



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

LAYANNY KELLY SILVEIRA PRAXEDES

**DESENVOLVIMENTO DE TERAPIA ALTERNATIVA USANDO
ADJUVANTES NANOESTRUTURADOS NO TRATAMENTO
DO TUMOR EXPERIMENTAL.**

**Goiânia
2016**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

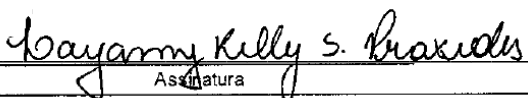
Nome completo do autor: LAYANNY KELLY SILVEIRA PRAXEDES

Título do trabalho: DESENVOLVIMENTO DE TERAPIA ALTERNATIVA USANDO ADJUVANTES NANOESTRUTURADOS NO TRATAMENTO DO TUMOR EXPERIMENTAL.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura

Data: 23/08/16

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

LAYANNY KELLY SILVEIRA PRAXEDES

**DESENVOLVIMENTO DE TERAPIA ALTERNATIVA USANDO
ADJUVANTES NANOESTRUTURADOS NO TRATAMENTO
DO TUMOR EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia da
Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título de
Mestre

Orientador: André Corrêa Amaral
Co-orientador: Lucimeire Antonelli da
Silveira

**Goiânia
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silveira Praxedes, Layanny Kelly
Desenvolvimento de terapia alternativa usando adjuvantes nanoestruturados para o tratamento do tumor experimental. [manuscrito] / Layanny Kelly Silveira Praxedes. - 2016. x, 65 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. André Corrêa Amaral; co-orientadora Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito Hospedeiro, Cidade de Goiás, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Tumor. 2. Imunoterapia. 3. Nanotecnologia. 4. PLGA. I. Corrêa Amaral, André, orient. II. Título.

CDU 612.017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
 INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO
 Rua 235, s/n – Setor Universitário – Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
 Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 – e-mail : ppghrph@gmail.com



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LAYANNY KELLY SILVEIRA PRAXEDES - Aos oito dias do mês de abril do ano de 2016 (08/04/2016), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. LUCIMEIRE ANTONELLI DA SILVEIRA, SIMONE GONÇALVES DA FONSECA e JULIANA REIS MACHADO E SILVA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “DESENVOLVIMENTO DE TERAPIA ALTERNATIVO USANDO ADJUVANTES NANOESTRUTURADOS NO TRATAMENTO DO TUMOR EXPERIMENTAL”, em nível de MESTRADO, de autoria de LAYANNY KELLY SILVEIRA PRAXEDES, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Coorientadora, Profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1271/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Aprovada / Reprovada

Profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira

Aprovada

Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

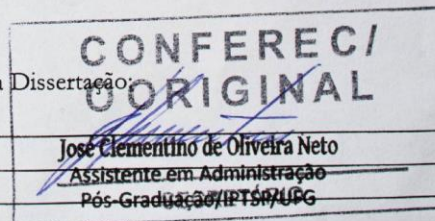
Aprovada

Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva

Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:



Profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva (IPTSP/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Lucimeire Antonelli da Silveira
Simone Gonçalves da Fonseca
Juliana Reis Machado e Silva
Kariny V. Soares

SUMÁRIO

FIGURAS, QUADROS E TABELAS.....	iv
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Tumor.....	1
1.1.1 Microambiente tumoral.....	3
1.2 Adjuvantes.....	9
1.2.1 Hidróxido de alumínio.....	10
1.3 Nanopartículas.....	13
1.3.1 Nanopartículas de ácido Poli(lático- <i>co</i> -glicólico).....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MÉTODOS.....	20
5 RESULTADOS.....	27
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXOS.....	62
Anexo 1 Tabela com a dosagem de citocinas para cada animal.....	62
Anexo 2 Parecer do Comitê de Ética.....	65

FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1.	Estimativa da incidência de câncer no mundo em 2012.....	2
Figura 2.	Microambiente tumoral.....	4
Figura 3.	Ativação de macrófagos.....	7
Figura 4.	Atuação do hidróxido de alumínio na literatura.....	10
Figura 5.	Ativação do inflamassoma.....	12
Figura 6.	Adjuvantes utilizados nos experimentos.....	20
Figura 7.	Esquema de tratamento.....	25
Figura 8.	Teste <i>in vitro</i> com diferentes concentrações dos compostos.....	28
Figura 9.	Número de camundongos durante o tratamento.....	29
Figura 10.	Comparação do efeito do tratamento.....	30
Figura 11.	Peso dos tumores dissecados após os tratamentos.....	31
Figura 12.	Quantificação das citocinas no soro dos camundongos por ELISA.....	33
Figura 13.	Quantificação de IFN-gamma no soro dos camundongos após os tratamentos.....	34
Figura 14.	Quantificação de IL-10 no soro dos camundongos após os tratamentos.....	35
Figura 15.	Quantificação de IL-4 no soro dos camundongos após os tratamentos.....	35
Figura 16.	Área em necrose.....	36
Figura 17.	Infiltrado inflamatório.....	37
Figura 18.	Células tumorais predominantes após os tratamentos.....	38
Figura 19.	Células em mitoses.....	39
Figura 20.	Neovascularização.....	40

Quadro 1.	Identificação dos grupos.....	25
Tabela 1.	Caracterização das nanopartículas.....	28
Tabela 2	Avaliação histopatológica.....	41

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
ASC	Proteína adaptadora (<i>Apoptosis-Associated Speck-like Protein</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CCL22	Quimiocina CCL22
CCL3	Quimiocina CCL3
CCL4	Quimiocina CCL4
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CTL	Linfócito T Citotóxico (<i>Cytotoxic T Cell</i>)
CXCL8	Quimiocina CXCL8
DC	Célula Dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
ELISA	Imunoensaio Enzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPR	Aumento da Permeabilidade e Retenção (<i>Enhanced Permeability and Retention</i>)
FDA	Agência de Administração de Alimentos e Drogas (<i>Food and drug administration</i>)
HE	Hematoxilina-Eosina
HM	Tratamento com hidróxido de alumínio manipulado
HS	Tratamento com hidróxido de alumínio sigma
i.p	Intraperitoneal
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (<i>Internation Agency for Research on Cancer</i>)
IFN- γ	Interferon-gamma
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G de classe 1
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12R	Receptor para Interleucina 12

IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-21	Interleucina 21
IL-33	Interleucina 33
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
INCA	Intituto Nacional do Câncer
IPTSP/UFG	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócitos T
M1	Macrófagos ativados pela via clássica
M2	Macrófagos ativados pela via alternativa
MDSC	Células Supressoras de Derivados Mielóides (<i>Myeloid-derived Suppressor Cells</i>)
MHCI	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe 1 (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MHCII	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe 2 (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
Mo	Tratamento com macrófago
Mo PLGA	Tratamento com macrófagos mais partículas de PLGA vazia
Mo PLGA HM	Tratamento com macrófagos mais partículas de PLGA com Hidróxido de alumínio manipulado
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B (<i>Nuclear Factor kappa B</i>)
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Receptores Semelhantes a Nod (<i>Nod-Like Receptor</i>)
NLRP3	Proteína 3 do Receptor Semelhante a Nod (<i>Nod-Like Receptor Protein 3</i>)
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NPs	Nanopartículas

PDI	Índice de Poldispersão (<i>Polydispersity index</i>)
PGE2	Prostaglandina 2
PLGA	Ácido Polilático co-glicólico (<i>Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)</i>)
PLGA HS	Tratamento com PLGA com hidróxido sigma
PLGA HM	Tratamento com PLGA com hidróxido manipulado
PVA	Álcool Polivinílico
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI	Meio de cultura (<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
S180	Sarcoma 180
SFB	Soro Fetal Bovino
TAMs	Macrófagos associado a Tumores (<i>Tumor Associated Macrophages</i>)
T _H 1	Linfócito T auxiliar tipo 1 (<i>type 1 helper cells</i>)
T _H 2	Linfócito T auxiliar tipo 2 (<i>type 2 helper cells</i>)
TLR	Receptores Semelhantes a Toll (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
Treg	Linfócito T regulador (<i>Regulatory T Cells</i>)
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

RESUMO

A capacidade do tumor de não se apresentar como imunogênico ao sistema imune constitui um dos seus mecanismos de escape. Vários estudos tem direcionado seus esforços em pesquisas que tem como alvo aumentar a imunogenicidade dos antígenos tumorais. Uma das estratégias de uso corrente, tanto experimental como clínica, é a introdução no micro ambiente tumoral de substâncias denominadas adjuvantes para potencializar a ação do sistema imune. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o uso de nanopartículas formadas a partir de co-polímeros de ácido láctico-*co*-glicólico (PLGA), associada ao hidróxido de alumínio poderia potencializar o efeito destes na resolução do tumor. Camundongos Balb/c inoculados com células tumorais de Sarcoma 180 e distribuídos em nove grupos para a realização dos diferentes tratamentos imunoterápicos, envolvendo a utilização de hidróxido de alumínio, nanopartículas de PLGA e macrófagos ativados. A avaliação dos tratamentos foi realizada pela análise do tumor, considerando a redução do peso do tumor dissecado, análise morfológica e histopatológica e análise de citocinas pró-inflamatórias e imunossupressoras no soro dos camundongos. O grupo de camundongos tratados com nanopartículas de PLGA associadas ao hidróxido de alumínio promoveu uma regressão significativa do tamanho da massa tumoral ($p = 0,039$) comparado com camundongos não tratados. O tratamento envolvendo macrófagos e nanopartículas de PLGA apresentou uma regressão tumoral significativa comparada com o grupo tratado apenas com macrófagos ($p = 0,021$). Os grupos que tiveram regressão tumoral significativa apresentaram níveis elevados das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10, diferenciando-se do perfil encontrado nos demais grupos. Nos outros tratamentos testados houve a redução da massa tumoral, porém sem resultados estatísticos significativos e sem grandes alterações nos níveis de citocinas dosados no soro dos animais. Logo, acredita-se que a nanopartícula de PLGA, por meio de sua capacidade de transporte e liberação do hidróxido nas células alvo de forma controlada, possa potencializar a ação do adjuvante hidróxido de alumínio. Outros estudos são necessários para a elucidação dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno.

PALAVRAS-CHAVE: Tumor, Imunoterapia, Nanotecnologia, PLGA, Hidróxido de alumínio.

ABSTRACT

The capacity of the tumor has not present as immunogenic to the immune system is one of its escape mechanisms. Several studies have direct their efforts in research that aims to increase the immunogenicity of tumor antigens. One strategy, both experimental and clinical, is the introduction in the tumor microenvironment of substances called adjuvants to enhance the action of the immune system. The aim of this study was to evaluate the use of nanoparticles formed from poly Lactic-*co*-glycolic acid (PLGA) associated with aluminum hydroxide may potentiate the effect of these on the resolution of the tumor. Balb/c mice inoculated with Sarcoma 180 tumor cells were distributed into nine groups for the implementation of the various immunotherapeutic treatments involving the use of aluminum hydroxide, PLGA nanoparticles, and activated macrophages. The evaluation of the treatment was performed by analysis of the tumor, considering the weight reduction of the dissected tumor, morphological and histological analysis, and analysis of pro-inflammatory and immunosuppressive cytokines in the serum of mice. The group of mice treated with PLGA nanoparticle associated with aluminum hydroxide caused a significant regression of the tumor ($p = 0.039$) compared with untreated mice. The treatment involving macrophages and PLGA nanoparticles showed significant tumor regression compared to the group treated only with macrophages ($p = 0.021$). The groups that had significant tumor regression have high levels of IFN- γ cytokines IL-4 and IL-10, differing from the profile found in the other groups. In the other treatments tested there was a reduction of the tumor mass, but without significant statistical results, and without changes in the levels of cytokines measured in the serum of animals. Therefore, it is believed that PLGA nanoparticle by their ability to release hydroxide in target cells controlled manner, can enhance the action of the adjuvant aluminum hydroxide. Further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in this phenomenon, which support the other investigations.

KEYWORDS: Tumor, Immunotherapy, Nanotechnology, PLGA, Aluminum hydroxide

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Tumor

Neoplasia é uma massa anormal de células as quais perdem o controle da multiplicação celular, proliferando em ritmo acelerado quando comparado ao normal, de forma autônoma, reduzindo ou perdendo as características de diferenciação. Aspectos clínicos, evolutivos e comportamentais permitem a distinção das neoplasias em duas classes, tumores benignos, menos agressivos, geralmente não causam sérios transtornos ao portador, e tumores malignos, também chamados de câncer, possuem crescimento rápido e muitos provocam perturbações homeostáticas que podem levar o paciente ao óbito. Contudo, não deve haver a banalização de tumores benignos, pois eles são considerados lesões pré-cancerosas, uma vez que podem transformar-se em neoplasias malignas (Kelderman & Kvistborg 2016).

O câncer é um problema social que necessita da atenção de todos. É a doença que mais cresce em todo o mundo e uma das maiores causas de morte. É uma doença crônica, geralmente com diagnóstico tardio e tratamento de alto custo. O tratamento é muito agressivo e invasivo, gera vários efeitos colaterais com grandes repercussões econômicas e sociais (Ferlay et al. 2014).

O projeto Globocan da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), uma extensão da Organização Mundial de Saúde, apresenta as estimativas da incidência, mortalidade e prevalência de 28 tipos de câncer em todo o mundo no ano de 2012. A Figura 1 ilustra a estimativa da incidência de câncer no mundo neste período, onde é possível identificar os países que possuem os maiores casos da doença. O número de pessoas com câncer no mundo somou mais de 14 milhões em 2012. Esses dados revelam um aumento acentuado em relação ao ano de 2008, quando foram registrados 12,7 milhões de casos. Além disso, nesse período, o número de mortes cresceu de 7,6 milhões para 8,2 milhões. Se medidas efetivas não forem tomadas, os casos de câncer devem crescer cerca de 50% no mundo até 2030, com 26 milhões de casos novos e 17 milhões

de mortes por ano, sendo que 2/3 das vítimas viverá nos países em desenvolvimento (Bray et al. 2013; Ferlay et al. 2013; Ferlay et al. 2014).

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes (INCA) estima 580 mil casos novos de câncer no Brasil para o ano de 2015. A maioria das mortes por câncer que ocorre hoje, se dá nos países de baixa e média renda, tendo em vista que as dificuldades de acesso da maioria da população à informação e ao tratamento fazem toda a diferença. Diante da relevância do câncer tanto na esfera internacional quanto na nacional, o tema conquista espaço nas esferas políticas e científicas do mundo inteiro (INCA, 2014).

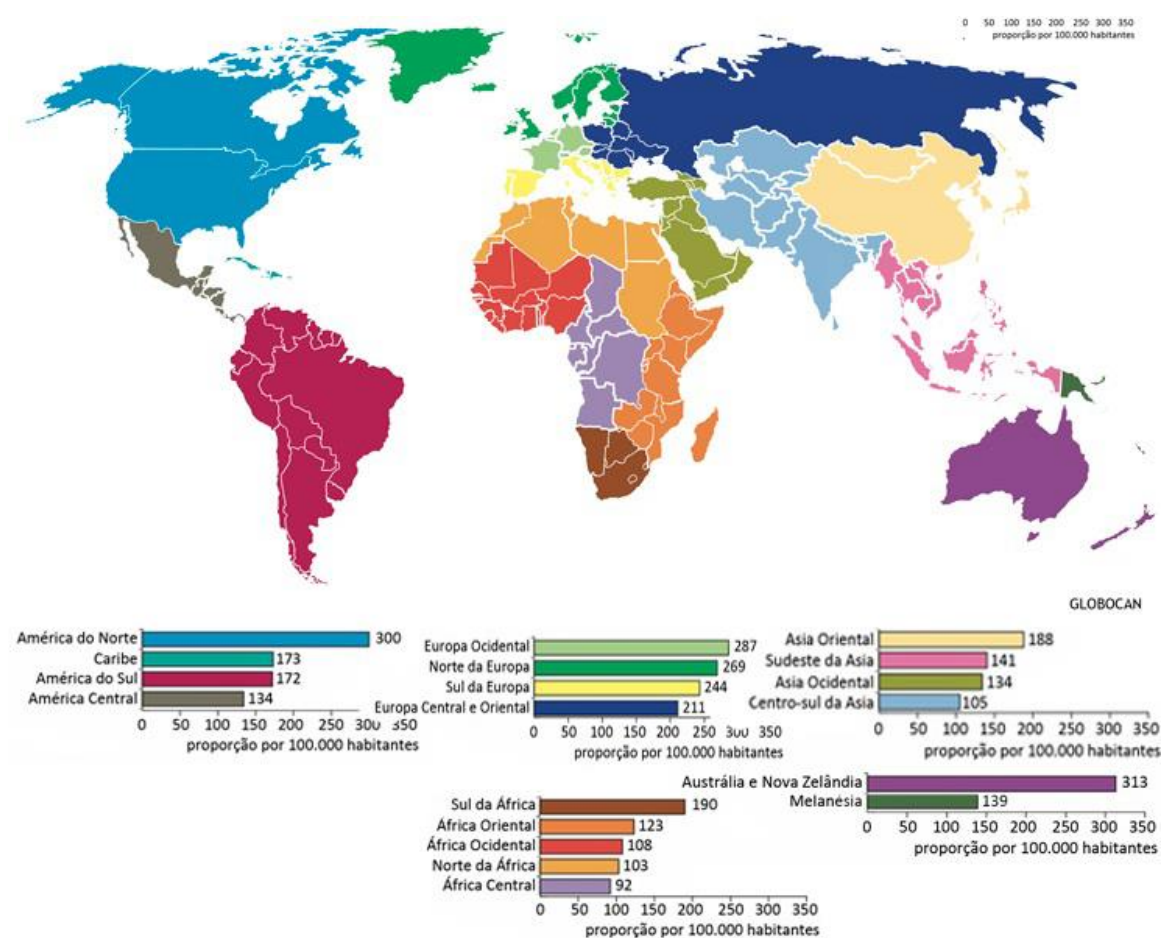


Figura 1: Estimativa da incidência de câncer no mundo em 2012. Fonte: IARC, 2015 (Adaptado)

O tratamento primário do câncer inclui cirurgias, quimioterapia e radioterapia, utilizando agentes químicos e físicos, isolados ou em combinação. Porém os efeitos decorrentes das drogas existentes não são bons e possuem efeitos colaterais ou tóxicos indesejáveis, diante disso busca-se constantemente o desenvolvimento de novos sistemas

terapêuticos menos agressivos, diminuindo as reações adversas típicas dos tratamentos convencionais (Schijns et al. 2014).

A principal razão para o interesse de terapias com uma abordagem imunológica é na redução da morbidade e mortalidade dos pacientes que são submetidos a terapias convencionais. Várias pesquisas têm como alvo a manipulação do microambiente tumoral, aumentando a imunogenicidade dos antígenos tumorais usando diferentes metodologias. Essas são abordagens interessantes para aprimorar as respostas imunitárias contra os tumores e reduzindo os danos para os tecidos saudáveis (Driessens et al. 2004; Gottfried et al. 2008).

Para se investigar novas metodologias de tratamento, são utilizados animais como modelo. Uma das linhagens celulares mais utilizadas nas pesquisas envolvendo tumor experimental *in vivo*, são as células de Sarcoma 180 (Lee et al. 2003), identificado em 1914 em camundongos e denominado inicialmente como Tumor de Crocker. Foi um dos primeiros tumores experimentais a serem transplantados por inoculação subcutânea em animais. Quando é inoculado pela via intramuscular dá origem a tumor sólido e quando inoculado no peritônio origina um tumor ascítico, crescendo rapidamente em 90% dos animais inoculados, mas regride em 8-10% dos casos (Assef et al. 2002). Após sucessivos implantes subcutâneos o padrão histológico torna-se misto, apresentando aspecto tanto de epitelial como de mesenquimal, o qual são originados respectivamente de tecido epitelial e tecido conjuntivo (Qi & Xu, 2006),

O Sarcoma 180 invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos, apresentam uma massa sólida de células altamente pleomórficas, arranjadas em ninhos ou cordões que são circundados por estroma conjuntivo vascularizado, com frequente necrose central. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástases (Facchini 2011).

1.1.1 Microambiente Tumoral

Os tumores são originados a partir da proliferação e disseminação descontrolada de clones de células transformadas. O sucesso na progressão do tumor é dependente além de uma alta taxa de proliferação, da habilidade das células neoplásicas de invadir tecidos e de sua capacidade de superar os mecanismos imunes. A função do sistema imune é reconhecer e destruir os clones de células transformadas, mas tumores

malignos possuem diversos mecanismos que permitem a resistência e o escape das respostas imunológicas do hospedeiro (Kerkar & Restifo 2012).

