

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

Departamento de Físico-Química



UNICAMP

- Dissertação de Mestrado -

**Nanopartículas poliméricas de PLGA no tratamento de
carcinoma hepatocelular e câncer colo-retal**

Victor Baldim

Orientador: Prof. Dr. Francisco Benetido Teixeira Pessine

Campinas-SP

Fevereiro de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

B19n Baldim, Victor.
Nanopartículas poliméricas de PLGA no tratamento de carcinoma hepatocelular e câncer colo-retal / Victor Baldim. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine.

Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Câncer. 2. Imunoterapia. 3. Nanopartículas poliméricas. 4. Vírus adeno-associados. I. Pessine, Francisco Benedito Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: PLGA polymeric nanoparticles in the treatment of hepatocellular carcinoma and colorectal cancer

Palavras-chaves em inglês: Cancer, Immunotherapy, Polymeric nanoparticles, Adeno-associated virus

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (orientador), Prof. Dra. Eneida de Paula (IB-UNICAMP), Profa. Dra. Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 09/02/2011

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrado o meu sincero agradecimento às várias pessoas que, cada qual a sua maneira, contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e intelectual durante meu trabalho de Mestrado:

- Em primeiro lugar, à minha família: pai, mãe, irmã, tias, tios e avô.
- Aos amigos e colegas: Pietro Escobar, Carol Marmo, Marcela Curcio, Felipe Mendes, Ricardo Glanso, Sergio Januzzi, Sergio Bertazzo, André Garcia, Renan Zibordi, Henrique Pasti.
- Ao meu orientador: Francisco B. T. Pessine.
- Aos supervisores, pesquisadores e técnicos: Glória Gonzalez-Asequinolaza, Conchita Tros de Ilarduya, Marianna di Scala, Roberto Ferrero, Afrika Pañales, Cristina Olagüe, Astrid Pañeda, Pedro Berraondo, Javier Dotor, Jesus Prieto, Déborah Simoni.
- Aos docentes do Instituto de Química da Unicamp: Pessine, Bertran, Inês Joekes, Bruns, Volpe, Aparício.

Deixo também registrado o agradecimento às demais pessoas que me inspiraram e me apoiaram ao longo do programa.

Por último, agradeço às entidades financiadoras CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e Banco Santander que me contemplaram com bolsas sem as quais a execução do trabalho seria inviável.

CURRICULUM VITÆ

1. Dados pessoais

Victor Baldim, brasileiro, natural de São Paulo (SP), Brasil.

Contato: victor.baldim@gmail.com

2. Formação

Nível médio e técnico em química pela Escola Estadual Conselheiro Antônio Prado (ETECAP), Campinas (SP) – 2003.

Bacharel em Química pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas (SP) – 2008.

3. Atividades acadêmicas

3.1. Iniciação Científica

Projeto: “Determinação de estruturas cristalográficas da TIM (triose fosfato isomerase) de músculo de coelho na presença de DMSO”

Bolsa: PIBIC/CNPq

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aparício

Período: 2005 - 2006

Projeto: “Eletrostática de materiais não-condutores”

Bolsa: Funcamp

Orientador: Prof. Dr. Fernando Galembeck

Período: 2007 - 2008

3.2. Programa de Estágio Docente (PED)

PED nível C na disciplina de QF 435 - Físico-Química I, no 1º semestre de 2009, sob a supervisão da Prof. Dr^a. Inês Joekes. O programa envolveu atividades de monitorias periódicas e/ou previamente combinadas e aulas de exercício nos dias precedentes às avaliações.

3.3. Experiência internacional

Selecionado pelo Instituto de Química da Unicamp para o Programa Santander de Bolsas de Mobilidade Internacional que proporcionou estágio no laboratório de Terapia Gênica e Hepatites Virais, do Centro de Investigação Médica Aplicada da Universidade de Navarra, Pamplona, Espanha, sob a supervisão da professora Glória González-Aseguinolaza, no período de 09/09//2009 a 28/02/2010.

