li CJ, Miyamoto Y, Kojima Y, Maeda H. Augmentation of tumour delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure. *Br J Cancer*. 1993;67(5):975-80.
 44. Nagamitsu A, Greish K, Maeda H. Elevating blood pressure as a strategy to increase tumor-targeted delivery of macromolecular drug SMANCS: Cases of advanced solid tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 2009;39(11):756-766.
 45. Van Den Hoven AF, Smits MLJ, Rosenbaum CENM, Verkooijen HM, Van Den Bosch MAAJ, Lam MGEH. The effect of intra-arterial angiotensin II on the hepatic tumor to non-tumor blood flow ratio for radioembolization: A systematic review. *PLoS One*. 2014;9(1).
 46. Strandvik GF. Hypertonic saline in critical care: a review of the literature and guidelines for use in hypotensive states and raised intracranial pressure. *Anaesthesia*. 2009;64(9):990-1003.
 47. Oliveira RP, Velasco I, Soriano FG, Friedman G. Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit Care*. 2002;6(5):418-423.
 48. Ciesla DJ, Moore EE, Zallen G, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything. *J Trauma*. 2000;48(3):388-95.
 49. Junger WG, Rhind SG, Rizoli SB, et al. Resuscitation of traumatic hemorrhagic shock patients with hypertonic saline-without dextran-inhibits neutrophil and endothelial cell activation. *Shock*. 2012;38(4):341-50.
 50. Vincenzi R, Cepeda LA, Pirani WM, Sannomyia P, Rocha-e-Silva M, Cruz RJ. Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *Am J Surg*. 2009;198(3):407-414.
 51. Victorino GP, Newton CR, Curran B. Effect of hypertonic saline on microvascular permeability in the activated endothelium. In: *Journal of Surgical Research*. Vol 112. ; 2003:79-83.
 52. Jain RK. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev*. 1990;9(3):253-266.
 53. Jordan BF, Sonveaux P. Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy. *Front Pharmacol*. 2012;3 MAY(May):1-15.
 54. Thurber GM, Weissleder R. A systems approach for tumor pharmacokinetics. *PLoS One*. 2011;6(9).
 55. Patel KJ, Trédan O, Tannock IF. Distribution of the anticancer drugs

- doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(1):127-138.
56. Lankelma J, Dekker H, Luque RF, et al. Doxorubicin gradients in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1999;5(7):1703-1707.
 57. James NS, Chen Y, Joshi P, et al. Evaluation of polymethine dyes as potential probes for near infrared fluorescence imaging of tumors: Part - 1. *Theranostics*. 2013;3(9):692-702.
 58. Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials*. 2011;32(29):7127-7138.
 59. Constantinides C, Mean R, Janssen BJ. Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. *ILAR J*. 2011;52(2):22-32.
 60. Tang M-X, Mulvana H, Gauthier T, et al. Quantitative contrast-enhanced ultrasound imaging: a review of sources of variability. *Interface Focus*. 2011;1(4):520-39.
 61. Hyvelin J-M, Tardy I, Arbogast C, et al. Use of Ultrasound Contrast Agent Microbubbles in. *Invest Radiol*. 2013;48(8):571-583.
 62. Claudon M, Dietrich CF, Choi BI, et al. Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS) in the liver - Update 2012. *Ultraschall der Medizin*. 2013;34(1):11-29.
 63. Seshadri M, Sacadura NT, Coulthard T. Monitoring antivasular therapy in head and neck cancer xenografts using contrast-enhanced MR and US imaging. *Angiogenesis*. 2011;14(4):491-501.
 64. Oliver TG, Mercer KL, Sayles LC, et al. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev*. 2010;24(8):837-852.
 65. Violet M, Delattre L, Tardivel M, et al. A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(March):84.
 66. Lai XY, Egan LJ. Suppression of radiation-induced DNA double-strand break repair by MyD88 is accompanied by apoptosis and crypt loss in mouse colon. *Oncogenesis*. 2013;2(8):e62.
 67. Olive PL, Banàth JP. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2009;76(2):79-90.
 68. Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry A*. 2004;58(2):99-110.
 69. Park H-R, Ju E-J, Jo S-K, Jung U, Kim S-H, Yee S-T. Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with HemoHIM in tumor-bearing mice. *BMC Cancer*. 2009;9:85.
 70. Yang X, Shi C, Tong R, et al. Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging. *Clin Cancer Res*. 2010;16(10):2833-2844.
 71. Vaux DL. Know when your numbers are significant. *Nature*. 2012;492:180-181.
 72. Ramires JA, Serrano Junior C V, Cesar LA, Velasco IT, Rocha e Silva Junior M, Pileggi F. Acute hemodynamic effects of hypertonic (7.5%) saline infusion in patients with cardiogenic shock due to right ventricular infarction. *Circ Shock*. 1992;37(3):220-225.
 73. Järvelä K, Koskinen M, Kööbi T. Effects of hypertonic saline (7.5%) on extracellular fluid volumes in healthy volunteers. *Anaesthesia*. 2003;58(9):878-