Além da grande quantidade de células neoplásicas em constante replicação, os tumores possuem um microambiente próprio, com características distintas de outras partes do organismo. O microambiente tumoral (Figura 2) é composto por células tumorais, células do estroma e um infiltrado de leucócitos [linfócitos, células *natural killer* (NK), macrófagos, células dendríticas (DCs), eosinófilos, mastócitos e células supressoras de derivados mielóides (MDSC)] que promovem o crescimento do tumor e mantêm sua atividade imunossupressora, por meio da liberação de citocinas e enzimas específicas e da expressão de ligantes inibidores que atuam no contato célula-célula (Van Kempen et al. 2003; Yu et al. 2006; Hanahan et al. 2011). Este microambiente se forma como consequência do desenvolvimento do tumor. As células tumorais e do microambiente tumoral co-evoluem dinamicamente através das interações celulares diretas e indiretas, provocando efeitos em muitos programas biológicos, como na imunidade inata e adaptativa, na proliferação celular, crescimento e metabolismo, bem como angiogênese e hipóxia (Kenny et al. 2007; Kerkar & Restifo 2012; Casey et al. 2014).

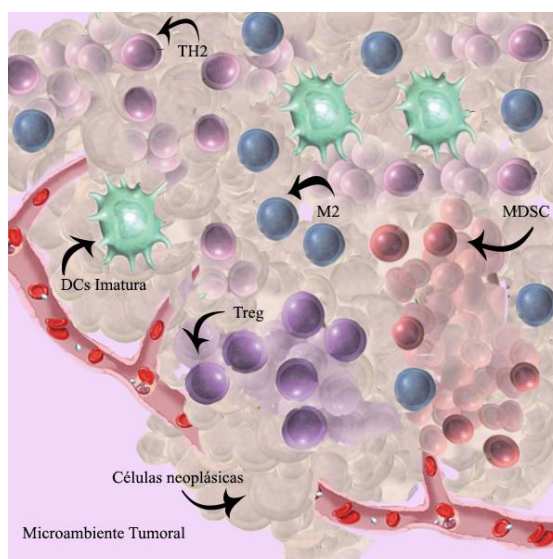


Figura 2: Microambiente Tumoral. O microambiente tumoral é formado por um complexo de células e mediadores que providenciam suportes metabólicos imunossupressores durante a transição das células para a malignidade. Composto por células tumorais, células do estroma e um infiltrado de células do sistema imune, como células supressoras de derivados mielóides, macrófagos, linfócitos T reguladores e do perfil Th2, juntamente com células dendríticas imaturas, que em conjunto vão liberar mediadores capazes de criar um microambiente característico

As DCs são frequentemente descritas como células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) por conta de sua capacidade de ativar robustamente células T CD4⁺ em linfócitos T auxiliares (T *helper*) e células T CD8⁺ em linfócitos T citotóxicos (CTL). No entanto, no microambiente tumoral, as DCs em contato com as células tumorais, desenvolvem deficiências funcionais, como uma baixa expressão de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, deficiências na expressão de genes associados ao processamento de antígenos. Além disso deixam de possuir co-estimuladores, ou seja, permanecem em um estado imaturo, limitando a capacidade destas células para ativar células da imunidade adaptativa de forma eficiente (Fricke & Gabilovich 2006; Kerkar & Restifo 2012).

O efeito tolerogênico das DCs pode ser mediado, mantido e difundido através da geração de células T reguladoras (Treg) (Hackstein et al. 2001, Roncarolo et al. 2001). Células Treg podem suprimir respostas das células T aos tumores, particularmente impedindo a atividade de CTL. Treg são principalmente caracterizadas por uma baixa capacidade proliferativa, ausência de produção de IL-2 e secreção de IL-10 (Jonuleit et al. 2000). A depleção de células Treg em camundongos afetados por tumores aumentam a imunidade e reduzem o crescimento tumoral (Bancheriau et al. 2000; Fehérvári & Sakaguchi 2004; Baj-Krzyworzeka et al. 2007).

O principal mecanismo da imunidade tumoral é a destruição das células neoplásicas pelos CTLs. Os linfócitos T CD8⁺ para que possam ser ativados em CTL e exercerem a função de vigilância no organismo, exigem a apresentação cruzada dos antígenos no contexto do MHC I de APC profissionais juntamente com co-estimuladores. Diversos tumores apresentam síntese diminuída de moléculas de MHC I, β 2-microglobulina e/ou outros componentes da maquinaria de processamento de antígenos. Logo, tanto DCs imaturas, Tregs e a baixa expressão de MHCI pelas células neoplásicas, são consideradas adaptações dos tumores em resposta às pressões seletivas da imunidade do hospedeiro (Fehérvári & Sakaguchi 2004).

As células NK também estão presentes no microambiente tumoral, são capazes de eliminar células que não possuem MHC I, pois estes geram sinais inibitórios para NK. Para aumentar a capacidade citolítica de NK é necessário ligantes ativadores, presentes nas células alvo e citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-2 e IL-12 no meio. NK são capazes de destruir células neoplásicas que evadem da vigilância imunológica pelos

CTLs por não possuírem MHC I. Porém, o microambiente tumoral possui citocinas imunossupressoras, as quais impedem o aumento da capacidade citolítica das NK. Uma solução para este problema é a ativação do sistema imune por mediadores externos para a destruição de células tumorais (Casey et al. 2015).

Apesar das células tumorais serem derivadas de células do hospedeiro, os tumores expressam antígenos que são reconhecidos como estranhos pelo sistema imune. A pressão seletiva da resposta imune nas células tumorais que expressam antígenos, resulta na sobrevivência e propagação de células tumorais variantes com imunogenicidade reduzida, esse mecanismo é conhecido como edição do tumor. Mediadores tumorais como fator de crescimento transformante beta (TGF- β) também contribuem para a imunossupressão de respostas imunológicas, inibindo a proliferação e as funções efetoras dos linfócitos e macrófagos. Logo, de uma forma geral os tumores não se apresentam como imunogênicos ao organismo (Sinhá et al. 2005). Dentre as células da imunidade inata e adaptativa recrutadas para o sítio tumoral, macrófagos são abundantes e estão presentes em todos os estágios da progressão do tumor (Mantovani & Albavena 2012; Gajewski et al. 2013).

Macrófagos são células versáteis que podem realizar diferentes funções, tem um papel principal na inflamação, resposta imune e manutenção da homeostase do tecido (Mosser & Edwards 2008; Lucas et al. 2010; Novak & Koh 2013). Dependendo de diferentes condições no microambiente há uma notável polarização para dois fenótipos distintos: são chamados M1 os macrófagos que são ativados pela via clássica e M2 aqueles que são ativados pela via alternativa (Silzle et al. 2003; Pollard 2004; Balkwill 2005; Sindrilaru et al. 2011). As funções pró-inflamatória e anti-inflamatória respectivamente de macrófagos M1 e M2 têm sido intensamente estudadas, porém os determinantes da sua diferenciação não são totalmente compreendidos (Mills 2012; Novak & Koh 2013).

Macrófagos polarizados integralmente para M1 e M2 são os extremos de um *continuum* de estados funcionais, eles se diferenciam entre si quanto a expressão de receptores, funções efetoras e produção de citocinas e quimiocinas (Mills et al. 2000). Macrófagos M1 são estimulados por citocinas T_H1 como IFN- γ ou lipopolissacarídeo, por outro lado macrófagos M2 são ativados por citocinas T_H2, como IL-4 ou IL-13 (Mantovani et al. 2002; Gordon 2006; Gordon & Taylor 2005; Mosser & Edwards 2008).

Em adição, macrófagos M1 promovem inflamação por produzirem grande quantidade de NO e citocinas pró-inflamatórias (Mantovani et al. 2005; Dale et al. 2008), macrófagos M2 inibem a inflamação por produzirem IL-10 e arginase I (Mantovani et al. 2007; Hunter et al. 2010). Na figura 3 está esquematizado o perfil de ativação de M1 e M2

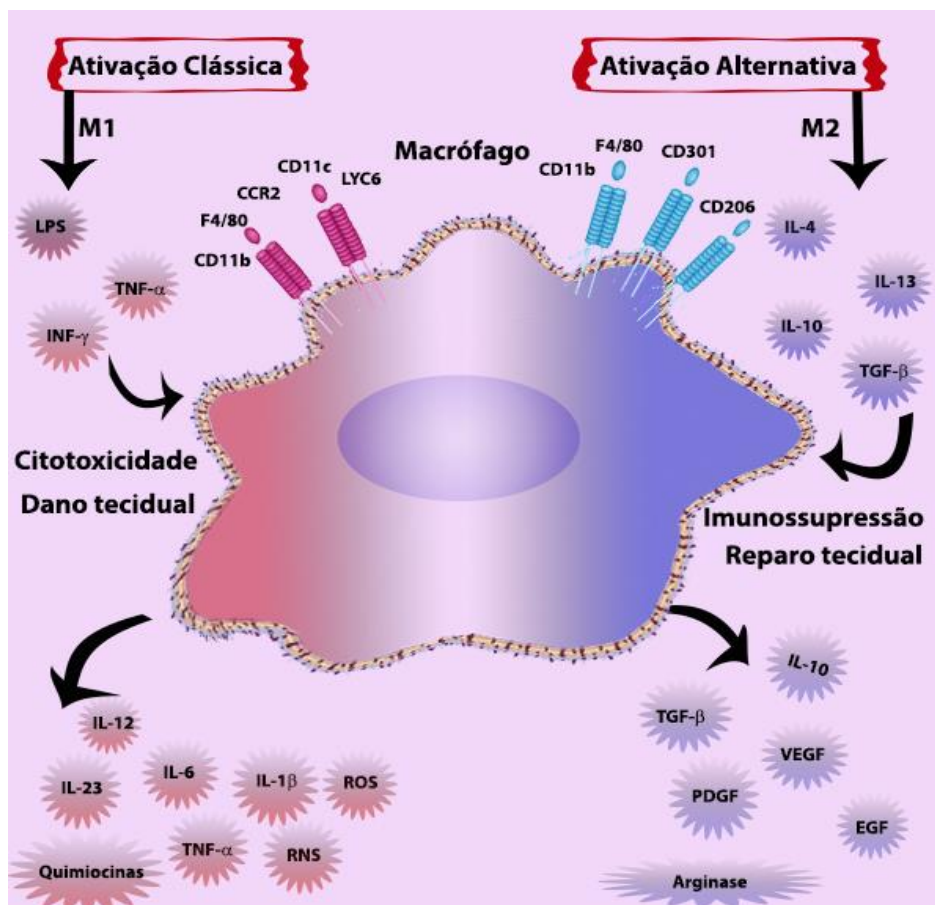


Figura 3: Ativação de Macrófagos. A figura ilustra as principais citocinas e receptores para ativação de macrófago e a resposta dos mesmos após a diferenciação. Do lado esquerdo: ativação pela via clássica (M1); do lado direito: ativação pela via alternativa M2.

As origens de macrófagos em muitos tipos de câncer particularmente em estágios iniciais ainda são incertas (Noy & Pollard 2014). Os macrófagos associados ao tumor (TAMs), promovem o aumento da migração celular para invadirem o tumor, estimulam a angiogênese aumentando a sobrevivência e crescimento persistente (Qian & Pollard 2010). Essas células funcionalmente polarizadas para o fenótipo M2, juntamente com outras células do microambiente tumoral como DCs imaturas e Treg, tem um papel fundamental na desordem da imunidade adaptativa pela disfunção de linfócitos e circuitos inflamatórios, promovendo a progressão e o crescimento tumoral (Mantovani et al. 2002).

Macrófagos M2 são imunoreguladores e supressores da resposta imune para antígenos derivados do tumor, previnem o ataque nas células tumorais por células NK e células T durante a progressão e depois da recuperação pela imunoterapia e quimioterapia. Nos locais metastáticos, macrófagos preparam o tecido alvo para a chegada de células tumorais, e em seguida, uma subpopulação de macrófagos diferente promove a dispersão de células neoplásicas, a sobrevivência, e subsequente crescimento tumoral (Lin et al. 2006; Quian & Pollard 2010).

A investigação de macrófagos tem sido atrativa para que eles possam ser incluídos em terapia combinada no tratamento do câncer. Subpopulações especializadas de macrófagos podem representar novos alvos terapêuticos. A ablação ou diferenciação de macrófagos dentro do microambiente tumoral irá tornar-se um importante mecanismo de ação para funções anti-tumorais (Noy & Pollard 2014). No entanto, embora estas formas extremas de polarização sejam sedutoras, provavelmente não existem estímulos para reverter uma ativação alternativa no microambiente tumoral (Sica & Mantovani 2012; De Palma & Lewis 2013). Intervenções terapêuticas com estímulos externos, são investigadas para a polarização diferencial de TAMs, na tentativa de modulação de macrófagos para que eles possam agir eliminando diretamente células tumorais, removendo o suporte vital como a inibição da angiogênese e na ativação do sistema imune (Qian & Pollard 2010; Coussens et al. 2013; Pyonteck et al. 2013; Su et al. 2014.).

A manipulação do microambiente tumoral pode ser abordada em alvo de novas terapias para o tratamento do câncer. Várias estratégias visando a potencialização da imunidade do hospedeiro compreende a administração *in situ* ou sistêmica de citocinas e co-estimuladores, gerando uma resposta inflamatória inespecífica que por si só pode ter uma atividade antitumoral, ativação de linfócitos e transferência de células T e anticorpos específicos para tumores. A modulação e/ou inibição de alvos podem incluir a síntese e o metabolismo de colesterol, espécies reativas de oxigênio (ROS) e hipóxia, fibrose, angiogênese [pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)], inflamação, mecanismos inatos envolvidos na ativação da imunidade adaptativa [ativação de macrófagos associados ao tumor (TAMs), indução da maturação de DCs] entre outros (Palucka & Banchereau 2013; Casey et al. 2015).

A variedade de estratégias para o tratamento de câncer que vem sendo desenvolvidas é fundamentada no avanço do entendimento da interação entre o tumor e o sistema imune. As estratégias envolvendo mecanismos da imunidade ativa e passiva, tem focado na potencialização da imunidade anti-tumor com a estimulação de diferentes células que participam tanto da imunidade natural quanto da imunidade adquirida e concorrem de forma conjunta para a destruição do tumor. Estas estratégias visam aumentar a imunidade anti-tumoral protetora rompendo com o circuito regulatório imune que são críticos para a manutenção da tolerância tumoral (Vicari et al. 2002; Kroemer 2013).

1.2 Adjuvantes

Técnicas imunoterapêuticas possuem a capacidade de induzir especificamente a morte de células tumorais com o mínimo de danos para as células saudáveis. Uma das estratégias atualmente em uso, tanto experimental como clínica, é a introdução no microambiente tumoral de adjuvantes, cuja principal ação é na estimulação do sistema imune. Adjuvantes imunológicos são substâncias, tais como emulsões, bactérias e nanopartículas (NPs), que quando associadas aos antígenos potencializam suas propriedades imunogênicas (Amaral et al. 2010; Schijns et al. 2014).

Os adjuvantes agem de forma não específica, potencializando a imunidade anti-tumoral pela estimulação de células B produtoras de anticorpos, célula T auxiliares CD4⁺, células T citotóxicas CD8⁺, células *natural killer* (NK), e monócitos (O'Hagan, 2007). Todos estes componentes, que fazem parte da imunidade natural, celular e humoral concorrem de forma conjunta para a destruição do tumor e estimulação da expressão de co-estimuladores nas células apresentadoras de antígenos (APCs) e na secreção de citocinas (Dubensky Jr & Reed 2010).

O estudo dos adjuvantes no microambiente tumoral tem sido largamente empírico e os mecanismos de como eles exercem suas atividades são pouco entendidos. Um exemplo de adjuvante é o Hidróxido de Alumínio, onde não há relatos na literatura sobre o seu uso no tratamento dos tumores, apesar de seu uso corrente e já estabilizado como componente de inúmeras vacinas. Além do adjuvante de alumínio, estão sob investigação os mecanismos de ação de outros adjuvantes como nano e micropartículas biodegradáveis (O'Hagan et al. 2003; Kwissa et al. 2009; Schijns et al. 2014).

1.2.1 Hidróxido de alumínio

A ativação e diferenciação de células T CD4⁺ para o perfil TH1 ou TH2 após a administração de hidróxido de alumínio é um fato controverso. A figura 4 esquematiza as possíveis atuações do hidróxido de alumínio na estimulação da diferenciação de células T de acordo com alguns pesquisadores. Brewer & Pollock (2004) demonstraram que o hidróxido de alumínio é mais eficaz em promover a expansão da resposta imune humoral, estimulando pobremente a hipersensibilidade do tipo tardia. Essa classe de adjuvante, é efetivo em estimular a resposta do tipo TH2, induzindo a produção de citocinas próprias desse padrão de resposta, tais como IL4 e IL5 e anticorpos dos isótipos IgG1 e IgE, não induzindo resposta do tipo TH1 com produção de citocinas como IFN- γ (Cunningham et al. 2004; Sokolovska et al. 2007). Porém, as evidências para a resposta TH2 *in vivo* é pouco convincente. Alguns pesquisadores defendem a ideia que a ação do hidróxido de alumínio possivelmente não induz a polarização das respostas de células T CD4⁺, mas atua na manutenção desse fenótipo (Seder et al. 2000). Spazierer et al. (2009) sugere uma resposta dirigida por um “mix” de populações TH1, TH2 e possíveis outras células T CD4⁺ efectoras.

Apesar das controvérsias, uma ideia parece estar consolidada, o hidróxido de alumínio potencializa a resposta imune adaptativa por ativar as células da imunidade inata que por sua vez provêm sinais de ativação para os linfócitos (Aimanianda et al., 2009; Marrack et al., 2009; Kool et al., 2012).

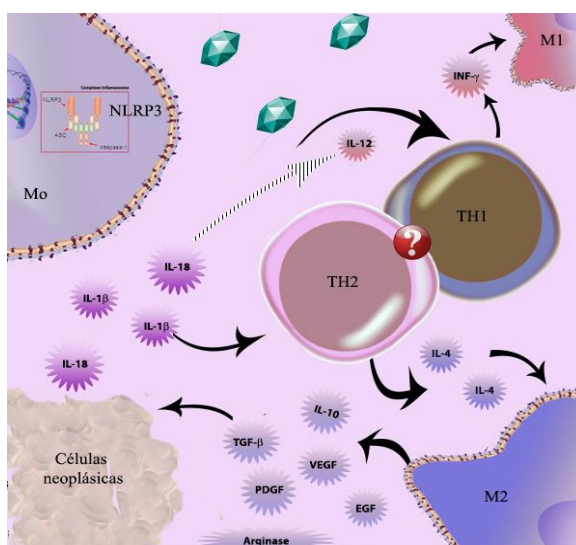


Figura 4: Atuação do hidróxido de alumínio na literatura. Hipótese 1: O hidróxido de alumínio diferencia as células T em efectoras TH2 mas não promovem a diferenciação de células TH1. A IL-18 cooperando com IL-12 promove a polarização para o perfil TH1 e

estimulação de IFN- γ , na ausência de IL-12 induz a diferenciação de células T para o perfil TH2 com produção de IL-4 e IL-13. Hipótese 2: resposta dirigida por um mix de populações TH1, TH2 e possíveis outras células T efetoras. Hipótese 3: a ação do hidróxido possivelmente não induz a polarização de células T, mas é responsável pela manutenção do perfil. Não existem relatos da administração de adjuvante hidróxido de alumínio para o tratamento do tumor experimental, então existe uma série de lacunas que devem ser esclarecida sobre a ação do hidróxido de alumínio no microambiente tumoral.

O hidróxido de alumínio possui mecanismos que amplificam a capacidade de alterar a natureza da interação física entre antígenos e o sistema imunitário, atualmente é extensivamente usado em vacinas humanas e veterinárias. Em vacinas humanas, o hidróxido de alumínio é empregado contra doenças infecciosas, incluindo vacinas contra Difteria, Tétano, Pertussis, Hepatite B, Antrax e doenças causadas por *Haemophilus influenzae* e *Papilomavirus humano* (Baylor et al. 2002; Frazer et al. 2011). Também é usado na imunoterapia de doenças alérgicas (Francis & Durham 2004; Eifan et al. 2011), e está sendo testado para imunoterapia contra diabetes *mellitus* (Wherrett et al. 2011).

A associação de hidróxido de alumínio com o antígeno resulta em potencialização da apresentação deste para o sistema imune (Morefield et al. 2005). Os adjuvantes podem ser hábeis a induzir resposta imune humoral e celular duradoura quando conjugados aos antígenos das vacinas, aumentando a intensidade da resposta imune, reduzindo a quantidade de antígenos por dose e o número de imunizações necessárias (Coffman et al. 2010).