3.4. Publicação

Soares, L.; Bertazzo, S.; Burgo, T.; Baldim, V; Galembeck, F. A new mechanism for the electrostatic charge build-up and dissipation in dielectrics. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (2008) 19, 277-86.

RESUMO

Nanopartículas poliméricas de PLGA no tratamento de carcinoma hepatocelular e câncer cólon retal

Neste trabalho preparamos e utilizamos nanopartículas de PLGA-DOTAP encapsulando o peptídeo P17, que bloqueia a ação da citocina imunossupressora TGF- β , no tratamento de camundongos BALB/c fêmea, inoculados via subcutânea com células de hepatocarcinoma (CHC) murino BNL ou de câncer colo-retal (CCR) murino CT26. No modelo de CHC, nanopartículas foram administradas em conjunto com vírus adenoassociados recombinantes, cujo DNA viral codificava a citocina imunoestimuladora IL-12. No modelo de CCR, nanopartículas foram testadas como potencializadoras de uma vacina contra câncer colo-retal. Além disso, a biodistribuição de nanopartículas de PLGA-DOTAP, funcionalizadas ou não com a glicoproteína assialofetuína, foi verificada pelos métodos de bioluminescência em câmara escura com detector CCD e por PCR quantitativa em tempo real. Como resultado, observou-se que nanopartículas de PLGA-DOTAP encapsulando o fármaco P17 são capazes de potencializar a vacina contra CCR e que a glicoproteína assialofetuína é capaz de direcioná-las ao fígado.

Palavras-chave: sistemas de entrega de fármacos, PLGA, carcinoma hepatocelular, câncer colo-retal, quimioterapia, imunoterapia, terapia genética, nanopartículas poliméricas, vírus adeno-associados, interleucina-12 (IL-12), fator transformador de crescimento- β (TGF- β).

ABSTRACT

In this research we prepared and used PLGA-DOTAP nanoparticles loaded with the peptide P17, which blocks the action of the immunosuppressive cytokine TGF- β , in the treatment of female BALB/c mice inoculated subcutaneously with BNL (murine hepatocellular carcinoma (HCC) cells) or CT26 (murine colorectal cancer (CRC) cells). In the HCC model, nanoparticles were administered together with recombinant adeno-associated virus whose viral DNA encodes the immunostimulatory cytokine IL-12. In the CRC model, nanoparticles were tested as vaccine booster against colorectal cancer. In addition, the biodistribution of PLGA-DOTAP nanoparticles functionalized or not with the asialofetuin glycoprotein was verified by bioluminescence and real-time quantitative PCR. As a result, it was observed that P17 containing DOTAP-PLGA nanoparticles are able to increase vaccine efficiency and that asialofetuin glycoprotein is able to direct them to the liver.

Keywords: drug delivery systems, PLGA, hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, chemotherapy, immunotherapy, gene therapy, polymeric nanoparticles, adeno-associated virus, interleukin -12 (IL-12), transforming growth factor- β (TGF- β).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

293T – linha de células embrionárias humanas epiteliais do rim

AAV - vírus adeno-associado, do inglês *adeno-associated virus*

AAV8 – vírus adeno-associado do serotipo oito

AF – assialofetuína

AFP - α -fetoproteína

AFU - α -L-fucosidase

AH1 - antígeno de células tumorais CT26

ATP - trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine triphosphate*

APC – célula apresentadora de antígeno, do inglês *antigen presenting cell*

ASGPr - receptor de assialoglicoproteína, do inglês *asialoglycoprotein receptor*

BALB/c – camundongo albino

BCLC – Clínica de Câncer do Fígado de Barcelona, do inglês *Barcelona Clinic Liver Cancer*

BNL – linhagem celular de carcinoma hepatocelular murino

cap – gene que codifica as proteínas do capsídeo viral

CCD - dispositivo de carga acoplada, do inglês *charge coupled device*

cftr – gene que codifica o regulador transmembranar de condutância da fibrose cística, do inglês *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CHC - carcinoma hepatocelular

CIMA – Centro de Pesquisa Médica Aplicada da Universidade de Navarra, do espanhol *Centro de Investigación Médica Aplicada*