- 881.
74. Kien ND, Kramer GC, White D a. Acute hypotension caused by rapid hypertonic saline infusion in anesthetized dogs. *Anesth Analg.* 1991;73(5):597-602.
75. Boldt J, Zickmann B, Ballesteros M, Herold C, Dapper F, Hempelmann G. Cardiorespiratory responses to hypertonic saline solution in cardiac operations. *Ann Thorac Surg.* 1991;51(4):610.
76. Goertz DE, Yu JL, Kerbel RS, Burns PN, Foster FS. High frequency Doppler ultrasound monitors the effects of antivasular therapy on blood flow. *Cancer Res.* 2002;62:6371-6375.
77. Valente P, Fassina G, Melchiori A, et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer.* 1998;75(2):246-253.
78. Zhuang D, Mannava S, Grachtchouk V, Tang W-H. C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene.* 2008;27(52).
79. Wolter K, Verhaegen M, Fernandez Y, Nikolovska-Coleska Z. Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ.* 2007;14:1605-1616.
80. Moen I, Jevne C, Wang J, et al. Gene expression in tumor cells and stroma in dsRed 4T1 tumors in eGFP-expressing mice with and without enhanced oxygenation. *BMC Cancer.* 2012;12(21).
81. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer.* 2008;8(228).
82. Needles A, Arditi M, Rognin NG, et al. Nonlinear contrast imaging with an array-based micro-ultrasound system. *Ultrasound Med Biol.* 2010;36(12):2097-2106.
83. Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL. *The Mouse in Biomedical Research. Normative Biology, Husbandry, and Models.* Vol Chapter 13.; 2007.
84. Janusonis S. Comparing two small samples with an unstable, treatment-independent baseline. *J Neurosci Methods.* 2009;179(2):173-8.
85. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel).* 2010;2(11):2490-2518.
86. Rahman A, Carmichael D, Harris M, Roh JK. Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Res.* 1986;46(5):2295-2299.
87. Bao L, Haque A, Jackson K, et al. Increased expression of p-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model. *Am J Pathol.* 2011;178(2):838-852.
88. Zhuang X, Zhang W, Chen Y, et al. Doxorubicin-enriched, ALDH(br) mouse breast cancer stem cells are treatable to oncolytic herpes simplex virus type 1. *BMC Cancer.* 2012;12(1):549.
89. Bandyopadhyay A, Wang L, Agyin J, et al. Doxorubicin in combination with a small TGF inhibitor: A potential novel therapy for metastatic breast cancer in mouse models. *PLoS One.* 2010;5(4).
90. Stylianopoulos T, Jain RK. Combining two strategies to improve perfusion and drug delivery in solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(46):18632-7.
91. Secomb TW. Theoretical models for regulation of blood flow. *Microcirculation.* 2008;15(8):765-75.

92. Klabunde RE. Cardiovascular Physiology Concepts. *Lippincott Williams & Wilkins*. 2004;Chapter 5:92-94.
93. Gillies RJ, Schornack PA, Secomb TW, Raghunand N. Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia (New York, NY)*. 1999;1(3):197-207.
94. Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT, Dvorak AM. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol*. 1988;133(1):95-109.
95. Johnsson A, Olsson C, Nygren O, Nilsson M, Seiving B, Cavallin-Stahl E. Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;37(1-2):23-31.
96. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378.
97. Ozols RF, Corden BJ, Jacob J, Wesley MN, Ostchega Y, Young RC. High-dose cisplatin in hypertonic saline. *Ann Intern Med*. 1984;100(1):19-24.
98. Ozols RF, Young RC. High-dose cisplatin therapy in ovarian cancer. *Semin Oncol*. 1985;12(4 Suppl 6):21-30.
99. Saltz L, Kelsen D. A phase I trial of cisplatin in hypertonic saline and escalating doses of 5-fluorouracil by continuous intravenous infusion in patients with advanced malignancies. *Cancer*. 1990;66(8):1688-1691.
100. Suzuki M, Hori K, Abe I, Saito S, Sato H. A new approach to cancer chemotherapy: selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. *J Natl Cancer Inst*. 1981;67(3):663-9.
101. Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K, et al. Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(4):688-694.
102. Jordan BF, Misson PD, Demeure R, Baudelet C, Beghein N, Gallez B. Changes in tumor oxygenation/perfusion induced by the no donor, isosorbide dinitrate, in comparison with carbogen: Monitoring by EPR and MRI. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48(2):565-570.
103. Mgbeokwere U, Egwuom O. Hot Hypertonic Saline and Compression Device: A Novel Approach in Preventing Severe Hemorrhage during Extirpation of Deep Vascular Malformations of the Face. *Ann Med Health Sci Res*. 2012;2(1):1-4.