A inoculação de hidróxido de alumínio leva a formação de focos inflamatórios pela destruição das fibras musculares, promovendo a atração de células imunocompetentes ao sítio da imunização, recrutando e ativando macrófagos, células dendríticas (DCs) e polimorfonucleares (Hogen Esch 2013). Os antígenos são capturados por essas células inatas, ocorre a estimulação da maturação e diferenciação das células T e formação de granulomas que contém células plasmáticas produtoras de anticorpos (Kool et al. 2008).

O hidróxido de alumínio usado como adjuvante só consegue realizar suas funções de ativação na maturação da célula dendrítica, recrutamento de polimorfonucleares e macrófagos quando ativa um receptor de padrão da família dos receptores semelhantes a Nood (NLR) o NLRP3, que é encontrado no citoplasma das células juntamente com uma proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) e pró-caspase-1, o qual formam o complexo denominado inflamassoma. Esse

complexo formado irá ativar caspase-1 a qual será responsável pela transformação das citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas IL-1 β e IL-18 para serem liberadas pelas células (Franchi et al. 2008; Kool et al. 2008; Eisenbarth et al. 2008; Guimarães et al. 2015).

Para a ativação funcional do inflamassoma *in vitro* (Figura 5) são necessários dois estímulos: a ativação do receptor NLRP3 e a presença de pró-IL-1 β no meio. A ativação deste receptor requer a fagocitose das partículas, a acidificação seguida de ruptura do lisossomo e a ativação da catepsina B. A produção de pró-IL-1 β é estimulada por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (Li et al. 2007), por padrões associados a patógenos como LPS, sendo também ativado por antígenos associados ao hidróxido de alumínio (Toda et al. 2003). Estes dois estímulos devem ser detectados pela mesma célula para ativação eficaz do sistema imune, aumentando também a especificidade da resposta imune. Mas, para tanto, é necessário um inflamassoma íntegro, uma fagocitose bem sucedida e pró-IL-1 β já formada (Morefield et al. 2005).

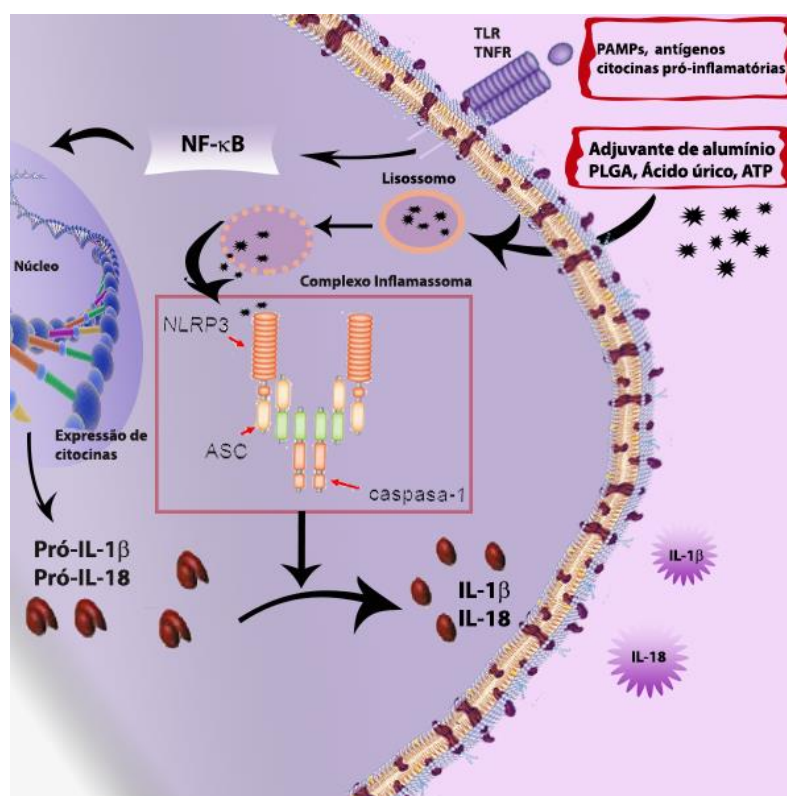


Figura 5: Ativação do Inflamassoma. A via imunológica induzida por muitos adjuvantes como hidróxido de alumínio e nanopartículas de PLGA é através da ativação do inflamassoma. O inflamassoma é formado pelo receptor Nod like receptor P 3 a proteína adaptadora ASC e caspase-1. Esse complexo ativado irá clivar as citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas suas formas ativas IL-1 β e IL-18.

Após a ativação do inflamassoma, ocorre a expressão de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-18 e/ou IL-33, por DCs e macrófagos (Hornung et al. 2008), maior expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), de moléculas de adesão como CD54 e CD58, e moléculas co-estimuladoras CD40 e CD86. O aumento da expressão dessas moléculas é crucial na ativação de célula T e indução de quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CXCL8 (Ulanova et al. 2001; Pollock et al. 2003; Li et al. 2007; Sokolovska et al. 2007).

A interleucina 1 β (IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória e exibe funções biológicas pleiotrópicas, incluindo atividade adjuvante, atua também na diferenciação de células T para um perfil T_H2 (Pollock et al. 2003). A interleucina 18 (IL-18), induz a diferenciação de células T para o perfil T_H1 ou para o perfil T_H2, dependendo do contexto imunológico. A IL-18 cooperando com a IL-12 promove a polarização para o perfil T_H1 e estimulação de INF- γ (Spazierer et al. 2009). Paradoxalmente, na ausência de IL-12 induz a diferenciação de células T para o perfil T_H2 com produção de IL-4 e IL-13 (Xu et al. 2000; Ulanova et al. 2001; Sokolovska et 2007; Serre et al. 2011).

A habilidade do hidróxido de alumínio em aumentar a secreção de IL-1 β (Sokolovska et al. 2007; Li et al. 2007) via NLRP3 (Eisenbarth et al. 2008; Franchi et al. 2008) tem sido bem descrita, porém os dados indicam que isso não é específico do hidróxido de alumínio, e sim uma propriedade geral dos adjuvantes. De fato, respostas similares foram vistas em células dendríticas com a estimulação por nanopartículas, fosfato de alumínio, fosfato de cálcio (Martinon et al. 2006; Sharp et al. 2009), ácidos nucleicos microbianos (Kanneganti et al. 2006) e estímulos endógenos tais como ATP (Mariathasan et al. 2006; Eisenbarth et al. 2008; Rock et al. 2010; Ahrens et al. 2012; Zhang et al. 2012).

1.3 Nanopartículas

Os sistemas de transporte de biomoléculas direcionados para determinados locais, oferecem uma importante solução para o problema da seleção de áreas específicas para um dado tratamento terapêutico (Kanapathipillai et al. 2014). Tais sistemas podem ser utilizados para carregar fármacos, pequenas moléculas, proteínas, adjuvantes, ácido ribonucleico de pequena interferência (siRNAs) e outros diferentes produtos (Danhier et al. 2012).

Dentre os principais objetivos da indústria farmacêutica está o desenvolvimento de agentes terapêuticos seletivos para áreas específicas do organismo de forma a potencializar a terapia e diminuir os efeitos adversos sistêmicos (Davis et al. 2008). A administração de altas doses de medicamento para conseguir atingir o sítio tumoral leva à acumulação deste no organismo ocasionando toxicidade e o desenvolvimento de resistência, limitando a aplicação clínica em longo prazo (Hoang et al. 2014; Heo et al. 2014). A integração da nanotecnologia com quimioterapia para o carregamento de drogas, pode ser explorado para superar a maior limitação intrínseca da terapia de diversos tipos tumorais, devido ao direcionamento dos sistemas carreadores dos agentes quimioterápicos para o tecido tumoral, minimizando a toxicidade sistêmica e reduzindo o desenvolvimento da resistência a drogas, prolongando desta forma a duração do tempo que o paciente pode permanecer sob tratamento quimioterápico (Alexis et al. 2010).

Os sistemas de liberação sustentada na escala nanométrica representam uma estratégia promissora para aumentar a eficácia antitumoral das drogas. O direcionamento passivo de agentes anticancer pelo fenômeno do aumento da permeabilidade e retenção (EPR) provocada pelo fenestramento na parede dos capilares (Danhier et al. 2010; Kanapathipillai et al. 2014), resulta em um aumento significativo da eficácia terapêutica, por aumentar a concentração da droga no tumor e minimizar a toxicidade sistêmica (Chakrabarti et al. 2014).

A incorporação de medicamentos de baixo peso molecular em nanopartículas (NPs) prolonga substancialmente a sua ação e aumenta a sua biodisponibilidade. Os agentes quimioterápicos livres são rapidamente distribuídos e subsequentemente eliminados por filtração glomerular nos rins. O aumento da permeabilidade e retenção (EPR) pode ser observado em todos os cânceres com exceção dos tumores hipovasculares como o câncer de próstata e de pâncreas. Torna-se evidente que a vascularização do tumor é um alvo altamente acessível e conveniente para a entrega da droga (Davis et al. 2008; Ding et al. 2013).

Para a utilização da nanoterapia, diferentes sistemas de distribuição são atualmente estudados, algumas características de design podem ser manipuladas como: tamanho, forma, carga da superfície e ligantes (Ding et al. 2013). Na escolha do carreador é de importante relevância propriedades como a longevidade da estrutura da

molécula, o direcionamento para determinada célula, e sensibilidade a constituintes do meio (Danhier et al. 2010). Exemplos de nanocarreadores biocompatíveis incluem lipossomos, polímeros, micelas e nanopartículas formadas por diferentes materiais (Alexis et al. 2010; Kanapathipillai et al. 2014).

1.3.1 Nanopartículas de ácido Poli(Lático-co-glicólico; PLGA)

São muitos os tipos de polímeros usados na preparação de nanopartículas por apresentarem vantagens específicas. Dentre eles os poli-ésteres derivados dos ácidos lático e glicólico começam a ser usados em humanos, inicialmente em suturas e próteses ortopédicas e, são comumente utilizados na preparação de nanopartículas (Davis et al. 2008). As nanopartículas de ácido poli(lactico-co-glicólico, PLGA) são aprovadas pela FDA e são largamente empregadas como veículo de carreamento por oferecer numerosas vantagens sobre outros carreadores para agentes terapêuticos, essencialmente por sua característica biodegradável e a sua propriedade de liberar lenta e gradualmente o antígeno (Commandeur et al. 2006). No que diz respeito o possível efeito tóxico de nanopartículas, Mundargi et al. (2008), demonstraram que o PLGA mesmo em uma concentração de 1 mg/ml, tem um perfil inerte mostrando alta biocompatibilidade.

Essas nanopartículas poliméricas são fagocitadas naturalmente *in vivo* por macrófagos e APC, facilitando o desenvolvimento da imunidade adaptativa. A presença do biomaterial dentro das células aumenta a resposta imune contra o componente biológico. Os antígenos presentes nas NPs são responsáveis por induzir a resposta humoral branda enquanto que as partículas utilizadas para carregar os antígenos, através do efeito adjuvante, promovem a potencialização da resposta celular, com características de uma resposta inflamatória (Newman et al. 2002; Nicolette et al. 2011).

As nanopartículas de PLGA carreadoras do antígeno encapsulado ou conjugado em sua superfície, potencializa a habilidade do antígeno em ativar células dendríticas humanas e de camundongos, resultando em um efeito cerca de vinte vezes mais potente do que o antígeno livre (Clawson et al. 2010; Hamdy et al. 2011). Tendo em vista que estas células são rapidamente capturadas pelas células dendríticas, assegura-se que uma maior quantidade do antígeno é capturado de maneira mais eficiente (Amaral et al. 2010; Clawson et al. 2010). Ainda aumenta a apresentação cruzada, garante o co-carregamento de antígenos e de adjuvantes para apresentação das células, além de

protegê-los contra a degradação proteolítica dos motivos encapsulados (Waeckerle-Men et al. 2006; Heit et al. 2007; Nikitczuk, 2013).

A captação das NPs pelas APC e macrófagos é afetada por diversos fatores, incluindo tamanho da partícula (He et al. 2010), formato (Huang et al. 2010), e carga da superfície (Ryman-Rasmussen et al. 2007; Cho et al. 2009; Arvizo et al. 2010; He et al. 2010). A modulação desses fatores pode substancialmente influenciar a biodistribuição, a meia-vida na circulação sanguínea, a captação celular inespecífica e acumulação nos tecidos específicos (He et al. 2010).

Estudos relatam que a administração de microesfera de PLGA provoca forte resposta de linfócitos T citolítico (CTL) em camundongos (Waeckerle-Men et al. 2006; Schliehe et al. 2011). Tais linfócitos agem impedindo a implantação do tumor, e em contextos terapêuticos, levam a regressão de tumores já estabelecidos (Schlosser et al. 2008; Heit et al. 2007). Tanto a capacidade lítica de CTL agindo diretamente nas células tumorais, bem como a produção de IFN- γ por células Th1, contribuem para as respostas antitumorais observadas (Mueller et al. 2011).

Schlosser et al. (2008) demonstraram que a administração de microesferas de PLGA leva ao aumento de células CD8⁺ e um pico de IFN- γ que declina rapidamente 6 dias após a vacinação. Estudos posteriores desse mesmo grupo, demonstraram que os CTL induzidos eram capazes de lisar células alvos por até 21 dias após a imunização. Assim, a capacidade lítica do CTL é mantida por mais tempo que a produção de IFN- γ (Mueller et al. 2011).

No microambiente tumoral há uma depressão do sistema imune, onde há uma pobre apresentação de antígeno, elevados níveis de IL-10, aumento da expressão de Treg. A administração de moléculas de PLGA associada a antígenos tumorais induziu o aumento da resposta T_H1 e conseqüentemente a inibição do crescimento e regressão do tumor (Nikitczuk et al. 2013).

Muitos estudos demonstram a efetividade do sistema de carreamento de antígeno pelo PLGA, mas poucos elucidam os mecanismos imunológicos de ação do complexo de PLGA mais drogas, adjuvantes, RNA ou DNA em meio ao microambiente tumoral. Há relatos conflitantes sobre o papel do inflamassoma NLRP3 na ação de nano e micropartículas de PLGA atuando como adjuvantes (De Gregorio et al. 2008). Especula-

se que as citocinas TNF- α e IL-1 β apresentam diferentes tempos de indução quando as células são estimuladas com as partículas. Demento et al (2009) demonstrou em seu trabalho que as micropartículas de PLGA (1-10 μm) promove nas células dendríticas a ativação de NLR, especificamente o inflamassoma NLRP3.

Os mecanismos imunológicos desses complexos devem ser esclarecidos para ajudar a conduzir uma maior opção de tratamentos eficientes baseada em terapias com polímeros. A análise de estratégias terapêuticas no contexto de modelos tumorais é necessária para destacar uma variedade de mecanismos de sobreposição que contribui para o escape imune-tumoral.

2 JUSTIFICATIVA

A imunoterapia para o tratamento do câncer vem apresentando inúmeras vantagens sobre a tríade clássica – cirurgia, radioterapia e quimioterapia - por apresentar maior eficiência e menor toxicidade para o organismo, porém muitas incertezas ainda cercam essa nova estratégia de tratamento. Para ampliar o sucesso dessa terapia, é preciso aprofundar muito a pesquisa sobre a interação entre sistema imunológico e câncer.

A administração de substâncias denominadas de adjuvantes como forma imunoterápica já vem sendo utilizada na prática clínica. No tratamento de câncer de bexiga tem sido indicada a imunoterapia com adjuvante, sendo realizada pela administração intravesical do Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Herr & Morales 2008). Porém, deve se atentar à toxicidade do BCG, os efeitos colaterais representam o principal motivo de interrupção do tratamento (Reijke et al. 2005). O mecanismo de ação na imunoterapia com BCG para o câncer não é completamente conhecido, mas alguns estudos sugerem que ele atua como ajudante de células T desencadeando uma resposta imunológica regida, principalmente, por interleucinas do perfil TH1 (Lee et al. 2004).

Investigações anteriores do nosso grupo demonstraram que o hidróxido de alumínio é mais eficiente que a administração de BCG na regressão do tumor S180 em camundongos, regredindo a massa tumoral mais rapidamente sem efeitos colaterais (Freitas et al. 2010, Santos et al. 2012). A ação imunoterápica da administração de hidróxido de alumínio deve ter seu estudo aprofundado, visto que ainda não há outros relatos na literatura sobre a utilização desse adjuvante para tratamento de tumor.

Este é um trabalho de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P&D&I) que investigou a ação adjuvante do hidróxido de alumínio no microambiente tumoral, indicando os mecanismos imunes envolvidos e os benefícios ocasionados pela nanoestruturação desses compostos em nanopartículas de PLGA. A associação de adjuvantes a nanopartículas poliméricas potencializou a resposta imunológica para combater o tumor, principalmente por eles serem capturados pelas células de defesa, desencadeando uma resposta mais eficiente. Os resultados podem colaborar para o desenvolvimento de uma possível terapia para combater os tumores e melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por esta doença.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

- ✓ Investigar a atividade *in vitro* e *in vivo* de tratamentos imunoterápicos usando adjuvantes formulados em sistemas poliméricos na regressão do tumor experimental e seus efeitos sobre a resposta imune em camundongos.

3.2 *Objetivos específicos*

- ✓ Preparar e caracterizar nanopartículas em blenda polimérica de ácido polilático *co*-glicólico (PLGA) contendo hidróxido de alumínio;
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico de adjuvantes formulados em sistemas poliméricos *in vitro*;
- ✓ Avaliar a regressão tumoral de adjuvantes formulados em sistemas poliméricos *in vivo*;
- ✓ Avaliar o efeito da utilização dos adjuvantes no sistema imune, através da dosagem de citocinas sistêmicas no soro dos camundongos após o fim do tratamento
- ✓ Comparar o efeito dos adjuvantes associados ou não com nanopartículas na regressão do tumor experimental.

4 MÉTODOS

Animais: Camundongos Balb/c, do sexo feminino foram obtidos do Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), e acondicionados em gaiolas em sala própria, quatorze dias antes dos experimentos. Foram mantidos no regime de luz e umidade natural com ração padrão do biotério e água *ad libitum*.

Manutenção das Células do Sarcoma 180 (S180): Uma alíquota de células de S180 foi gentilmente doada pela Prof^a Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. As células do S180 foram cultivadas *in vivo* em camundongos Balb/c por meio da inoculação intraperitoneal (*i.p.*) na concentração de $1,0 \times 10^5$ células, sendo os repiques realizados a cada dez dias.

Tratamentos: Neste trabalho, utilizou-se uma combinação de hidróxido de alumínio, nanopartículas de ácido poli(lático-co-glicólico, (PLGA)) e macrófagos. Foram testados hidróxido de alumínio fabricado pelo Laboratório Sigma Pharma Ltda – Brasil, o qual será referido como Hidróxido Sigma: HS, e o hidróxido de alumínio fabricado pelo Laboratório ALL Chemistry manipulado conforme a formulação do Hidróxido da marca Teuto (não mais comercializado), foi denominado de Hidróxido manipulado: HM. A figura 6 ilustra as diferentes combinações feitas para o tratamento de cada grupo experimental.



Figura 6: Adjuvantes utilizados nos experimentos

Nanopartículas: Foram preparadas nanopartículas (NPs) de PLGA contendo hidróxido de alumínio sigma (PLGA HS), NPs de PLGA contendo hidróxido de alumínio manipulado (PLGA HM) e NPs de PLGA vazias (PLGA), todas foram preparadas pelo método de simples emulsão seguido pela evaporação do solvente (Pagels & Prud'homme 2015). Para as NPs contendo hidróxido de alumínio, inicialmente 120,0 mg de PLGA foi solubilizado em 10,0 mL de diclorometano. Em seguida, foi adicionado 307,5 mg de hidróxido de alumínio à solução contendo o polímero. A mistura foi emulsionada sob vigorosa agitação mecânica a 15.000 rpm em 25,0 mL de uma solução aquosa com 3,0%_(m/v) de álcool polivinílico (PVA) que possui a função de surfactante para a formação de uma emulsão óleo/água. Após a emulsificação, a solução foi submetida à agitação magnética até a total evaporação do solvente orgânico. A seguir, as NPs foram centrifugadas a 7.826g por 20 minutos e lavadas quatro vezes com água ultrapura. Essas NPs foram ressuspensas em um volume de 1,0 mL de água ultrapura. As NPs de PLGA vazias foram obtidas pelo mesmo procedimento, diferenciando-se somente pela não inclusão do hidróxido de alumínio na solução.

Caracterização das NPs: A caracterização foi feita analisando o tamanho das NPs e o Índice de Polidispersão (PDI), o qual representa a medida de distribuição de tamanho das amostras. Para realizar as medições 100 µL da suspensão das nanopartículas após a lavagem foram transferidos para uma cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico, juntamente com 900,0 µL de água ultrapura, utilizou-se o equipamento Nano-Zetasizer ZS por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*).