CLIP - Programa Italiano de Câncer do Fígado, do inglês *Cancer of Liver Italian Program*

c-MET – gene que codifica o receptor de HGF

CT - tomografia computadorizada, do inglês *computed tomography*

CT26 – linha celular de câncer cólon retal murino

CTL - célula T citotóxica, do inglês *cytotoxic T lymphocyte*

CUPI – Índice de Prognóstico da Universidade Chinesa, do inglês *Chinese University Prognostic Index*

<d> - diâmetro médio

DC - conteúdo de fármaco, do inglês *drug content*; ou célula dendrítica, do inglês *dendritic cell*

DCP - des- γ -carboxiprotrombina

DMEM – meio de cultura modificado de Dulbecco, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxirribonucléico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

DNase - enzima que cataliza a hidrólise de ligações fosfodiéster do esqueleto de moléculas de DNA

DOTAP - lipídeo catiônico 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano

EBV – vírus Epstein-Barr, do inglês *Epstein-Barr virus*

ECOG – Grupo Cooperativo de Oncologia do Leste, do inglês *Eastern Cooperative Oncology Group*

EDAC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EE - eficiência de encapsulação

EGFR – fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *endothelial growth factor receptor*

FCS - soro bovino fetal, do inglês *fetal calf serum*

FDA – agência norte-americana reguladora de medicamentos e alimentos, do inglês *US Food and Drug Administration*

GADPH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GP73 – proteína 73 do complexo de Golgi, do inglês *Golgi protein 73*

GPC3 – glipicana-3

GRETCH – Grupo de Estudo do Tratamento de Carcinoma Hepatocelular, do francês *Groupe d'Etude de Traitement du Carcinoma Hepatocellulaire*

HAP - hidrocarboneto aromático policíclico

HBV – vírus da hepatite B, do inglês *hepatitis B virus*

HCV – vírus da hepatite C, do inglês *hepatitis C virus*

HGF - fator de crescimento de hepatócitos, do inglês *hepatocyte growth factor*

HIV – vírus da imunodeficiência humana, do inglês *human immunodeficiency virus*

HPLC – cromatografia líquida, do inglês *high pressure liquid chromatography*

HPV – vírus do papiloma humano, do inglês *human papiloma virus*

HTLV-1 – vírus T-linfotrópico humano do tipo 1, do inglês *human T lymphotropic virus type 1*

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*

IFA – adjuvante incompleto de Freund, do inglês *incomplete Freund's adjuvant*

IFN - γ – Interferon- γ

IGF – fator de crescimento análogo à insulina, do inglês *insulin-like growth factor*

IL – interleucina

INCA – Instituto Nacional do Cancer

i.t. – intratumoral

ITR - repetições terminais invertidas, do inglês *inverted terminal repeats*

JIS – Sistema Integrado Japonês, do inglês *Japanese Integrated System*

KSHV – vírus herpes, associado ao sarcoma de Kaposi, do inglês *Kaposi's sarcoma associated-herpes virus*

LPS - lipopolissacarídeo

met - gene que codifica o receptor de HGF

MHC – complexo principal de histocompatibilidade, do inglês *major histocompatibility complex*

mIL12 – interleucina-12 murina

MRI – imagem por ressonância magnética nuclear, do inglês *nuclear magnetic resonance imaging*

mRNA – RNA mensageiro

MSP - proteína estimuladora de macrófagos, do inglês *macrophage stimulating protein*

mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês *mammalian target of rapamycin*

NCI – Instituto Nacional do Cancer (EUA), do inglês *National Cancer Institute*

NK – do inglês *natural killer*

NP – nanopartícula

ORF – do inglês *open reading frame*

P17 – peptídeo bloqueador de TGF- β

p53 – proteína citoplasmática frequentemente mutada em células tumorais

PAMP - padrão molecular associado à patógenos, do inglês *pathogen associated molecular pattern*

PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PD - polidispersidade

PDGFR - receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês *platelets derived growth factor receptor*

pDNA – DNA plasmídico

pDNA LUC – DNA plasmídico codificando a enzima luciferase

PEG – poli(etilenoglicol)