Eficiência de Encapsulamento: Foi empregado o método indireto para determinação da eficiência de encapsulamento do hidróxido de alumínio nas NPs. Para obter essa estimativa, a concentração do hidróxido de alumínio livre foi determinada no sobrenadante após a primeira centrifugação e a concentração total de hidróxido de alumínio foi determinada pela completa dissolução das nanopartículas por espectrofotometria. A concentração remanescente, ou seja, a fração de hidróxido de alumínio associada a nanoestrutura é calculada pela diferença da fração livre e total. Pela equação abaixo foram obtidos valores aproximados da quantidade de hidróxido de alumínio encapsulados.

$$\%EE (\%) = \left(\frac{[]_{inicial} - []_{remanescênte}}{[]_{inicial}} \right) \times 100$$

Obtenção e ativação dos macrófagos: Camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e imersos em álcool 70%. Em capela de fluxo laminar a cavidade peritoneal do animal foi lavada com 6,0 ml de meio completo, RPMI- 1640 (Sigma) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen). Após massagem abdominal, o líquido da cavidade peritoneal foi aspirado e coletado, sendo retirada uma alíquota para determinação da concentração celular. Macrófagos peritoneais na concentração de 2×10^5 células foram ativados *in vitro* com $1 \mu\text{g}$ de LPS (Sigma) e mantidos em estufa de CO_2 5% por 48h. Após esse período os macrófagos foram visualizados em microscópio invertido, apresentando uma série de diferenças morfológicas quando comparadas às células não ativadas. Os macrófagos ativados tornam-se maiores, aumentam sua capacidade de aderência e espreado em superfícies, aumentam a formação de pseudópodes e aumentam o número de vesículas pinocitóticas (Johnston Jr. 1988). As células foram lavadas com meio RPMI 1640 (Sigma) para a retirada daquelas em suspensão. Posteriormente, os macrófagos aderidos ao frasco de cultivo celular foram desprendidos usando *Scraper* (NUNC), a solução centrifugada quando ressuspensa em meio RPMI com suplementação de 10% SFB foi utilizada para os testes *in vitro*, quando ressuspensa em meio RPMI sem suplementação foi utilizada para inoculação intratumoral.

Testes *in vitro*: Foram realizados ensaios de viabilidade celular com as células de S180 sob as concentrações de 90, 180, 270 e 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada tratamento (HS, HM, PLGA, PLGA HS, PLGA). As células S180 mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Balb/c foram coletadas no dia anterior ao início dos testes *in vitro*, 250,0 μl de tumor ascítico de S180 foi colocado em um frasco de cultivo celular contendo 25,0 mL de meio RPMI 10% de SFB, foram mantidas sob cultivo por 24 horas nas condições de 5 % de CO_2 e 37 °C em estufa, posteriormente o meio foi centrifugado a 3600 g por 10 minutos, o pellet resultante foi ressuspensa em 5,0 mL de meio RPMI 10% de SFB, a concentração celular foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer e em seguida as células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Foram utilizados materiais esterilizados e o procedimento foi executado no interior de uma câmara de

fluxo laminar cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por pelo menos 20 minutos antes do início do procedimento.

Teste de viabilidade pelo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina): Células S180 preparadas para o teste *in vitro*, foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células por orifício num volume de 100,0 μl , em placas de 96 poços (Costar). Adicionou-se em triplicata 100,0 μl das substâncias testes: hidróxido de alumínio livre (HS e HM), nanopartículas de PLGA e nanopartículas de PLGA contendo o hidróxido de alumínio em diferentes concentrações ($90 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $270 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $360 \mu\text{g.mL}^{-1}$) mantendo sob cultivo por 48 horas nas condições de 5 % de CO_2 e 37°C . Após 48 horas de tratamento, estas células foram centrifugadas a 6400 g por 5 min, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Em condições estéreis e com baixa luminosidade adicionou-se MTT (Sigma) diluído 1/5 em PBS 1x por poço, cultivando por mais três horas. Dentre os produtos formados pelo metabolismo celular na presença do MTT encontra-se a púrpura de formazano. Em seguida, adicionou-se 50,0 μl de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS - Invitrogen). As placas foram mantidas protegidas da luz natural de um dia para o outro. A determinação da densidade óptica dos ensaios foi realizada em leitora de ELISA com filtro de luz de 545 nm. Para cada placa utilizada no ensaio havia um grupo controle negativo e um grupo controle positivo. Nos poços do controle negativo (CN) havia células que não foram submetidas a nenhum tipo de tratamento, mas que tiveram as mesmas influências ambientais causadas pela manipulação que as células tratadas. E o controle positivo (CP) eram os poços tratados com Triton-X 100, detergente que causa lise celular. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a equação abaixo, onde DO é a densidade óptica de cada tratamento, CN é a média da densidade óptica do controle negativo e CP é a média da densidade óptica do controle positivo.

$$\% \text{ Viabilidade} = \left\{ 1 - \left[\frac{(DO - CN)}{(CP - CN)} \right] \right\} \times 100$$

Indução do tumor: O líquido ascítico com células tumorais do sarcoma 180 germinadas por dez dias no peritônio de camundongos Balb/c, foi aspirado e centrifugado. Através do sedimento realizou-se a contagem celular e teste de viabilidade celular com Azul de Tripan. A concentração de células viáveis foi ajustada com PBS para 2×10^7 células/mL (concentração celular previamente testada capaz de induzir o tumor). O volume de 1 mL

foi inoculado via subcutânea na região dorsal (Farong et al. 2007) em sessenta e três camundongos Balb/c. Quinze dias após a inoculação das células tumorais, os camundongos foram agrupados em nove grupos homogêneos em relação ao crescimento tumoral, totalizando sete camundongos por grupo, sendo um camundongo com tumor grande, dois com tumor médio e quatro com tumor pequeno no início do tratamento. O Quadro 1 apresenta cada grupo com sua respectiva descrição da finalidade e do tipo de tratamento.

Quadro 1 – Identificação dos grupos

<i>Grupo</i>	<i>Finalidade</i>	<i>Tratamento</i>
C	Grupo controle, animais com tumor que não são tratados	<ul style="list-style-type: none"> • Não é tratado
HS	Efeitos do hidróxido de alumínio sigma livre no microambiente tumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculação de $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidróxido de alumínio sigma livre
HM	Efeito do hidróxido de alumínio manipulado livre no microambiente tumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculação de $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidróxido de alumínio manipulado livre
PLGA	Efeitos da nanopartícula no microambiente tumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculação de nanopartículas de PLGA vazias
PLGA HS	Efeitos das nanopartícula em conjunto com hidróxido de alumínio sigma	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculação de $180\mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidróxido de alumínio sigma nas nanopartículas de PLGA
PLGA HM	Efeitos das nanopartículas em conjunto com hidróxido de alumínio manipulado	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculação de $180\mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidróxido de alumínio manipulado nas nanopartículas de PLGA
Mo	Controle das alterações no microambiente tumoral quando M1 está presente .	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculação de 2×10^5 de Macrófago ativado (M1)
Mo PLGA	Efeitos das nanopartículas no microambiente tumoral na presença de M1	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculação de 2×10^5 de Macrófago ativados e posterior administração de partículas de PLGA vazias
Mo PLGA HM	Efeitos das nanopartículas em conjunto com hidróxido de alumínio manipulado no microambiente tumoral na presença de M1	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculação de 2×10^5 de Macrófago com posterior inoculação de $180\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Hidróxido contido nas nanopartículas de PLGA

Tratamentos: O tratamento foi constituído por três doses dos compostos específicos, através de aplicações na região tumoral, com um inóculo a cada sete dias. Em seguida os

animais foram avaliados e eutanasiados por deslocamento cervical, retirou-se o tumor para análise histopatológica e foi realizada a coleta de sangue da cavidade torácica para quantificação de citocinas. A Figura 8 demonstra o esquema do tratamento realizado.



Figura 7: Esquema de tratamento. Inoculação de células tumorais s.c. na região dorsal dos camundongos, após 15 dias o tratamento foi iniciado injetando na região do tumor os compostos dos respectivos tratamentos, esse processo foi repetido por mais duas vezes a cada sete dias. Vinte e um dias após o início do tratamento os camundongos foram eutanasiados.

Dosagem de citocinas no soro: O sangue periférico foi coletado da cavidade torácica dos camundongos. Para a obtenção do soro as amostras sanguíneas permaneceram em estufa a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos, o soro foi coletado e armazenado a -70 °C. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias e imunossupressoras foram determinadas pelo método imunoenzimático (ELISA) usando-se kits BD OptEIA set mouse, de acordo com as especificações do fabricante. As citocinas dosadas no soro foram IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p40 e IL-12p70.

Análise histopatológica: De cada animal, após a dissecação da região neoplásica, o material foi avaliado macroscopicamente, foi pesado e fixado em formaldeído a 3,4 %. Foi selecionado metade ou um terço do total da neoplasia para o processamento, conforme o seu tamanho. Após o processamento do histopatológico o fragmento foi incluído em parafina. Os cortes histológicos foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para análise morfológica e morfométrica das características da neoplasia, cada lâmina foi classificada em Ausente (0 %), Discreto (até 25 %), Moderado (25 à 50 %) e Acentuado (> 50 %) para a presença de infiltrado peritumoral e

intratumoral, neovascularização, e área de necrose. As células tumorais foram classificadas quanto ao tipo celular (ovóide ou poliédrica) e pela característica do seu núcleo (vesiculososo ou hiper cromático). A atividade mitótica foi quantificada em dez campos em grande aumento. A análise das características morfológicas na lâmina corada em HE foi realizada com objetiva de 40x (Veta 2015).

Análise Estatística: Para resultados quantitativos foi realizada a análise estatística usando os softwares SPSS *statistics* e GraphPad Prisma 5. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pela Análise de variância (ANOVA) unifatorial ou multifatorial, dependendo da quantidade de variáveis presentes em cada experimento, seguida pelo teste LSD (*Least Significant Difference*). Resultados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Kruskal-Walli e posteriormente foram submetidos ao teste de múltipla comparação de Dunn. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$. Para a elaboração dos gráficos foi empregado o softwar GraphPad Prisma 5.

5. RESULTADOS

- **Caracterização de nanopartículas**

As nanopartículas vazias e carregando hidróxido de alumínio foram caracterizadas em relação ao tamanho e índice de polidispersão (PDI) pelo aparelho Zetasizer, o diâmetro das nanopartículas variou em torno de 160 nm a 295 nm. O PDI, para cada subtipo de nanopartícula, sempre estava abaixo de 0,4 e a eficiência de encapsulação do hidróxido de alumínio nas nanopartículas foi em média 73%. A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para cada tipo de nanopartícula.

Tabela 1: Caracterização das nanopartículas.

Nanopartículas	Diâmetro (nm)	PDI	Eficiência de encapsulação
PLGA vazia	160	0,433	0%
PLGA HS	320	0,216	79%
PLGA HM	294	0,316	68%

- **Avaliação do efeito citotóxico dos adjuvantes *in vitro***

O ideal para uma imunoterapia contra o câncer é a indução do sistema imune para que ele reconheça e destrua as células tumorais, eliminando os efeitos colaterais decorrentes de outras formas terapêuticas, as quais utilizam substâncias nocivas com baixa especificidade para células tumorais e acabam acometendo as células normais. A fim de verificar a viabilidade das células tumorais S180 frente a diferentes concentrações de hidróxido livre e nanoestruturado, foram realizados o teste de viabilidade *in vitro* pela redução do MTT, este teste possibilita espectrofotometricamente a quantificação do crescimento celular, da viabilidade e proliferação, podendo ser utilizado como um indicador direto de citotoxicidade. Esse experimento foi realizado em triplicata por três vezes. As variações do percentual de viabilidade celular entre as diferentes concentrações de cada tratamento e entre os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A média do percentual de viabilidade celular para S180 pelo MTT pode ser verificada na Figura 8.

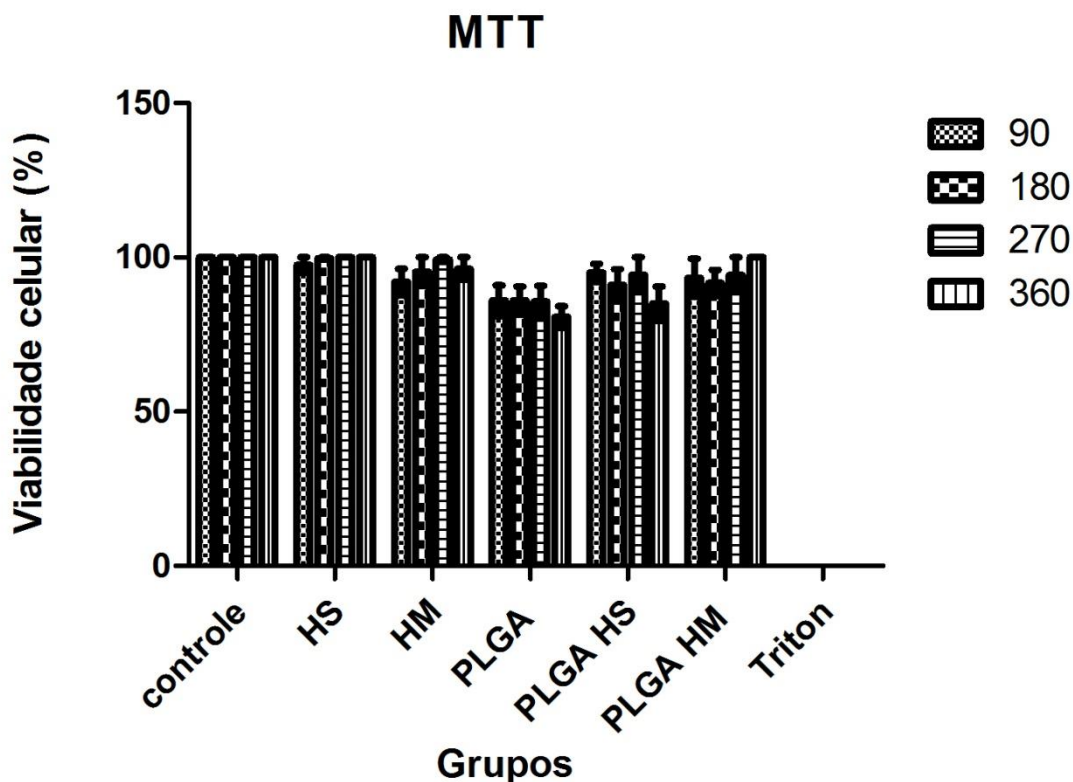


Figura 8: Teste *in vitro* com diferentes concentrações dos compostos. Apresenta a média do % de viabilidade de células S180 em diferentes concentrações dos composto avaliado pelo método MTT.

- **Avaliação dos tratamentos *in vivo***

Sabendo que os tratamentos que serão realizados não são nocivos diretamente às células tumorais, o próximo passo foi à avaliação desses tratamentos em sistemas vivos, com a finalidade de observar a capacidade desses adjuvantes em induzir o sistema imune a reconhecer e destruir a massa tumoral.

Células de S180 foram inoculadas no subcutâneo da região dorsal de camundongos, porém, o tumor não cresce de forma homogênea nos camundongos. Para diminuir os erros decorrentes dessa variabilidade, no início do tratamento foi feito um remanejamento dos animais, deixando cada grupo com a mesma quantidade de camundongos com tumores classificados macroscopicamente como sendo grande (aqueles que possuem uma massa tumoral maior que três centímetros de diâmetro), médio (aqueles que possuem uma massa tumoral visível) e pequeno (aqueles que possuem uma massa tumoral não visível, mas palpável). Ao final da terceira semana de tratamento, os grupos não estavam completos, pois, no total, morreram oito

camundongos. Por grupo, o menor percentual de sobrevivência foi de 71 %, ou seja, dois camundongos a menos nos grupos tratados com HM, Mo e Mo PLGA HM. Os grupos cujo tratamento envolveu PLGA, PLGA HS e PLGA HM foram os grupos que não houve perda de animais, totalizando 100 % de sobrevivência. Os grupos C e HS perderam apenas um camundongo. A Figura 9 apresenta a quantidade de animais em cada grupo durante o experimento.

NÚMERO DE CAMUNDONGOS DURANTE O TRATAMENTO									
DIAS	Controle	HS	HM	PLGA	PLGA HS	PLGA HM	Mo	Mo PLGA	Mo PLGA HM
1° DIA	7	7	7	7	7	7	7	7	7
2° DIA	7	7	7	7	7	7	7	7	7
3° DIA	7	7	7	7	7	7	7	7	7
4° DIA	7	7	7	7	7	7	7	7	7
5° DIA	7	6	7	7	7	7	6	7	7
6° DIA	7	6	7	7	7	7	6	7	7
7° DIA	6	6	7	7	7	7	6	7	7
8° DIA	6	6	7	7	7	7	6	7	7
9° DIA	6	6	7	7	7	7	5	7	6
10° DIA	6	6	7	7	7	7	5	7	6
11° DIA	6	6	7	7	7	7	5	7	6
13° DIA	6	6	6	7	7	7	5	7	5
14° DIA	6	6	6	7	7	7	5	7	5
15° DIA	6	6	6	7	7	7	5	7	5
16° DIA	6	6	6	7	7	7	5	7	5
17° DIA	6	6	5	7	7	7	5	7	5
18° DIA	6	6	5	7	7	7	5	7	5
19° DIA	6	6	5	7	7	7	5	7	5
20° DIA	6	6	5	7	7	7	5	7	5

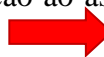
NÚMERO DE CAMUNDONGOS NO FIM DO TRATAMENTO									
EUTANÁSIA	Controle	HS	HM	PLGA	PLGA HS	PLGA HM	Mo	Mo PLGA	Mo PLGA HM
21° DIA	7	6	5	7	7	7	5	7	5

Figura 9 Número de camundongos durante o tratamento. A Tabela apresenta o número de camundongos vivos em cada grupo no decorrer dos dias após o início da administração dos tratamentos

A avaliação em relação ao aspecto físico e disposição do animal após o tratamento mostrou diferenças expressivas nos camundongos tratados em relação aos não tratados. A Figura 10 apresenta um camundongo representativo do grupo controle e um

camundongo representativo do grupo tratado com PLGA HM, evidenciando a redução drástica da massa tumoral e a debilidade dos animais quando não são tratados.



Figura 10: Comparação do efeito do tratamento. Camundongo da esquerda representativo do grupo controle ao final do experimento, portador de tumor sem tratamento. Camundongo da direita representativo do grupo tratado com PLGA HM ao final do experimento. Diferenças podem ser observadas em relação ao aspecto físico do animal, característica da pelagem e eliminação da massa tumoral.  Indica a massa tumoral

- **Avaliação da regressão tumoral**

Sete dias após a terceira inoculação dos tratamentos, os camundongos foram eutanasiados e o tumor dissecado. Ao analisar o peso dos tumores dos animais tratados com hidróxido de alumínio livre, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com hidróxido de marcas distintas (HS x HM). O tratamento com PLGA HM foi o único que mostrou diferença significativa na resolução do tumor em

comparação com o grupo controle. Hidróxido sigma nanoestruturado (PLGA HS) teve melhores resultados na resolução tumoral comparado com a inoculação de hidróxido sigma livre (HS). Os resultados envolvendo a inoculação de adjuvantes e macrófagos previamente ativados pela via clássica (Mo PLGA, Mo PLGA HM), mostraram redução tumoral significativa em comparação com a inoculação apenas de macrófagos. Não houve diferença entre Mo PLGA com Mo PLGA HM. (Figura 11)

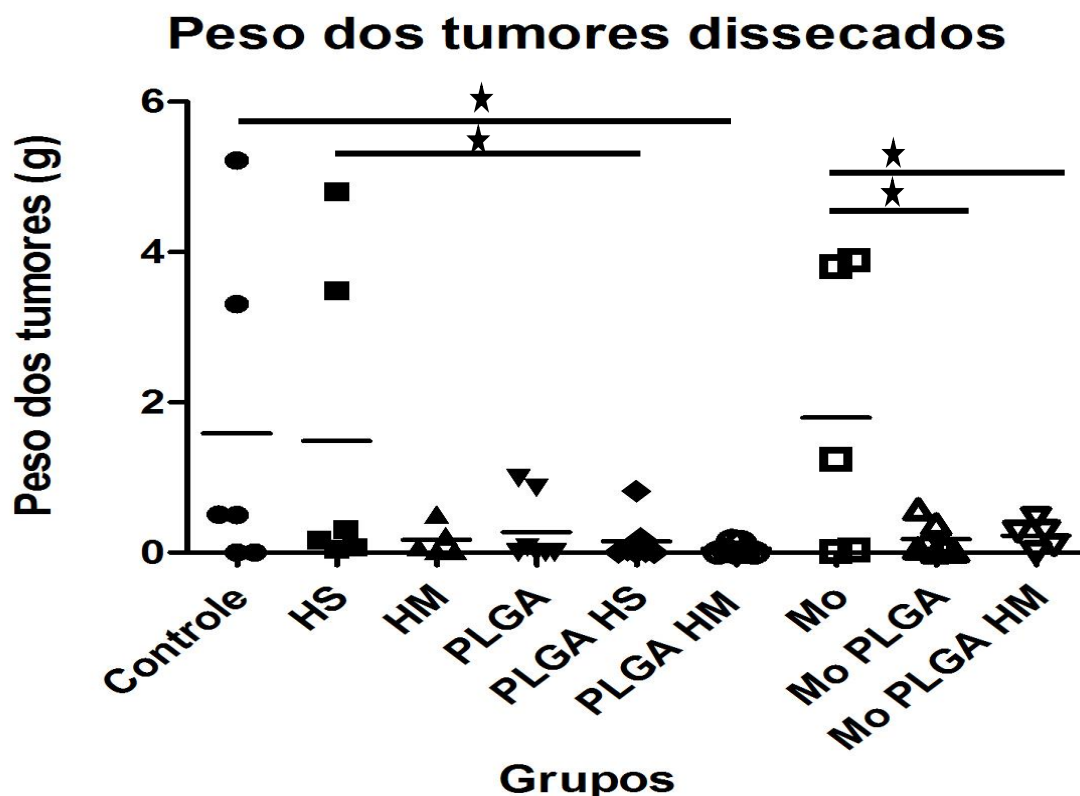
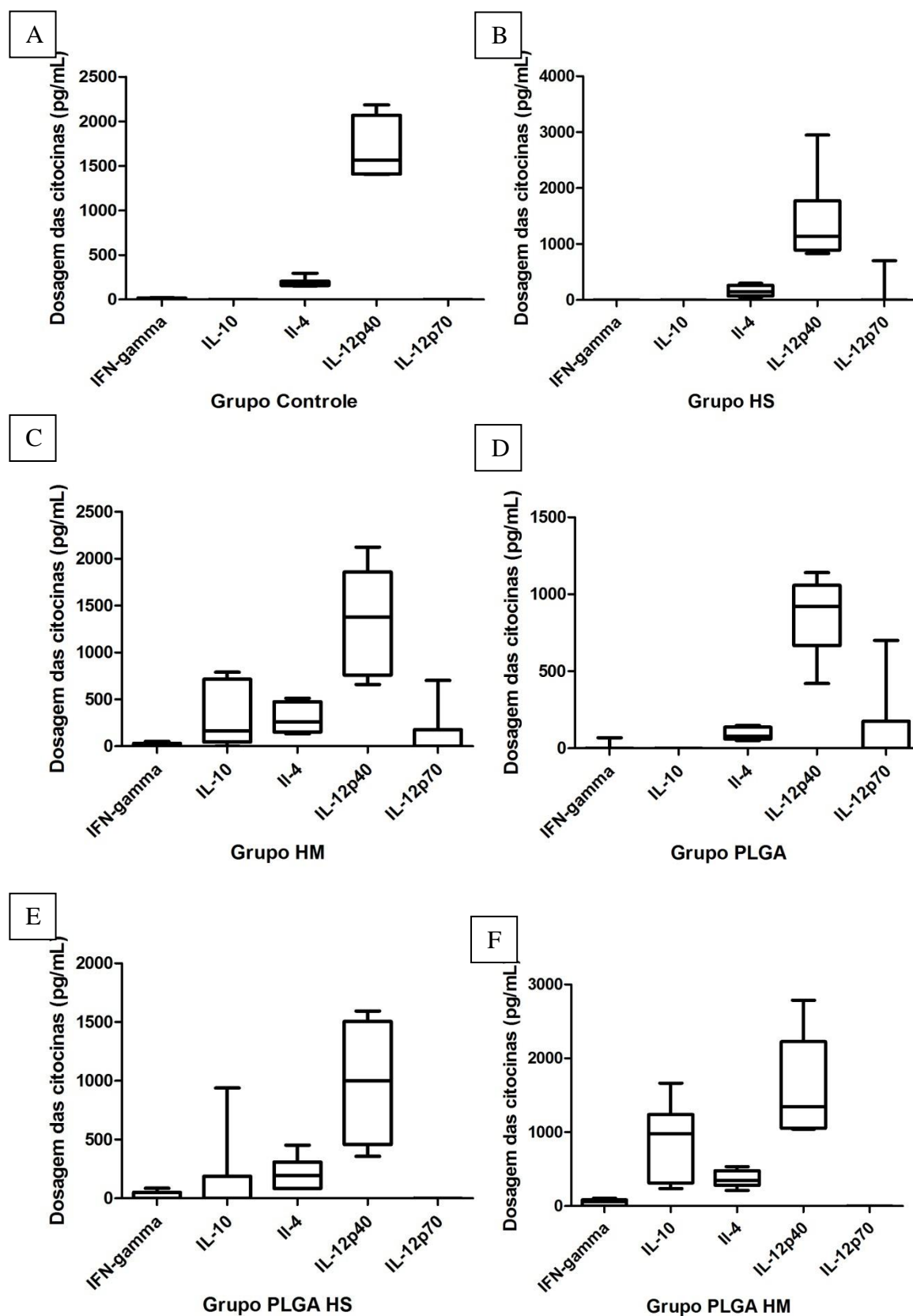


Figura 11: Peso dos tumores dissecados após o tratamento. ★estatisticamente significativo $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo Teste LSD). C x PLGA HM: $p = 0,039$. HS x PLGA HS: $p = 0,044$. Mo x Mo PLGA: $p = 0,021$. Mo x Mo PLGA HM: $p = 0,036$.

- **Dosagem de citocinas sistêmicas**

A dosagem de citocinas no soro dos camundongos após a finalização do tratamento revelou alterações no sistema imune a níveis sistêmico no grupo tratado com PLGA HM para as citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4. Os outros grupos não tiveram alteração significativas dos níveis de citocinas sistêmicos sendo os resultados semelhantes ao do grupo controle para todas as citocinas dosadas. Para IL-12p70 e IL-12p40 a dosagem foi semelhante em todos os tratamentos, chegando a níveis quase não detectáveis para IL-

12p70 e níveis bastante elevados para IL-12p40. A Figura 12 apresenta os gráficos detalhando a dosagem de citocinas nos grupos.



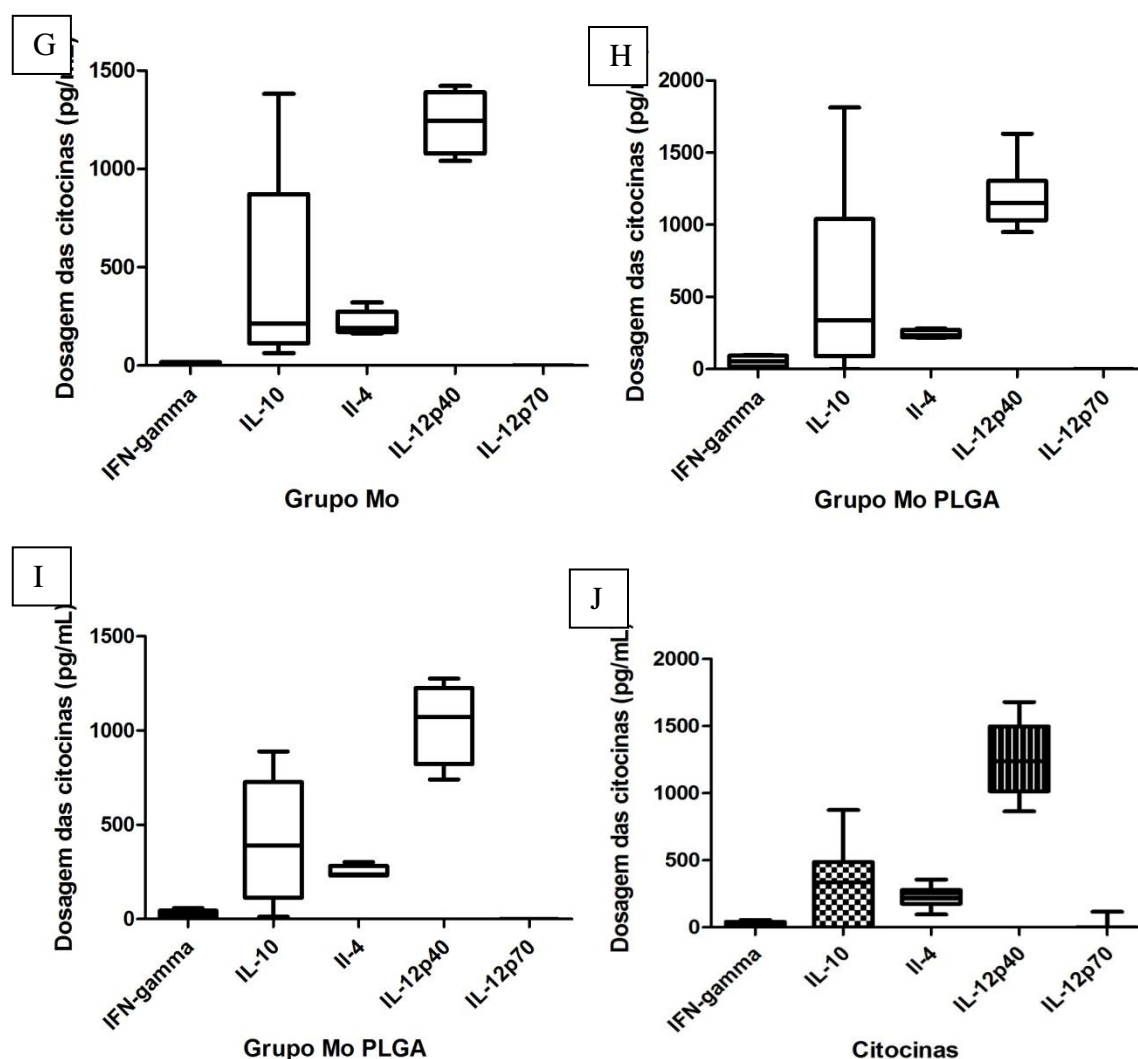


Figura 12: Quantificação das citocinas do soro dos camundongos por ELISA. Os gráficos de A – I apresentam a dosagem das citocinas por grupo, o gráfico J apresenta a mediana da dosagem de todos os grupos.

O tratamento com PLGA HM juntamente com o tratamento com Mo PLGA foram os grupos que tiveram as maiores produções da citocina IFN- γ . Quando o hidróxido é inoculado na forma livre, não há diferença na quantificação dos níveis de IFN- γ entre HM e HS, ambos os grupos não induzem o aumento da produção dessa citocina a ponto de ser detectada no soro dos camundongos, porém, quando o hidróxido de alumínio HM é nanoestruturado (PLGA HM) ele aumenta em sete vezes o nível de IFN- γ comparado com o hidróxido livre HM. O tratamento com Mo PLGA apresentou níveis altos para IFN- γ , já Mo PLGA HM apresentou a metade dos níveis detectados pelo Mo PLGA, e o tratamento apenas com Mo não apresentou aumento dessa citocina, a ponto de ser detectado, como indicado na Figura 13.

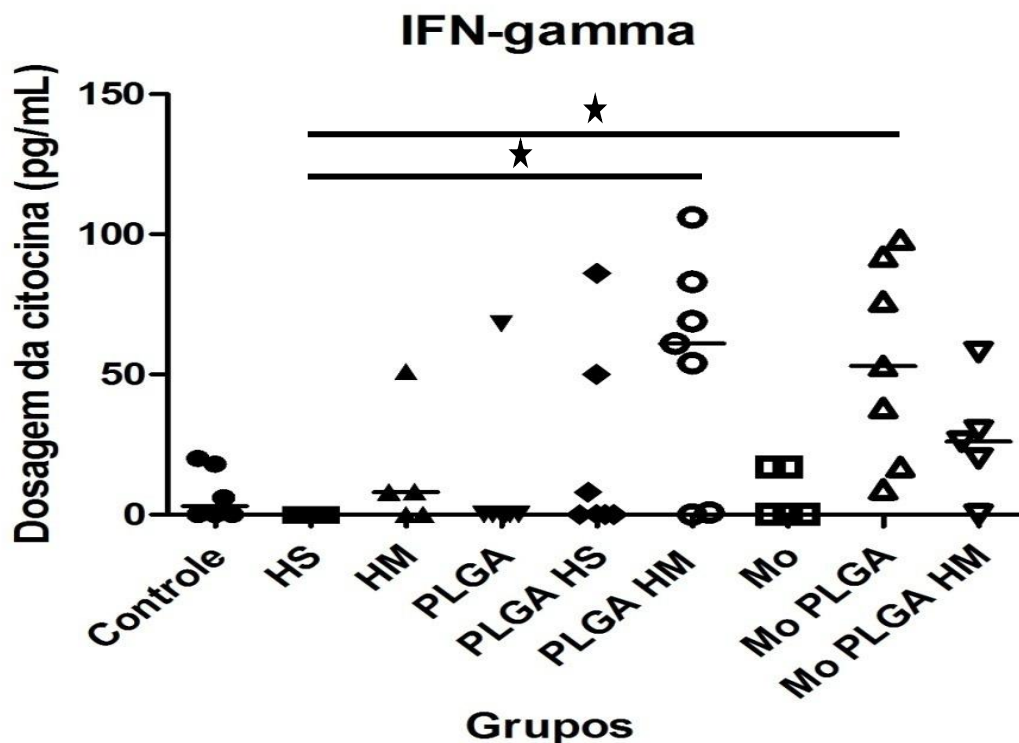


Figura 13: Quantificação de IFN-gamma no soro dos camundongos após o tratamento. ★ estatisticamente significativo $p < 0,05$ pelo Teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Na quantificação dos níveis de IL-10, o grupo PLGA HM novamente apresentou o maior valor, se diferenciando dos outros modelos de tratamento que envolve nanopartícula, PLGA HM apresentou uma concentração de aproximadamente seis vezes mais citocinas que o tratamento com HM, o qual também apresentou um aumento significativo em relação ao controle e ao HS. Os tratamentos utilizando macrófago apresentaram um aumento do nível de IL-10 homogêneos entre eles, não houve diferença entre esses grupos (Figura 14).

A quantificação de IL-4 apresentou níveis elevados para todos os grupos. O tratamento com HM apresentou duas vezes mais IL-4 que o tratamento com HS, e aproximadamente duas vezes menos IL-4 que o tratamento com PLGA HM. Por sua vez, PLGA HM continuou se destacando como maior indutor de citocinas, apresentando cinco vezes mais IL-4 que o grupo tratado apenas com PLGA e duas vezes mais que o grupo tratado com PLGA HS. Os três tratamentos que envolvem a utilização de macrófagos não apresentaram diferença nos níveis de IL-4 entre eles (Figura 15).

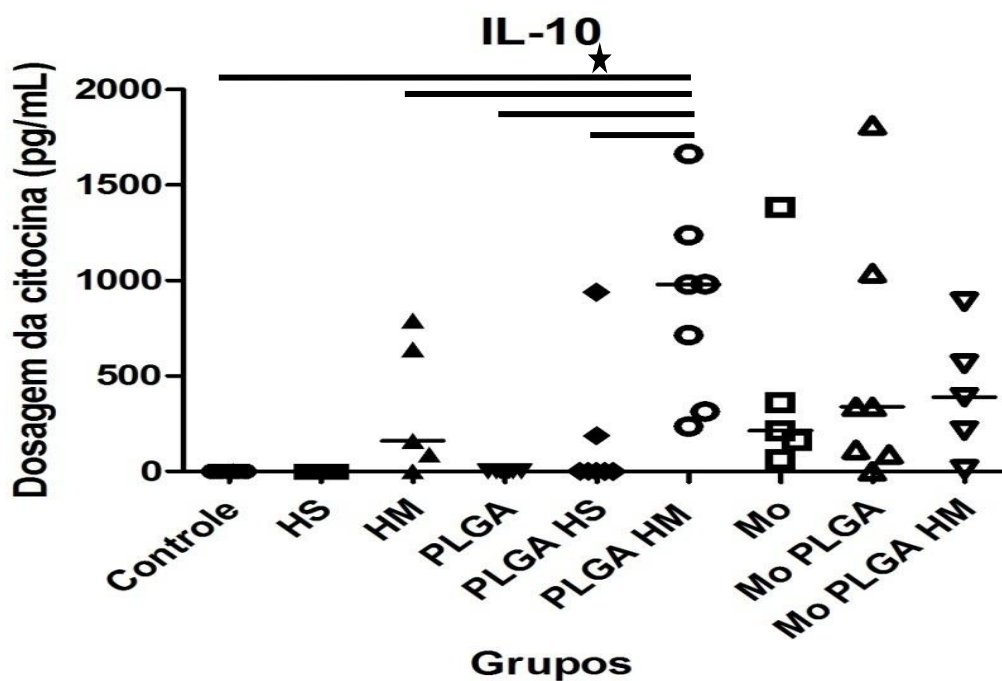


Figura 14: Quantificação de IL-10 no soro dos camundongos após o tratamento.

★ estatisticamente significativo $p < 0,05$ pelo Teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

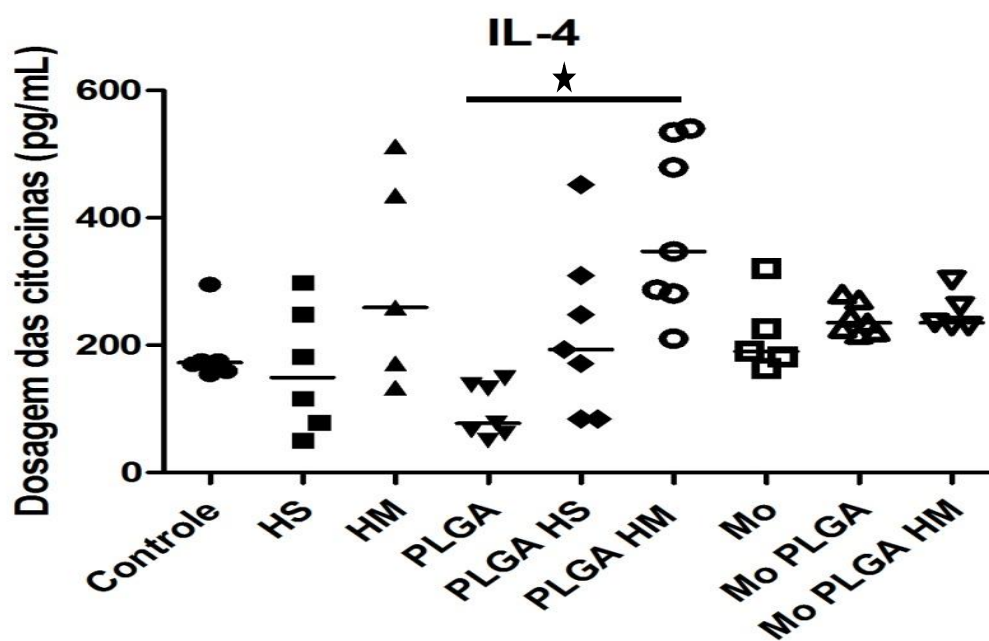


Figura 15: Quantificação de IL-4 no soro dos camundongos após o tratamento. ★

estatisticamente significativo $p < 0,05$ pelo Teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

- **Avaliação histopatológica**

A avaliação histopatológica do tumor de cada animal foi realizada analisando a necrose da região, a presença de infiltrado, o tipo celular e a neovascularização. O percentual da área necrosada teve resultados semelhantes ao encontrado na avaliação da regressão tumoral, os grupos que tiveram menor peso dos tumores foram os mesmos grupos que possuíam uma larga extensão de área necrosada do corte histológico, e os grupos que possuíam pesos maiores, apresentaram pequena área de necrose. A região necrosada apresentou duas formas distintas (figura 16), em algumas lâminas se mostrou bem definida enquanto que em outras apresentou um formato de ilha, presente em várias regiões circundadas por agrupamentos de células.