PEI - injeção percutânea de etanol, do inglês *percutaneous ethanol injection*; ou poli(etilenoimina)

PGA - poli(ácido glicólico), do inglês *poly(glycolic) acid*

PLA - poli(ácido láctico), do inglês *poly(lactic) acid*

PLGA - poli(ácido láctico-co-glicólico), do inglês *poly(lactic-co-glycolic) acid*

PNHV - Programa Nacional para Prevenção e Controle das Hepatites Virais

PVA – poli(vinil álcool), do inglês *poly(vinyl alcohol)*

PZ - potencial Zeta

qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa, do inglês *quantitative polymerase chain reaction*

rAAV – vírus adeno-associado recombinante

rAAV8 – vírus adeno-associado recombinante do serotipo 8

rAAV8-LUC – vírus adeno-associado recombinante do sorotipo 8 codificando a enzima luciferase

rAAV8-mIL12 - vírus adeno-associado recombinante do sorotipo 8 codificando a citocina interleucina-12

ras- gene que codifica GTPases cuja mutação é associada ao câncer

RFA - ablação por radiofreqüência, do inglês *radio frequency ablation*

rep – gene que codifica enzimas regulatórias em vírus adeno-associados

RES - sistema retículo endotelial, do inglês *reticuloendothelial system*

RNA – ácido ribonucléico, do inglês *ribonucleic acid*

RNase – enzima que cataliza a hidrólise de ligações fosfodiéster do esqueleto de moléculas de RNA

Ron - gene que codifica receptores tirosina cinases que frequentemente se encontra mutado em células neoplásticas

RPMI – meio de cultura do *Roswell Park Memorial Institute*

s.c. – subcutâneo

SCCA – antígeno de carcinomas de células escamosas, do inglês *scamous cell carcinoma antigen*

TACE - quimioembolização trans-arterial, do inglês *transarterial chemoembolization*

TCR - receptor celular de células T, do inglês *T cell receptor*

TGF- β - fator transformador de crescimento – β , do inglês *transforming growth factor- β*

T_h - célula T auxiliar, do inglês *T helper*

T_{reg} – célula T reguladora

TNF - fator de necrose tumoral, do inglês *tumoral necrosis factor*

TNM - *UNOS-modified Tumor Node Metastasis*

TPGS – α-tocoferol succinato de polietileno glicol, do inglês *tocopherol poly(ethylene) glycol succinate*

T_{reg} - célula T regulatória

UNAV- Universidade de Navarra, Pamplona, Espanha

US – ultrassonografia

VEGFR - receptor do fator de crescimento endotelial vascular, do inglês vascular *endothelium growth factor receptor*

Wnt - gene que codifica proteínas envolvidas em processos de sinalização durante o desenvolvimento embrionário que frequentemente se encontra mutado em células neoplásticas.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1- METABOLISMO DE BENZOPIRENO E LIGAÇÃO DO METABÓLITO DI-HIDRODIOEPÓXIDO EM MOLÉCULA DE GUANINA..... | 7 |
| FIGURA 2 - AFLATOXINA B1 LIGADA A RESÍDUO DE GUANINA COMPONENTE DA MOLÉCULA DE DNA..... | 8 |
| FIGURA 3 - MORFOLOGIA E ANATOMIA SIMPLIFICADA DO FÍGADO. | 14 |
| FIGURA 4 - HEPATÓCITOS ORGANIZADOS EM LÓBULOS (ESTRUTURAS HEXAGONAIS) AO REDOR DE VEIAS CENTRAIS (CÍRCULOS BRANCOS) | 16 |
| FIGURA 5 - HEPATÓCITOS ORGANIZADOS AO REDOR DE UMA VEIA CENTRAL E SINUSÓIDES HEPÁTICOS | 16 |
| FIGURA 6 - INCIDÊNCIA/100.000 HABITANTES DE CHC NA POPULAÇÃO MUNDIAL | 19 |
| FIGURA 7 - MORTALIDADE POR CHC NOS EUA EM HOMENS E MULHERES EM FUNÇÃO DA IDADE..... | 20 |
| FIGURA 8 - INCIDÊNCIA MÉDIA DE CHC EM FUNÇÃO DA FAIXA ETÁRIA EM ALGUNS PAÍSES E DENTRO DE GRUPOS ÉTNICOS NORTE-AMERICANOS. | 21 |
| FIGURA 9 - PRESENÇA DE VÍRUS DA HBV/HCV EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CHC (N: NÚMERO DE PACIENTES ANALISADOS) | 22 |
| FIGURA 10 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA DOXORUBICINA..... | 36 |
| FIGURA 11 - FÓRMULA MOLECULAR DO SORAFENIB. | 36 |
| FIGURA 12- FÓRMULA ESTRUTURAL DO POLÍMERO SINTÉTICO BIODEGRADÁVEL PLGA ONDE X E Y REPRESENTAM O NÚMERO DE UNIDADES DE ÁCIDO LÁTICO E GLICÓLICO, RESPECTIVAMENTE..... | 52 |
| FIGURA 13 – LIPOSSOMA: BICAMADA LIPÍDICA ESFÉRICA ENVOLVENDO UM NÚCLEO AQUOSO..... | 54 |
| FIGURA 14 - MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA: A) PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA TIOLADAS; B) E C) CONJUGAÇÃO DE LIGANTES (R) A NANOPARTÍCULAS TIOLADAS. | 57 |
| FIGURA 15 - A) DNA VIRAL DE AAV; B) DNA VIRAL DE RAAV..... | 59 |
| FIGURA 16 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO 1,2-DIOLEOIL-3-TRIMETILAMÔNIO-PROPANO (DOTAP)..... | 82 |
| FIGURA 17 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS MASSA DE DOTAP NA FASE OLEOSA ((1) DOTAP) E CONCENTRAÇÃO DE P17 NA FASE AQUOSA INTERNA ((2) P17) E INTERAÇÃO ENTRE ESTES FATORES ((1) POR (2)), COM 95 % DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (P=0,05), NO DIÂMETRO (GRÁFICO SUPERIOR) E POTENCIAL ZETA (GRÁFICO INFERIOR) DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA PREPARADAS PELO MÉTODO DE DUPLA EMULSÃO. VALORES NEGATIVOS INDICAM INFLUÊNCIA NA DIMINUIÇÃO DO FATOR. | 85 |
| FIGURA 18 - INFLUÊNCIA DOS TERMOS LINEARES E QUADRÁTICOS DAS VARIÁVEIS MASSA DE DOTAP NA FASE OLEOSA ((1) DOTAP (L) E DOTAP (Q)) E CONCENTRAÇÃO DE P17 NA FASE AQUOSA INTERNA ((2) P17 (L) E P17 (Q)) E A INTERAÇÃO ENTRE OS TERMOS LINEARES ((1) POR (2)), COM 95 % DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (P=0,05), NO CONTEÚDO DE P17 EM NANOPARTÍCULAS DE PLGA PREPARADAS PELO MÉTODO DE DUPLA EMULSÃO. VALORES POSITIVOS INDICAM INFLUÊNCIA NO AUMENTO DO CONTEÚDO DE P17..... | 87 |
| FIGURA 19 - GENES NECESSÁRIOS PARA A PRODUÇÃO DE RAAV EM CÉLULAS HUMANAS 293 T: 1) GENOMA DE INTERESSE, 2) REP E CAP, 3) GENES ADENOVIRAIS (E2A, VA, AND E4) | 90 |