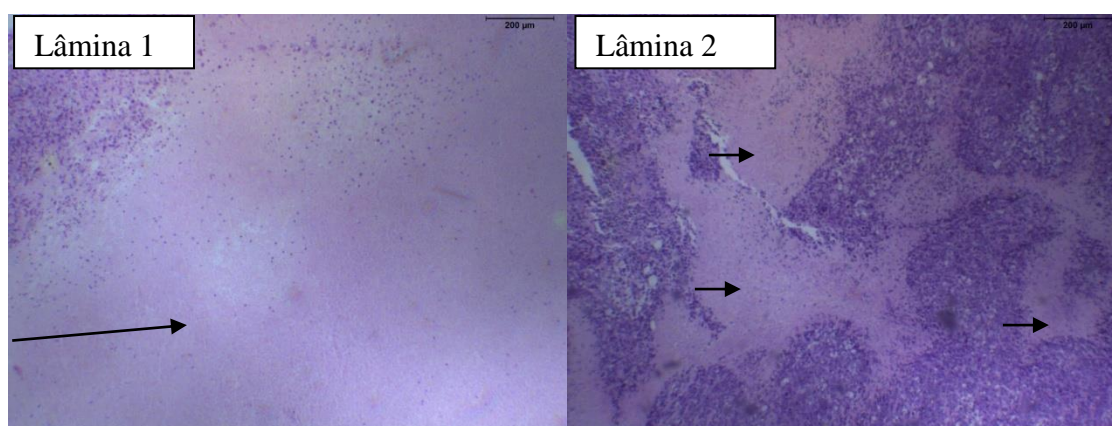


Figura 16: Área em necrose. Aumento de 20x. Lâmina 1: representativo do grupo tratado com PLGA HM, apresenta grande percentual de área necrosada, de forma bem definida. Lâmina 2: representativo do grupo controle, apresentando baixo percentual de área necrosada distribuída em volta de agrupamentos de células tumorais, esse tipo de necrose foi denominada de necrose em ilhas. → Indica a região de necrose (área com coloração rosada mais clara)

O infiltrado inflamatório foi classificado em ausente (A), discreto (D), moderado (M) ou intenso (I). Todos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório de forma discreto ou moderado, algumas lâminas apresentaram uma quantidade exacerbada de infiltrado, porém, na classificação de cada grupo elas não se sobressaíram. Para os grupos C, HS, HM, PLGA HS o infiltrado inflamatório peritumoral se comportou de forma homogênea ao infiltrado inflamatório intratumoral, sendo moderado nos grupos HS, HM e PLGA HS e discreto no grupo controle e no grupo tratado com PLGA. Já nos outros grupos a intensidade do infiltrado peritumoral não foi igual ao infiltrado intratumoral, enquanto os grupos envolvendo a utilização de macrófago apresentaram maior concentração de infiltrado na região intratumoral, o grupo tratado com PLGA HM

apresentou maior concentração de infiltrado inflamatório na região peritumoral do que na região intratumoral (Figura 17).

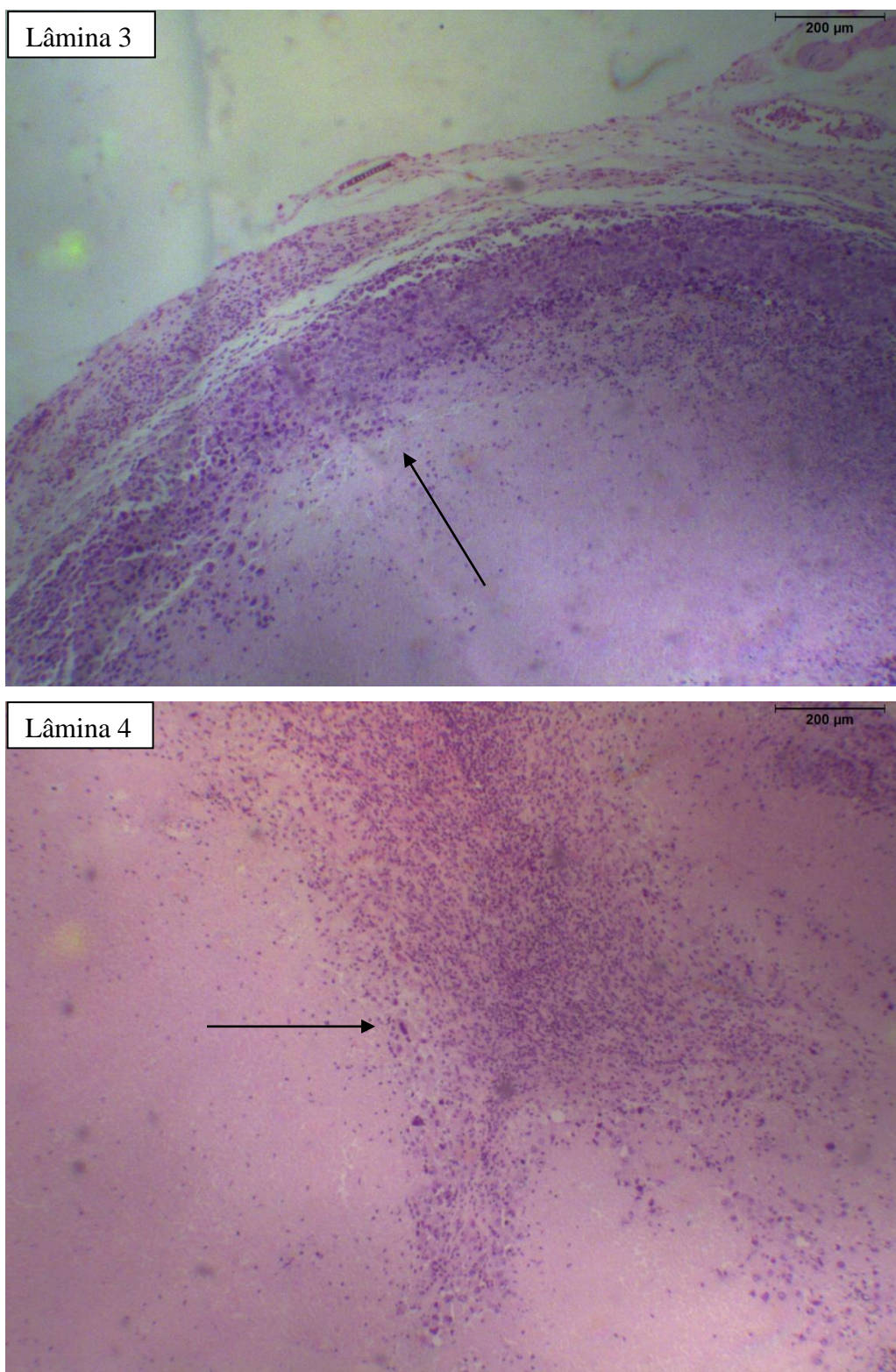


Figura 17: Infiltrado inflamatório. Aumento de 20x. Lâmina 3: infiltrado inflamatório peritumoral moderado. Lâmina 4: infiltrado inflamatório intratumoral moderado.
→ Indica infiltrado inflamatório

O tipo celular predominante das células tumorais de S180 em todos os grupos apresentou características de células ovóides com núcleo vesiculoso, com a presença de células com variação de tamanho (anisocitose), forma e característica do núcleo (pleomorfismo), essas células tendiam para o formato poliédrico com núcleo hipercromático. O pleomorfismo foi classificado em ausente, discreta, moderada e acentuada, de acordo com a quantidade de células poliédricas e hipercromáticas presentes em cada lâmina. Apenas os grupos tratados com PLGA, PLGA HS e o grupo controle apresentaram pleomorfismo discreto, ou seja, poucas células poliédricas com núcleo hipercromático, os outros grupos foram classificados com pleomorfismo moderado. Cortes histológicos dos tumores que apresentaram um percentual de área necrótica próximo de 100% apresentavam todas as células tumorais remanescentes com o formato poliédrico e núcleo hipercromático (Figura 18).

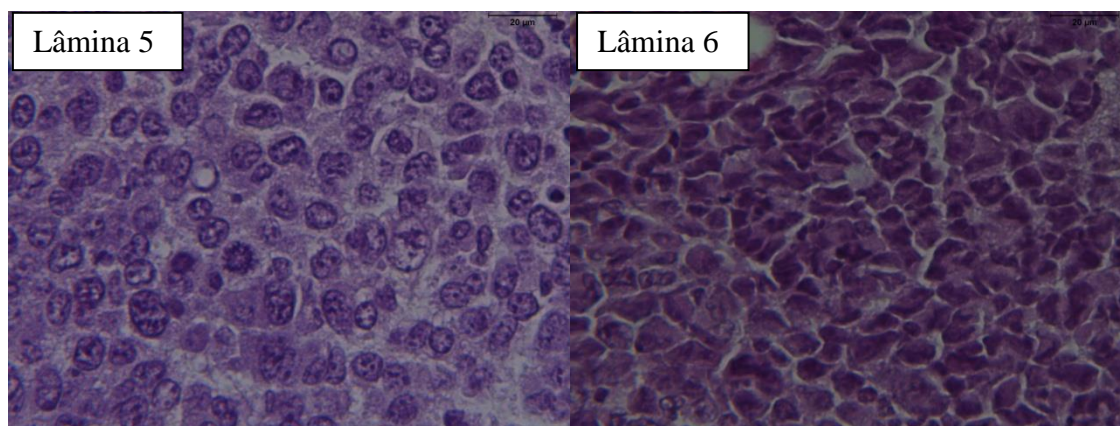


Figura 18: Células tumorais predominante após o tratamento. Aumento de 40x
Lâmina 5: apresenta apenas células ovóides vesiculosa Lâmina 6: apresenta apenas células tumorais poliédricas e hipercromática.

A proliferação da atividade mitótica do tumor é estimada pelo número de mitoses na área de 2mm^2 , o qual corresponde a 10 campos microscópicos de luz em uma ampliação de 40x, a quantidade de mitoses presente nesses 10 campos refere-se ao índice de atividade mitótica (Veta et al. 2015). Esse índice foi calculado para cada lâmina considerando mitoses típicas e atípicas, posteriormente foi feito a média para determinar a atividade mitótica de cada grupo tratado. Os grupos controle e PLGA HS foram os grupos que apresentaram alta atividade mitótica, o grupo com menor atividade mitótica foi o grupo tratado com PLGA HM, os outros grupos também apresentaram um índice baixo. Os grupos que apresentaram os menores índices de atividade mitótica (HM, PLGA

HM, Mo PLGA, Mo PLGA HM) foram aqueles que possuíam grau de anisocitose moderado, e elevado percentual de área necrótica (Figura 19).

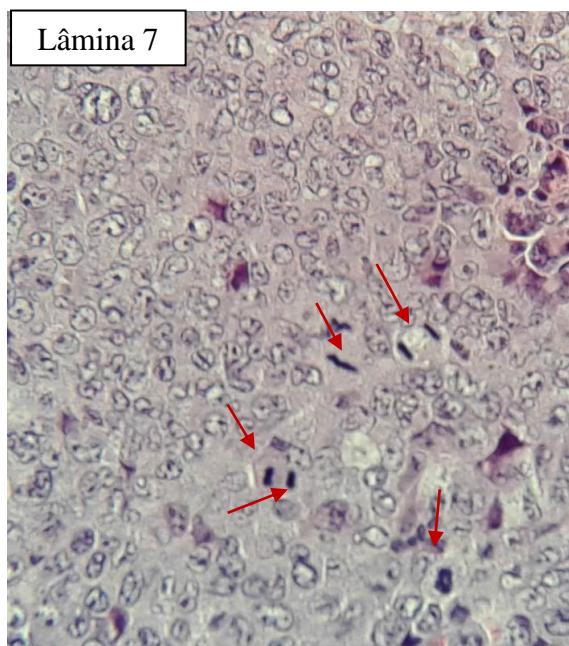


Figura 19: Células em mitose. → Indica células em mitose. Lâmina 7: representa um campo em aumento de 40x onde foi feita a contagem de células em mitose, este campo apresenta sete células nessa fase.

A angiogênese é um processo resultado da liberação local de algumas proteínas com ação estimuladora para o desenvolvimento vascular. O crescimento de tumores sólidos depende da sua capacidade de adquirir, dentre outras coisas, suprimento sanguíneo adequado. As células tumorais não sobrevivem se perdem a capacidade de receber oxigênio e nutrientes, necessitando também de uma forma para eliminar seus catabólitos. A neovascularização é capaz de resolver esses problemas, permitindo que o tumor tenha sua própria rede vascular, mantendo os nutrientes necessários para um crescimento acelerado.

A neovascularização (Figura 20) após o tratamento se mostrou moderada em praticamente todos os grupos, com exceção dos grupos tratados com PLGA e PLGA HM, nestes grupos a quantidade de vasos apresentou-se de forma discreta, presentes em pouca quantidade e em poucas regiões.

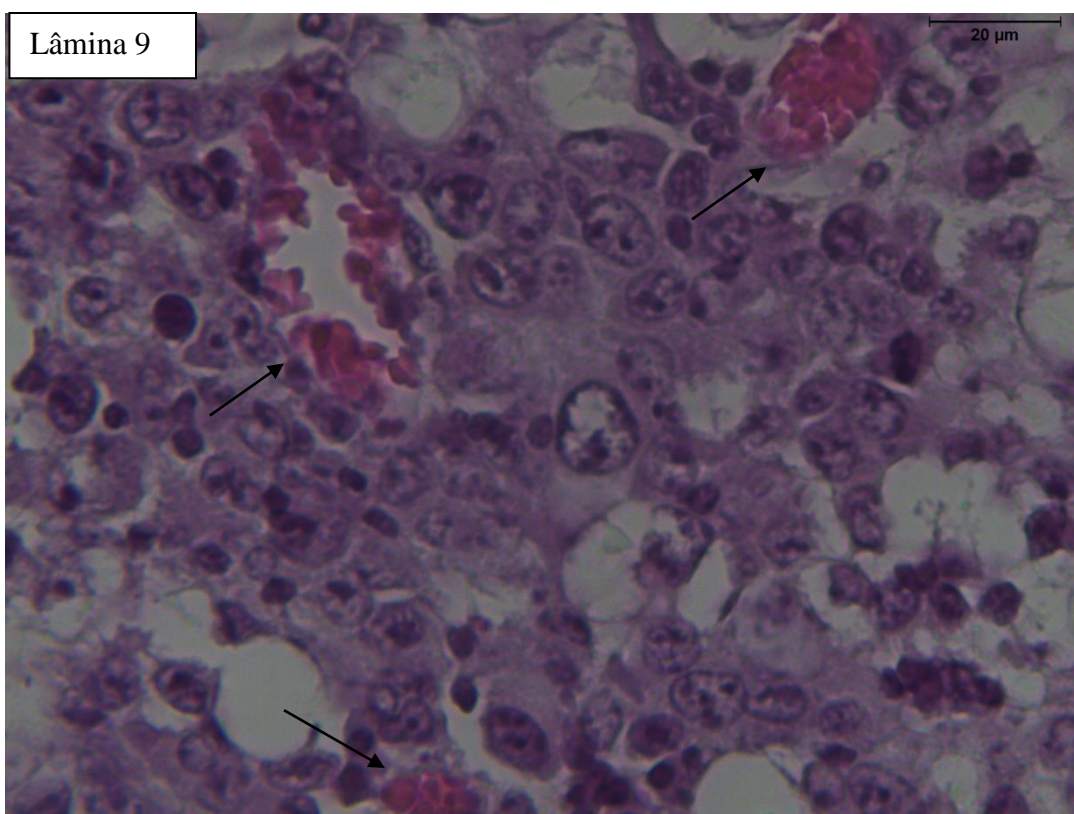
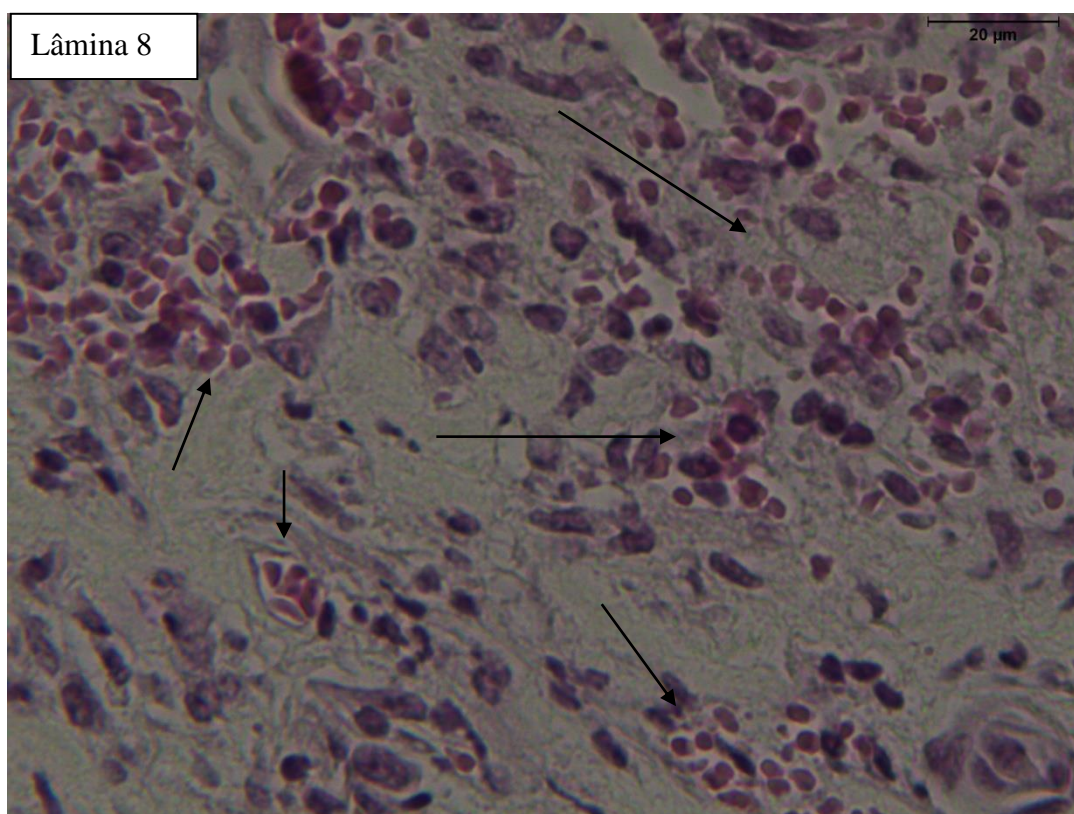


Figura 20: Neovascularização. Aumento de 20x. Lâmina 8 e 9 apresentam neovascularização classificada como moderada. —> Indica os vasos.

A avaliação histopatológica foi realizada em duplo cego por duas vezes, foi feita a análise das lâminas dos animais que participaram do estudo e que sobreviveram

até o fim do experimento, com exceção dos tumores que devido ao seu tamanho reduzido não foi possível realizar o processamento histológico. A Tabela 2 apresenta a quantidade de lâminas analisadas, a média e a moda para todos os itens avaliados, de acordo com o tratamento de cada grupo,

Tabela 2: Avaliação histopatológica.

ntos	Qtd	Necrose		Infiltrado					
		% área	Tipo	Peri	Intra	Tipo celular	Pleo	Mit.	Neov
Controle	4	34%	ilha	D	D	Ovóide / ves	D	19	M
HS	6	46%	definida	M	M	Ovóide / ves	M	9	M
HM	4	58%	definida	M	M	Ovóide / ves	M	6	M
PLGA	2	35%	ilha	D	D	Ovóide / ves	D	10	D
PLGA HS	3	40%	ilha	M	M	Ovóide / ves	D	20	M
PLGA HM	5	68%	definida	M	D	Ovóide / ves	M	3	D
Mo	5	40%	ilha	D	M	Ovóide / ves	M	8	M
Mo PLGA	7	61%	ilha	D	M	Ovóide / ves	M	6	M
Mo PLGA HM	5	61%	definida	D	M	Ovóide / ves	M	4	M

Peri: peritumoral; Intra: intratumoral; D: discreto; M: moderado; Anisoc.: anisocitose Neov.: neovascularização;

Na análise dos resultados da avaliação histopatológica, em busca de determinar se há diferença entre os grupos, não foi possível realizar a análise estatística, pela reduzida quantidade de lâminas em alguns grupos. .

6 DISCUSSÃO

Sistemas poliméricos capazes de liberar princípios ativos ao longo de um período prolongado de tempo têm sido estudados há mais de quarenta anos na esperança de diminuir a frequência de administração e aumentar a eficácia dos tratamentos. Nanopartículas possuem muitas propriedades vitais, como biocompatibilidade, compatibilidade com drogas e uma cinética de degradação própria (Sharma et al. 2015). Para a preparação de um sistema nanoestruturado de entrega de drogas, uma variedade de polímeros tem sido investigados, mas o copolímero de PLGA tem sido largamente usado nesse contexto. Ele é o polímero mais comum em uso com registros de longa data para aplicações biomédicas. A escolha desse polímero para a síntese das nanopartículas do presente trabalho se justifica pela sua aprovação para a utilização em humanos pela FDA, além das muitas propriedades atrativas, tais como liberação controlada, baixa citotoxicidade e biocompatibilidade com tecidos e células (Jain 2000; Pagels & Prud'homme 2015).