| FIGURA 20 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA LUCIFERINA CATALISADA POR LUCIFERASE | 93 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 21 - BIODISTRIBUIÇÃO DA ENZIMA LUCIFERASE EM CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEAS QUE RECEBERAM INTRAPERITONEALMENTE NANOPARTÍCULAS DE PLGA-DOTAP CONTENDO PDNA CODIFICANDO A ENZIMA LUCIFERASE, FUNCIONALIZADAS COM A GLICOPROTEÍNA ASSIALOFETUÍNA (TRÊS ANIMAIS, PARTE SUPERIOR) E NÃO FUNCIONALIZADAS (TRÊS ANIMAIS, PARTE INFERIOR). | 94 |
| FIGURA 22 - BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS (GRÁFICO À ESQUERDA) E NÃO-FUNCIONALIZADAS (GRÁFICO À DIREITA) EM CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEA PELA TÉCNICA DE QPCR EM TEMPO REAL | 95 |
| FIGURA 23 - CRESCIMENTO TUMORAL EM GRUPOS DE 8 CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEA PREVIAMENTE TRATADOS E INOCULADOS COM CÉLULAS DE CÂNCER COLO-RETAL CT26. TRATAMENTO: GRUPO 1: SEM TRATAMENTO; GRUPO 2: IMUNIZAÇÃO COM AH1; GRUPO 3: IMUNIZAÇÃO COM AH1 E NANOPARTÍCULAS COM P17; GRUPO 4: IMUNIZAÇÃO COM AH1 E CINCO DOSES DE P17; GRUPO 5: IMUNIZAÇÃO COM AH1 E DOSE ÚNICA DE P17..... | 98 |
| FIGURA 24 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA REFERENTES AOS GRUPOS DE CAMUNDONGOS BALB/C COM TUMOR BNL S.C. TRATADOS COM VÍRUS ADENOASSOCIADOS E NANOPARTÍCULAS DE PLGA. TRATAMENTO: GRUPO 1: RAAV8-LUC I.T. (SEM TRATAMENTO), N=7; GRUPO 2: RAAV8-MIL12 I.T., N=7; GRUPO 3: RAAV8-MIL12 I. T. + 5 DOSES DE P17, N=7 ; GRUPO 4: RAAV8-MIL12 I. T. + UMA DOSE DE P17 ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS DE PLGA NÃO-FUNCIONALIZADAS, N=7; GRUPO 5: RAAV8-MIL12 I. T. + UMA DOSE DE P17 ENCAPSULADO NANOPARTÍCULAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS COM ASSIALOFETUÍNA, N=8. | 102 |
| FIGURA 25 - CRESCIMENTO TUMORAL EM GRUPOS DE N CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEA COM TUMOR BNL S.C., TRATADOS POSTERIORMENTE COM VÍRUS ADENOASSOCIADOS E NANOPARTÍCULAS DE PLGA. TRATAMENTO: GRUPO 1: RAAV8-LUC I.T. (SEM TRATAMENTO), N=7; GRUPO 2: RAAV8-MIL12 I.T., N=7; GRUPO 3: RAAV8-MIL12 I. T. + 5 DOSES DE P17, N=7; GRUPO 4: RAAV8-MIL12 I. T. + UMA DOSE DE P17 ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS DE PLGA NÃO-FUNCIONALIZADAS, N=7; GRUPO 5: RAAV8-MIL12 I. T. + UMA DOSE DE P17 ENCAPSULADO NANOPARTÍCULAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS COM ASSIALOFETUÍNA, N=8..... | 102 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| TABELA 1 - SISTEMA DE ESTÁGIOS BCLC: UTILIZA STATUS TUMORAL, STATUS DE FUNCIONALIDADE DO FÍGADO E SAÚDE DO PACIENTE NA DEFINIÇÃO DE PROGNÓSTICOS. | 32 |
| TABELA 2 - CITOCINAS MANIPULADAS EM TERAPIA ANTI-CÂNCER | 47 |
| TABELA 3 - GRUPOS DE CAMUNDONGOS E RESPECTIVOS TRATAMENTOS..... | 76 |
| TABELA 4 GRUPOS DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM BNL E RESPECTIVOS TRATAMENTOS | 78 |
| TABELA 5 - FATORES “CONCENTRAÇÃO DE P17 NA FASE AQUOSA INTERNA” (P17) E “MASSA DE DOTAP NA FASE OLEOSA” (DOTAP) E NÍVEIS AVALIADOS EM PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² | 83 |