Os requisitos fundamentais de sistemas de administração à base de nanopartículas para uma otimização terapêutica, incluem restrição de tamanho, propriedades da superfície, alta eficiência de encapsulação, e um perfil de liberação apropriado. A caracterização é um pré-requisito para se entender as propriedades das nanopartículas, para determinar alguns parâmetros, utilizamos a técnica de espalhamento dinâmica da luz. O tamanho foi o principal parâmetro analisado, o qual ajuda a determinar a eficácia das nanopartículas em atingir o sítio alvo. Pode-se distinguir nanopartículas de micropartículas, nanopartículas tem tamanhos inferiores a 400 nm, de modo que elas tem o potencial para entrar no microambiente tumoral pelo efeito do aumento da permeabilidade e retenção dos vasos no interior do tumor, as micropartículas possuem tamanhos entre 1 e 100 μM (Pagel & Prud'homme 2015). Todas as formulações feitas para os tratamentos dos animais que envolviam PLGA, o tamanho sempre foi inferior a 400 nm, logo, são consideradas nanopartículas. As medidas de índice de polidispersão (PDI), o qual representa o quanto as nanopartículas estão variando de tamanho, mostraram valores dentro dos limites aceitáveis, ou seja $> 0,05$ e $< 0,7$. Tanto o hidróxido de alumínio Sigma quanto o manipulado foram eficientemente encapsulados. Esses resultados evidenciam que as nanopartículas utilizadas nesse trabalho estavam dentro dos padrões aceitáveis para a utilização *in vivo*.

A citotoxicidade dos tratamentos envolvendo adjuvantes e nanopartículas foi mensurada pelo método MTT. Os tratamentos nas concentrações testadas não exibiram nenhuma citotoxicidade, indicando que há uma biocompatibilidade aceitável para aplicações *in vivo* (Mundargi et al. 2008). O hidróxido de alumínio não possui um efeito tóxico para as células tumorais, ou seja, a resolução tumoral é decorrente de uma ação indireta do hidróxido de alumínio, relacionado com uma modulação do sistema imune, e não por ação citotóxica direta dos mesmos em contato com as células após a inoculação.

Para elucidação do mecanismo imune envolvido na imunoterapia mediada por hidróxido de alumínio, os tratamentos foram realizados utilizando este adjuvante livre ou associado a nanopartículas de PLGA, com e sem macrófagos previamente ativados pela via clássica, em camundongos Balb/c contendo na região cervico-dorsal um tumor de Sarcoma 180 (S180).

O tumor S180 é um tumor originado de camundongos e representa uma das linhagens celulares mais frequentemente usadas em pesquisa direcionada ao esclarecimento de ações antitumorais *in vivo* (Lee et al. 2003). Cresce rapidamente na maioria dos animais (>90%) em que são inoculadas, mas regride em 8-10%, podendo esta taxa de regressão ser aumentada por tratamento com certos produtos químicos ou biológicos (Assef et al. 2002). Em nosso trabalho, essa regressão espontânea tornou necessária a formação dos grupos contendo camundongos portadores de tumor grande, médio e pequeno, sendo essa redistribuição a solução mais adequada para a obtenção de grupos mais homogêneos.

O S180 ao ser inoculado pela via subcutânea na região cervico-dorsal dos camundongos, ocasiona o desenvolvimento de uma forma sólida do tumor que se torna palpável nos primeiros 15 dias após a inoculação, se o inóculo for feito muito superficial ocorre a ulceração do local de forma progressiva com o aumento da massa tumoral, e se for feito muito profundo, o tumor apresenta características infiltrativas ocasionando uma invasão tumoral na medula espinhal, caracterizada por um quadro de paralisia da patas posteriores, isso foi constatado no momento da retirada do tumor. Camundongos que apresentaram grandes debilidades foram sacrificados antes do fim do tratamento, tendo em vista o potencial sofrimento que isso causaria, e alguns camundongos morreram espontaneamente antes de serem eutanasiados. O total de perda maior por grupo foi de 30%, essa perda não comprometeu os resultados, pois acometeu grupos aos quais os

tratamentos já haviam sido testados em experimentos anteriormente (hidróxido livre), seguindo o mesmo protocolo e realizado por integrantes do nosso laboratório (Patente BR INPI 10200130175315. 2013). Os grupos que envolviam a utilização de PLGA, não perderam nenhum animal durante o experimento, isso torna os resultados confiáveis, visto que as maiores alterações se deram em tais grupos.

Estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que o hidróxido de alumínio possui um efeito na resolução tumoral dose dependente, indicando que em baixa ou alta concentração ele não age de forma eficiente, a concentração ideal verificada para ter um melhor resultado tumoricida é 180 µg por camundongo (Santos et al. 2012). Pela propriedade de liberar lenta e gradualmente as substâncias (Commandeur et al. 2006), as nanopartículas de PLGA protegem contra a dispersão descontrolada das substâncias que elas carregam (Waeckerle-Men et al. 2006; Heit et al. 2007; Nikitzuk 2013). Estas nanopartículas são fagocitadas naturalmente *in vivo* por macrófagos e células apresentadoras de antígenos, facilitando o desenvolvimento da imunidade adaptativa e potencializando a resposta imune aos antígenos que carregam (Newman et al. 2002; Hamdy et al. 2011). O uso de PLGA como um sistema de carreamento para o hidróxido de alumínio teve como objetivo verificar se há alguma melhora na resolução tumoral, pela diminuição da dispersão do adjuvante no meio. Verificou-se que a sua utilização potencializa a resolução tumoral, impedindo o crescimento e regredindo a massa tumoral já existente, além de proporcionar uma melhora no aspecto físico do animal.

Parâmetros ponderais, como por exemplo, o peso dos tumores é de extrema valia para monitorar os efeitos de tratamento de drogas anti-neoplásicas (Bezerra et al 2006). Adotamos como variável de análise entre grupos, apenas o peso do tumor, por esse ter se constituído como o parâmetro mais representativo, dado ao fato dos tumores terem apresentado crescimento irregular em diferentes dimensões. Para a determinação da massa tumoral (g) após a dissecação dos tumores com auxílio de um bisturi, estes foram pesados utilizando-se uma balança de precisão e os resultados foram analisados. O melhor tratamento observado para a diminuição da massa tumoral, foi com a administração de PLGA HM, onde não houve nenhuma perda de animais e a maioria deles conseguiu regredir a massa tumoral totalmente. Porém, este tratamento não diferiu em níveis estatísticos da administração de PLGA HS, PLGA e HM. A falta de diferença

estatística se deve ao pequeno número de animais por grupo e pela pequena variação que há entre um tumor pequeno para aqueles que regrediram totalmente.

Os resultados de experimentos anteriores realizados em nosso laboratório corroboram com os resultados encontrados nesse trabalho. A comparação de tratamentos, feita anteriormente, utilizando macrófagos ativados *in vitro* com macrófagos ativados *in vitro* associados ao adjuvante hidróxido de alumínio livre não apresentaram diferença na redução tumoral entre eles, ou seja, o hidróxido de alumínio não interfere na redução do crescimento tumoral quando associado a macrófagos previamente ativados *in vitro*, mas é capaz de reduzir a massa tumoral quando administrados sem estas células (Freitas et al. 2010). A união desses resultados com a comparação entre os tratamentos envolvendo macrófagos ativados *in vitro* associados com hidróxido de alumínio nanoestruturado e a administração de macrófagos com apenas nanopartículas vazias, onde também não foi encontrada diferença entre esses tratamentos, reforçam a hipótese de que o hidróxido de alumínio pode estar induzindo a polarização de macrófagos no fenótipo M1, reconhecidamente antitumoral e com capacidade de causar a destruição do tecido tumoral (Mantovani et al. 2002), já que em ambos os casos o hidróxido de alumínio na presença de macrófagos ativados, não induzem nenhuma melhora na resolução tumoral. Em contrapartida, as nanopartículas de PLGA parecem estar ativando outros mecanismos não relacionados aos macrófagos associado a tumores (TAMs), já que apresentam uma melhor atividade na redução tumoral quando comparadas ao tratamento com Mo.

Pela observação da redução tumoral quando as nanopartículas de PLGA são inoculadas vazias, percebe-se que elas possuem uma ação antitumoral própria, o que está em concordância com os estudos da literatura que mostram que essas nanopartículas, além de serem eficazes sistemas de transporte de substâncias, também possuem atividade adjuvante, potencializando outros fenômenos antitumorais (O'hagan & Singh 2003; Jiang 2005). Muitos estudos demonstram a efetividade do sistema de carreamento de antígeno pelo PLGA (Hamdy et al. 2011; Cao et al. 2014), mas poucos elucidam os mecanismos imunológicos de ação do PLGA em meio ao microambiente tumoral (Fifis et al. 2004; Heo et al. 2014).

O tumor leva à indução da tolerância imunológica através de mediadores tais como IL-4, IL-6, IL-10, M-CSF, TGF e PGE2 que estimulam uma resposta supressora (Elgert et al. 1998). Massas tumorais podem conter linfócitos reguladores, células

supressoras de derivados mielóide, macrófagos alternativamente ativados e células dendríticas imaturas (Kerkar et al. 2012). Vicari et al. (2002) observou que os macrófagos ativados, mesmo distante do local do tumor poderiam produzir IL-10 e PGE2, e, por conseguinte, contribuir para a imunossupressão geral do hospedeiro.

O propósito da imunoterapia na resolução tumoral é estimular o sistema imune para que ele consiga reverter a tolerância imunológica e eliminar as células neoplásicas com redução dos danos para o tecido sadio (Palucka & Banchereau 2012; Singh & Bhaskar 2014). Para verificarmos o efeito de nosso modelo imunoterápico de forma sistêmica após o tratamento de camundongos portadores de tumores S180, foram dosadas algumas citocinas pró-inflamatórias e imunossupressoras no soro dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. Os resultados mostraram que o grupo tratado com PLGA HM foi o que mais apresentou alterações nos níveis sistêmicos dessas citocinas, coincidentemente este foi o grupo que apresentou os melhores resultados na resolução do tumor, evidenciando que o tratamento envolvendo PLGA e hidróxido de alumínio manipulado age de forma indireta, alterando o padrão imunológico do camundongo.

Outro ponto importante a ser observado é a comparação entre os tratamentos envolvendo hidróxido de alumínio livre. Experimentos anteriores (dados não publicados) indicaram uma maior eficiência de resolução tumoral em animais tratados com hidróxido de alumínio da marca Teuto em comparação com outras marcas de hidróxido de alumínio. Os resultados do presente trabalho corroboram com a hipótese de que há uma diferença entre as formulações, visto que o hidróxido de alumínio manipulado (com a mesma composição que o da Teuto) em comparação com hidróxido de alumínio da marca Sigma apresentou diferenças da modulação do sistema imune a níveis sistêmico.

A avaliação histopatológica caracterizando itens quantitativos e qualitativos é importante não só para aplicações clínicas, mas também para aplicações de pesquisa (Irshad et al. 2014). Através da técnica de coloração Hematoxilina e Eosina (H & E) é possível explorar as diferenças nas estruturas basófilas e eosinófilas nos cortes de tecido para quantificar os núcleos e outras estruturas relacionadas com a evolução do câncer (Avwioro 2011). De uma forma geral não houve diferenças entre os grupos na avaliação histopatológica. Em algumas lâminas os parâmetros analisados foram acentuados e em outras foram ausentes, porém na análise global, os parâmetros ficaram em um padrão intermediários. Em tumores que possuíam peso bem próximo de zero, a avaliação

histopatológica permitiu averiguar que a massa tumoral possuía o percentual da área de necrose bem próxima a 100%, com pouquíssimas células tumorais e com o índice de atividade mitótica sendo zero.

O infiltrado inflamatório em diversos tipos de câncer tem sido relacionado com a sobrevida do paciente, a importância do estroma e infiltrado de células na progressão do tumor é bem destacado. A presença de linfócitos infiltrados no tumor tem sido demonstrada com correlações positivas na sobrevida e com resultados positivos para imunoterapias (Chasalow et al. 2012). Na análise histopatológica verificamos a presença de infiltrado inflamatório de forma moderada, porém não é possível identificar quais subpopulações de células imunes estão presentes em maior número. Para obter essa informação seria necessário a marcação celular e análise em citometria de fluxo, visto que algumas células imunes suprimem o crescimento do tumor por matar ou inibir a proliferação de células tumorais, enquanto que outros tipos de células imunes podem promover a progressão tumoral (Fredman et al. 2011).

A proliferação de células ocorre através do processo que pode ser dividido em algumas fases: G0 (repouso), G1 (primeira fase), S (fase de síntese), G2 (segunda fase) e M (fase mitótica), depois da fase mitótica, as células podem entrar na fase G0 ou G1 e repetir o processo. As células que estão na fase mitótica podem ser visualmente determinadas sob o microscópio pela característica morfológica. Os cortes histológicos de câncer corados com HE é a forma mais antiga e ainda utilizada de avaliação da proliferação de tumores, a quantidade de mitose é rotineiramente realizada no laboratório de patologia em todo mundo e é amplamente utilizado como fator de prognóstico (Veta et al. 2015, Wald et al. 2016). O índice de atividade mitótica foi baixo para a maioria dos grupos, sendo alta apenas para o grupo controle e para o tratamento com PLGA. Logo, os tratamentos empregados estão conseguindo reduzir a atividade mitótica das células tumorais o que justifica a redução da massa tumoral.

Da mesma forma, o pleomorfismo nuclear tem valor prognóstico para a classificação de câncer, e por conta disso, avaliamos o tipo celular predominante. De acordo com Zuckerberg (1973), histologicamente o S180 apresenta uma massa sólida formada por células poliédricas, altamente pleomórficas, de citoplasma basófilo e núcleo central, arranjadas em ninhos ou cordões que são circundados por estroma conjuntivo vascularizado, com frequente necrose central. Porém, a característica principal das

células de S180 encontradas no grupo controle foram células ovóides com núcleo vesiculoso. Em muitas lâminas foram encontradas células poliédricas hipercromáticas com citoplasma basófilo, porém em quantidade inferior ao outro tipo celular. Com a administração dos tratamentos esse pleomorfismo acentuou-se, provocando um aumento de células poliédricas hipercromáticas na massa tumoral.

O tratamento com PLGA e PLGA HM promoveu uma redução na neovascularização dos tumores, apresentando vasos de uma forma discreta, enquanto que os outros tratamentos apresentaram vasos em uma intensidade moderada. A diminuição dos vasos é um ponto importante para a regressão tumoral, há muitas décadas foi percebido que os tumores apresentam uma vascularização bastante proeminente em relação aos tecidos normais, a presença desta vascularização exacerbada é uma condição essencial para que ocorra o desenvolvimento neoplásico (Samples et al. 2013). Vários pesquisadores procuram por terapias antitumorais que tenham como alvo impedir a neovascularização, diferentes drogas estão sob investigação para serem utilizadas como terapias antiangiogênicas para o tratamento de tumores sólidos (Collet et al. 2016).

Assim sendo, nosso estudo destaca importantes ações dos adjuvantes utilizados nos diversos testes no microambiente tumoral contribuindo para a resolução deste. Os resultados são promissores, pois dão margem a inúmeras especulações e investigações na tentativa de elucidação da influência do hidróxido de alumínio no sistema imune para o desenvolvimento de um futuro método imunoterapêutico alternativo sem tantos efeitos colaterais como os tratamentos já existentes.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Este trabalho alcançou seus objetivos, as nanopartículas em blenda polimérica de ácido polilático co glicólico (PLGA) contendo hidróxido de alumínio foram preparadas e caracterizadas, atingindo os parâmetros necessários para a utilização no tratamento do tumor experimental;
- ✓ Os tratamentos propostos não apresentaram uma ação citotóxica contra as células, agindo na regressão tumoral de forma indireta;
- ✓ A regressão do tumor S180 em sistemas vivos foi acompanhada por um intervalo de 21 dias, houve a regressão tumoral em todos os tratamentos testados;
- ✓ Ao investigar a atividade de adjuvantes formulados em sistemas poliméricos na regressão do tumor experimental e seus efeitos sobre a resposta imune em camundongos através da dosagem de citocinas sistêmicas, os resultados demonstraram alterações em citocinas pró-inflamatória e imunossupressoras, reforçando a hipótese de que o hidróxido de alumínio está agindo na manipulação do sistema imune, porém, apenas com a avaliação sistêmica das citocinas não é possível fazer grandes correlações com os mecanismos envolvidos na resolução tumoral;
- ✓ A utilização de um sistema de carreamento para a entrega do hidróxido de alumínio potencializou a ação tumoricida tanto para o hidróxido de alumínio Sigma quanto para o hidróxido de alumínio manipulado.

REFERÊNCIAS

- Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanc P, Kjaer S, Feest C. Factin is an evolutionarily conserved damage associated molecular pattern recognized by DNGR-1, receptor for dead cells. *Immunity* 36: 635–645, 2012.
- Aimanianda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Novel cellular and molecular mechanism of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol. Sci.* 30: 287–295, 2009.
- Alexis F, Pridgen EM, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.*: 55–86, 2010.
- Amaral AC, Marques AF, Muñoz JE, Bocca AL, Simioni AR, Tedesco AC, Morais PC, Travassos LR, Tabora CP, Felipe MSS. Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. *British Journal of Pharmacology* 159: 1126-1132, 2010.
- Arvizo RR, Miranda OR, Thompson MA, Pabelick CM, Bhattacharya R, Robertson JD, Rotello VM, Prakash YS, and Mukherjee, P. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano Lett.* 10: 2543-2548, 2010.
- Assef MLM, Carneiro-Leão AM, Moretão MP et al. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an adglucan from the lichen *Ramalina celastri*. *Brazilian Journal of Morphological Science* 19(2): 49–54, 2002
- Avwioro G. Histochemical uses of haematoxylin – a review. *J Pharm Clin Sci(JPCS)* 1: 24–34, 2011
- Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M. Tumour derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunology Letters* 113 (2): 76-82, 2007.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7 (3): 211–217, 2005.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767–811, 2000.
- Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminumsaltsinvaccines– US perspective. *Vaccine* 20 (3): 18–23, 2002.
- Bezerra DP, Castro FO, Alves APNN, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. *Braz J. Med. Biol. Res.* 39 (6): 801-807, 2006.

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 132 (5): 1133-45, 2013.

Brewer JM & Pollock KG. Adjuvant induced Th2- and Th1-dominated immune responses in vaccination. In: Kaufmann SH, editor. Novel vaccination strategies. Weinheim:Wiley-VCH, 2004.

Byrne JD, Betancourt T., Brannon-Peppas L, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 1615–1626, 2008.

Casey SC, Amedei A, Aquilano K, Azmi AS, Benencia F, Bhakta D, Bilslund AE, Boosani CS, Chen S, Ciriolo MR, Crawford S, Fujii H, Georgakilas AG, Guha G, Halicka D, Helferich WG, Heneberg P, Honoki K, Keith WN, Kerkar SP, Mohammed SI, Niccolai E, Nowsheen S, Vasantha Rupasinghe HP, Samadi A, Singh N, Talib WH, Venkateswaran V, Whelan RL, Yang X, Felsher DW. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 10: 1044-79, 2015

Casey SC, Li Y, Fan AC, Felsher DW. Oncogene withdrawal engages the immune system to induce sustained cancer regression. *J Immunother Cancer* 2: 24, 2014.

Cao B, Yang M, Zhu Y, Qu X, Mao C. Stem Cells Loaded with Nanoparticles as a Drug Carrier for In Vivo Breast Cancer Therapy. *Adv. Mater.* DOI: 10.1002/adma.201401550, 2014.

Chakrabarti A, Talukdar D, Pal A, Ray M. Immunodulation of macrophages by methylglyoxal conjugated with chitosan nanoparticles against Sarcoma-180 tumor in mice. *Cellular Immunology*, 287: 27-37, 2014.

Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, Alaparthi S, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab, *Cancer Immunol.* 61: 1019–1031, 2012.

Cho EC, Xie J, Wurm PA, Xia Y. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Lett.* 9: 1080-1084, 2009.

Clawson, C, Huang CT, Futralan D, Seible DM, Saenz R, Larsson M, Ma W, Boris M. Delivery of a peptide via poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles enhances its dendritic cell stimulatory capacity. *Nanomedicine* 6(5): 651–661. 2010.

Collet G, Szade K, Nowak W, Klimkiewicz K, et al. Endothelial precursor cell-based therapy to target the pathologic angiogenesis and compensate tumor hypoxia. *Cancer letters* 370 (2): 345-357, 2016.

Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33: 492–503, 2010.

Commandeur S, Van-Beusekom HMM, Van-Der-Giessen WJ. Polymers, Drug Release, and Drug-Eluting Stents. *Jorn. Intern. Cardio. 19*: 500-5006, 2006.

Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science. 339(6117)*: 286-91, 2013.

Cunningham AF, Serre K, Toellner KM, Khan M, Alexander J, Brombacher F. Pinpointing IL-4 independent acquisition and IL-4 influenced maintenance of Th2 activity by CD4 T cells. *Eur.J.Immunol. 34*: 686–694, 2004.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood. 112(4)*: 935-45, 2008.

Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Breton AL, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release. 161*: 505-22, 2012.

Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. of contr. Release 148*: 135 – 46, 2010.

Davis M, Chen Z, Shin D. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature rev 7*: 771 – 781, 2008

De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur J Immunol 38*: 2068–2071, 2008.

De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell 23(3)*: 277-86, 2013.

Demento SL, Eisenbarth SC, Foellmer HG, Platt C, Caplan MJ, Mark Saltzman W, Mellman I, Ledizet M, Fikrig E, Flavell RA, Fahmy TM. Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine. 18:27(23)*: 3013-21, 2009.

Ding Y, Li S, Nie G. Nanotechnological strategies for therapeutic targeting of tumor vasculature. *Nanomed. 8*: 1209 – 22, 2013.

Driessens G, Hamdane M, Cool V, Velu T, Bruyns C. Highly successful therapeutic vaccinations combining dendritic cells and tumor cells secreting granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Res.64(22)*: 8435-42, 2004.

Dubensky Jr TW, Reed SG. Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in Immunology 22*: 155-161, 2010.

Eifan AO, Shamji MH, Durham SR. Long term clinical and immunological effects of allergen immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.11*: 586–593, 2011.

Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immune stimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453: 1122–1126, 2008.

Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol.* 64(3): 275-90. 1998

Facchini JM. Atividade antitumoral de frações polissacarídicas de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 sobre tumor ascítico de Ehrlich e Sarcoma 180. Joiville. [Dissertação de Mestrado em Saúde e Meio ambiente – UNIVILLE], 2011.

Farong Y, Mcguire PM, Li R, Wang R. Effects of Hydrocotyle sibthorpioides extract on transplanted tumors and immune function in mice. *Phytomedicine* 14 (2-3): 166–171, 2007.

Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest.* 114 (9): 1209-17. 2004

Ferlay J, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136 (5): 359-86, 2014.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase 1, 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year..

Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF, Plebanski M. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol.* 173(5): 3148-54, 2004.

Franchi L and Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxidemediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 38: 2085–2089, 2008.

Francis JN, and Durham SR. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr.Opin.Allergy Clin. Immunol.* 4: 543–548, 2004.

Frazer IH, Leggatt GR, Mattarollo SR. Prevention and treatment of papillomavirus – related cancers through immunization. *Annu.Rev.Immunol.* 29: 111–138, 2011.

Freitas DM, Santos DF, Oliveira FA, Verissimo ECB, Crespo AMC, Oliveira CRDE, Silveira LA. Participação de Adjuvantes e Macrófagos Ativado in vitro na Resolução de Tumor Experimental. Prêmios Santander Universidades 2010- suplemento editora Abril, São Paulo, 18 - 18, 2010.

Fridman WH, Galon J, Pages F, Tartour E, Sautés-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 71: 5601 – 5605, 2011.

Fricke I, Gabrilovich DI. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol Invest* 35: 459-83, 2006.

Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 14, 1014–1022, 2013.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5(12): 953-64, 2005.

Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Review Immunology* 3 (1): 23-35, 2006.

Gottfried E, Kreuz M, Mackensen A. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19: 65-77, 2008

Guimarães LE, Bakera B, Perriconeb C, Shoenfeld Y. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacological Research* 100: 190-209, 2015.

Hackstein H, Morelli AE, Thomson AW. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends in Immun* 22(8): 437-442, 2001 Hamdy S, Haddadi A, Hung RW, Lavasanifar A. Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations. *Adv Drug Deliv Rev.*63(10-11):943-55, 2011.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–74, 2011

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

Heit, A., Schmitz, F., Haas, T., Busch, D. H., and Wagner, H. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur. J. Immunol.* 37: 2063–2074, 2007.

Herr HW, and Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J urol.* 179 (1): 53-56, 2008

Heo MB, Cho MY, Lim YT. Polymer nanoparticles for enhanced immune response: combined delivery of tumor antigen and small interference RNA for immunosuppressive gene to dendritic cells. *Acta biomaterialia.*10: 2169 – 76, 2014.

Hoang B, Ernesting MJ, Murakami M, Undzys E, Li SD. Docetaxel-Carboxymethylcellulose Nanoparticles Display Enhanced Anti-tumor Activity in Murine Models of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Int. Journ of Pharm.* 471: 224-233, 2014.

HogenEsch H. Mechanism of Immunopotiation and Safety of Aluminum Adjuvants. *Front Immunol.* 3: 406, 2013.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat.Immunol.* 9: 847–856, 2008.

Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, and He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials* 31: 438-448, 2010

Hunter MM, Wang A, Parhar KS, Johnston MJ, Van Rooijen N, Beck PL, McKay DM. In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology*.138 (4):1395-405, 2010.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014. disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> acesso em: 24 Abril 2015.

Irshad HAC, Gouaillard ADE, Roux LAC, Racoceanu DB. Multippectral band selection and spatial characterization: application to mitosis detection in breast cancer histopathology. *Computerized Medical Imaging and Graphics* 38: 390–402, 2014.

Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21: 2475–2490, 2000.

Jiang H. The Qa-1 dependent CD8+ T cell mediated regulatory pathway. *Cell Mol Immunol.* 2(3):161-7, 2005.

Johnston Jr., R.B. Monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.* 318: 747-752, 1988.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 192(9): 1213-22, 2000.

Kanapathipillai M, Brock A, Ingber DE. Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment. *Adv. Drug. Delivery Rev* 79-80:107-18, 2014.

Kanneganti TD, Ozören N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Núñez G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature.* 440:233-6, 2006.

Kelderman S, Kvistborg P. Tumor antigens in human cancer control. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1865: 83-89, 2016.

Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ. Targeting the tumor microenvironment. *FrontBiosci* 12: 3468–74, 2007.

Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res* 72: 3125–3130, 2012.

Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J. Med. Microbiol.* 61: 927–934, 2012.

Kool M, Pe'trilli V, Smedt TD, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, and Tschopp J. Cutting Edge: Alum Adjuvant Stimulates Inflammatory Dendritic Cells through Activation of the NALP3 Inflammasome. *J Immunol* 181:3755-3759, 2008.

Kroemer G, Galluzzi L, Zitvogel L. Immunological effects of chemotherapy in spontaneous breast cancers. *Oncoimmunology* 2 (12): 27158, 2013.

Kwissa M, Nakaya HI, Oluoch H, Pulendran B. Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates. *Blood.* 119(9): 2044–2055, 2009.

Lee CF, Chang SY, Hsieh DS, Yu DS. Treatment of bladder carcinomas using recombinant BCG DNA vaccines and electroporative gene immunotherapy. *Cancer Gene Ther*, 11 (3): 194-207, 2004.

Lee YL, Kim HJ, Lee MS, Kim JM, Han JS, Hong EK, Kwon MS, Lee MJ. Oral administration of agaricus blazei (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. *Exp. Anim.* 52(5), 371-375, 2003.

Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-18 release. *J. Immunol.* 178: 5271–5276, 2007.

Lian E, Li J, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, GrzesikXN, Pollard JW. Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Research* 66: 23, 2006.

Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol.* 184(7) : 3964-77, 2010.

Mantovani A & Allavena P .Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical Experimental Immunology* 167 (2): 195-205, 2012.

Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Europe Journal of Immunology* 37 (1): 14-16, 2007.

Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23 (4): 344-346, 2005.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunology* 23 (11): 549-555, 2002.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440(7081): 228-32, 2006.

Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat.Rev.Immunol.* 9: 287–293, 2009.

Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237–241, 2006.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal Immunology* 164: 6166–6173, 2000.

Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol.* 32(6):463-88, 2012.

Morefield GL, Jiang D, Romero-Mendez IZ, Geahlen RL, Hogenesch H, Hem SL. Effect of phosphorylation of ovalbumin on adsorption by aluminum-containing adjuvants and elution upon exposure to interstitial fluid. *Vaccine* 23:1502–6, 2005. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8(12):958-69, 2008.

Mueller M, Schlosser E, Gander B, Groettrup M. Tumor eradication by immunotherapy with biodegradable PLGA microspheres--an alternative to incomplete Freund's adjuvant. *Int J Cancer.* 129(2): 407-16, 2011.

Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D,L lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release:* 125-193, 2008.

Newman KD, Elamanchili P, Kwon GS, Samuel J, Uptake of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo, *J. Biomed. Mater.* 60: 480, 2002.

Nicolete R, dos Santos DF, Faccioli LH. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *Int Immunopharmacol.* 11(10):1557-63, 2011

Nikitczuk KP, Schloss RS, Yarmush ML, Lattime EC. PLGA-polymer encapsulating tumor antigen and CpG DNA administered into the tumor microenvironment elicits a systemic antigen-specific IFN- γ response and enhances survival. *J. cancer ther.* 4: 280-290, 2013.

Novak ML, Koh TJ. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *Am J Pathol.* 183(5):1352-63, 2013.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41(1): 49-61, 2014.

O'Hagan DT. New generation Vaccine Adjuvants. *Encyclopedia of life sciences*: 1-7, 2007.

O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2:727–735, 2003

O'Hagan DT, Singh M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Rev Vaccines*. 2(2):269-83, 2003.

Palucka K, Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *J. Immunity* 39 (1): 38-48, 2013.

Pagels RF, Prud'homme RK. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. *Journal of Controlled Release* 219: 519–535, 2015.

Pollard, J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews in Cancer* 4: 71–78, 2004.

Pollock, K. G. J., K. S. McNeil, J. C. Mottram, R. E. Lyons, J. M. Brewer, P. Scott, G. H. Coombs, and J. Alexander. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *J. Immunol.* 170:1746-1753, 2003.

Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, Olson OC, Quick ML, Huse JT, Teijeiro V, Setty M, Leslie CS, Oei Y, Pedraza A, Zhang J, Brennan CW, Sutton JC, Holland EC, Daniel D, Joyce JA. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* 19(10):1264-72, 2013.

Qi L, Xu Z. vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic Med. Chem. Letters* 16 (16): 4243-4245, 2006.

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1): 39-51, 2010.

Reijke TM, Kurth KH, Sylvester RJ, Hall RR, Brausi M. et al. Bacillus Calmette-Guerin versus epirubicin for primary, secondary or concurrent carcinoma in situ of the bladder: results of a European Organization for the Research and Treatment of Cancer- Genito-Urinary Group Phase III Trial (30906). *J.urol.* 173 (2): 405-409, 2005.

Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu.Rev. Immunol.* 28: 321–342, 2010.

Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 182: 68-79, 2001.

Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Variables influencing interactions of untargeted quantum dot nanoparticles with skin cells and identification of biochemical modulators. *Nano Lett.* 7: 1344-1348, 2007.

Samples JS, Willis M, DeMore NK. Targeting Angiogenesis and the tumor Microenvironment. *Tranlat. Cancer Research fo surgeons*. 22(4): 629-639, 2013

Santos DF, Freitas DM, Oliveira FA, Silveira AL. Diferentes concentrações de hidróxido de alumínio e Freund no tumor experimental. *CONPEEX*, 5970-5984, 2012.

Schijns V, Tartour E, Michalek J, Stathopoulos A, Dobrovolskienè, Strioga MM. Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. *Cytotherapy* 16, 427-439, 2014.

Schliehe C, Redaelli C, Engelhardt S, Fehlings M, Mueller M, van Rooijen N, Thiry M, Hildner K, Weller H, Groettrup M. CD82 Dendritic Cells and Macrophages Cross-Present Poly(D,L-lactate-co-glycolate) Acid Microsphere-Encapsulated Antigen In Vivo. *Journ Immun*, 187: 2112-2121, 2011.

Schlosser E, Mueller M, Fischer S, Basta S, Busch DH, Gander B, Groettrup M. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine* 26: 1626–37, 2008.

Seder RA, and Hill AV. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 406: 793–798, 2000.

Serre K, Benezech C, Desanti G, Bobat S, Toellner KM, Bird R. Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *Plosone* 6: 207-31, 2011.

Sharma S, Parmar A, Kori S, Sandhir R. PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications. *Trends in Analytical Chemistry* : [doi:10.1016/j.trac.2015.06.014](https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.014), 2015.

Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *PNAS* 106: 870–5, 2009.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 122 (3):787-95, 2012.

Silzle T, Kreutz M, Dobler MA, Brockhoff G, Knuechel R, Kunz-Schughart LA. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Europe Journal of Immunology* 33 (5): 1311–1320, 2003.

Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A, Weiss JM, Wlaschek M, Sunderkötter C, Scharffetter-Kochanek K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest*. 121(3): 985-97, 2011.

Sinhá P, Clements VK, Miller S, Ostrand-Rosenberg S. Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 1137–1142, 2005.

Singh MS, Bhaskar S. Nanocarrier-based immunotherapy in cancer management and research. *ImmunoTargets and Therapy* 3: 121–134, 2014.

Sokolovska A, Hem SL, Esch HH. Activation of dendritic cells and induction of CD4(C) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 25: 4575–4585, 2007.

Spazierer D, Skvara H, Dawid M, Fallahi N, Gruber K, Rose K. T helper 2 biased denovo immune response to Key hole Limpet Hemocyanin in humans. *Clin. Exp. Allergy* 39: 999–1008, 2009.

Su S, Liu Q, Chen J, Chen J, Chen F, He C, Huang D, Wu W, Lin L, Huang W, Zhang J, Cui X, Zheng F, Li H, Yao H, Su F, Song E. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell* 25(5): 605-20, 2014.

Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect Immun* 69:1151–9, 2001.

Van Kempen LC, Ruiter DJ, Van Muijen GN, Coussens LM. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol* 82: 539–48. 2003

Veta M, Diest PJ, Willems SM, Wang H, Madabhushi A, Roa AC, Gonzalez F, Larsen ABL, Vestergaard JS. et al. Assessment of algorithms for mitosis detection in breast cancer histopathology images. *Medical Image Analysis* 20: 237–248, 2015.

Vicari AP, Caux C, Trinchieri G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol.* 12(1):33-42, 2002

Waeckerle-Men Y, Allmen EU, Gander B, Scandella E, Schlosser E, Schmidtke G, Merkle HP, and M. Groettrup. Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells. *Vaccine* 24: 1847–1857, 2006.

Wald N, Bordry N, Foukas PG, Speiser DE. Identification of melanoma cells and lymphocyte subpopulations in lymph node metastases by FTIR imaging histopathology. *Goormaghtigha Biochimica et Biophysica Acta* 1862: 202–212, 2016

Wherrett DK, Bundy B, Becker DJ, Dimeglio LkA, Gitelman SE, Goland R. Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent on set type1diabetes: and omised double-blind trial. *Lancet* 378: 319–327, 2011.

Xu D, Trajkovic V, Hunter D, Leung BP, Schulz K, Gracie JA, McInnes IB, Liew FY. IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur. J. Immunol.* 30: 3147–3156, 2000.

Yu P, Rowley DA, Fu YX, Schreiber H. The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors. *Curr Opin Immunol* 18: 226–31, 2006.

Zhang JG, Czabotar PE, Policheni AN, Caminschi I, Wan SS. The dendritic cell receptor Clec 9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* 36: 646–657, 2012.

Zuckerberg, C. Ultrastructure of sarcoma 180. *Cancer research* 33: 2278-2282, 1973.

ANEXOS

Anexo 1 – Tabela com a dosagem das citocinas para cada animal

Camundongo sem tumor e sem tratamento (Controle negativo)						
	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
AMOSTRAS	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
camundongo 1	0	0	71	722	0	-----

Camundongos com tumor sem tratamento (Controle)						
	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
AMOSTRAS	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	3	0	172,5	1571	0	1,59
camundongo 1	18	0	159	2185	0	5,22
camundongo 2	6	0	175	1713	0	3,31
camundongo 3	20	0	170	1413	0	0,50
camundongo 4	0	0	154	1404	1000	0,00
camundongo 5	0	0	175	*	*	0,51
camundongo 6	0	0	295	*	*	0,00

Tratamento com hidróxido de alumínio sigma livre (HS)						
	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
AMOSTRAS	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	0	0	149	1135	0	1,48
camundongo 1	0	0	182	1304	0	0,17
camundongo 2	0	0	50	967	0	0,05
camundongo 3	0	0	78	913	0	0,32
camundongo 4	0	0	248	2949	0	3,49
camundongo 5	0	0	116	1385	0	4,81
camundongo 6	0	0	298	831	0	0,08

Tratamento com hidróxido de alumínio manipulado livre (HM)						
	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
AMOSTRAS	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	8	161	259	1376	0	0,17
camundongo 1	8	161	259	1376	0	0,51
camundongo 2	51	639	435	2122	0	0,03
camundongo 3	8,2	789	512	1594	0	0,22
camundongo 4	0	0	133	858	0	0,08
camundongo 5	0	89	171	658	0	0,03

Tratamento com nanopartícula de PLGA vazia (PLGA)						
	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
AMOSTRAS	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	0	0	77	921	0	0,27
camundongo 1	0	0	61	*	*	0
camundongo 2	68	0	66	421	0	0,86
camundongo 3	0	0	77	1031	0	0,99

camundongo 4	0	0	50	994	0	0,07
camundongo 5	0	0	137	749	0	0
camundongo 6	0	0	132	849	0	0
camundongo 7	0	0	148	1140	700	0

Tratamento com Hidróxido de alumínio sigma nanoestruturado (PLGA HS)

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	0	0	193	999	0	0,15
camundongo 1	8	939	309	*	*	0
camundongo 2	50	188	452	1594	0	0,82
camundongo 3	86	0	171	*	*	0,02
camundongo 4	0	0	84	1240	0	0,19
camundongo 5	0	0	84	758	0	0,04
camundongo 6	0	0	193	*	*	0
camundongo 7	0	0	248	358	0	0

Tratamento com hidróxido de alumínio manipulado nanoestruturado (PLGA HM)

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	61	979	347	1344	0	0,05
camundongo 1	69	714	287	2785	0	0
camundongo 2	61	979	210	2040	3600	0,16
camundongo 3	0	236	534	1040	0	0,14
camundongo 4	83	314	281	1622	0	0
camundongo 5	54	980	350	1067	*	0,03
camundongo 6	106	1663	479	*	*	0
camundongo 7	0,75	1238	347	1058	0	0,02

Tratamento com macrófagos (Mo)

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	0	214	190	1244	0	1,8
camundongo 1	17	214	226	*	*	0,04
camundongo 2	0	164	320	1422	0	3,81
camundongo 3	0	63	190	1194	*	3,89
camundongo 4	0	361	163	1294	0	1,24
camundongo 5	17	1382	181	1040	0	0,02

Tratamento com macrófagos e PLGA (Mo PLGA)

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	53	339	235	1150	0	0,18
camundongo 1	98	1039	271	1031	0	0,16
camundongo 2	53	89	244	1304	0	0,38
camundongo 3	92	339	221	949	0	0,06
camundongo 4	38	114	217	1213	0	0,01
camundongo 5	76	1813	235	1112	0	0,07
camundongo 6	9	0	226	1631	*	0,58

camundongo 7	17	339	280	1150	0	0,02
Tratamento com macrófagos e hidróxido de alumínio manipulado nanoestruturado (Mo PLGA HM)						
	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)					PESO (g)
AMOSTRAS	INF-Y	IL-10	IL-4	IL-12 p40	IL-12 p70	Tumor dissecado
Mediana e média	26	389	235	1067	0	0,226
camundongo 1	58	889	235	1076	*	0,1
camundongo 2	20	564	302	1276	0	0
camundongo 3	0	214	230	740	0	0,46
camundongo 4	30	389	230	*	*	0,28
camundongo 5	26	12	261	1067	0	0,29

Anexo 2 – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/CEP

RECIBO DE RELATÓRIO PARCIAL E PEDIDO DE EMENDA

Declaramos que recebemos para análise e emissão de parecer ético, o pedido de prorrogação do cronograma até DEZEMBRO/2015 da pesquisa que está sob a coordenação de:

Pesquisador: Lucimeire Antonelli da Silveira

Título: *Participação de adjuvantes e Macrofagos Ativados in vitro na resolução de tumorexperimental*

Data da entrega: 13/02/14

Número do protocolo: 044/11 CEP-UFG

Margarida do Amaral Silva
Dra. Margarida do Amaral Silva
Mat. SIAPE 1673655
Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG

Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Universidade Federal de Goiás
(62)3521-1215

Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: cep.prppg.ufg@gmail.com