| TABELA 6 – DIÂMETRO E POTENCIAL ZETA DE VÁRIAS FORMULAÇÕES..... | 83 |
| TABELA 7 - FATORES “CONCENTRAÇÃO DE P17 NA FASE AQUOSA INTERNA” (P17) E “MASSA DE DOTAP NA FASE OLEOSA” (DOTAP) E NÍVEIS AVALIADOS EM PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2x2 ² COM PONTO CENTRAL. | 84 |
| TABELA 8 - DIÂMETRO MÉDIO (<D>), POLIDISPERSIDADE (PD), POTENCIAL ZETA (PZ), CONTEÚDO DE FÁRMACO (DC) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) DAS NANOPARTÍCULAS DAS FORMULAÇÕES (N) COMPONENTES DO PLANEJAMENTO 2x2 ² COM PONTO CENTRAL (ESTRELA). | 86 |
| TABELA 9 - DIÂMETRO MÉDIO (<D>), POLIDISPERSIDADE (PD), POTENCIAL ZETA (PZ), CONTEÚDO DE FÁRMACO (DC) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) DAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA ENCAPSULANDO PDNA CODIFICANDO A ENZIMA LUCIFERASE*. 88 | |
| TABELA 10 - DIÂMETRO E POTENCIAL ZETA DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM ASSIALOFETUÍNA | 89 |
| TABELA 11 - GRUPOS DE 8 CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEA E RESPECTIVAS ESTRATÉGIAS DE IMUNIZAÇÃO TESTADAS ANTES DA INOCULAÇÃO COM CÉLULAS TUMORAIS DE CÂNCER DE CÓLON RETAL CT26. | 97 |
| TABELA 12 - GRUPOS DE N CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEA E RESPECTIVAS TERAPIAS TESTADAS PARA TRATAMENTO DE TUMORES SUBCUTÂNEOS DERIVADOS DA LINHA CELULAR DE HEPATOCARCINOMA MURINO BNL | 101 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. CÂNCER | 3 |
| 1.1. Neoplasia | 3 |
| 1.2. Carcinogênese | 5 |
| 1.3. Defesas naturais do organismo contra o câncer..... | 10 |
| 1.4. Quimioterapia | 11 |
| 2. FÍGADO..... | 14 |
| 2.1. Morfologia e anatomia | 14 |
| 2.2. Histologia | 15 |
| 2.3. Fisiologia | 17 |
| 3. HEPATOCARCINOMA..... | 18 |
| 3.1. Epidemiologia | 19 |
| 3.2. Sintomas | 25 |
| 3.3. Diagnóstico | 26 |
| 3.5. Tratamento | 33 |
| 4. IMUNOTERAPIA | 38 |
| 4.1. Sistema imunológico..... | 38 |
| 4.2. Resposta imune frente a tumores..... | 43 |
| 4.3. Mecanismos de evasão da resposta imune por tumores..... | 44 |
| 4.4. Imunoterapia contra tumores..... | 45 |
| 5. SISTEMAS PARA ENTREGA CONTROLADA DE ATIVOS..... | 50 |
| 5.1. Sistemas não-virais para entrega de macromoléculas | 50 |
| 5.2. Sistemas para entrega direcional de macromoléculas | 56 |
| 5.3. Testes clínicos envolvendo o uso de formulações nano particuladas | 60 |
| II. OBJETIVOS..... | 63 |
| III. PARTE EXPERIMENTAL..... | 67 |
| 6. PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA..... | 69 |
| 7. PREPARAÇÃO DOS VÍRUS ADENOASSOCIADOS RAAV8-MIL12 E RAAV8-LUC..... | 72 |
| 8. BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA EM CAMUNDONGOS..... | 74 |
| 9. VACINA ANTITUMORAL..... | 75 |
| 10. TERAPIA IMUNOGENÉTICA | 77 |

| | |
|--|------------|
| IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 79 |
| 11. PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA..... | 81 |
| 12. PREPARAÇÃO DE VÍRUS ADENOASSOCIADOS RECOMBINANTES | 90 |
| 13. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> | 92 |
| 13.1. <i>Biodistribuição de nanopartículas de PLGA em camundongos BALB/c fêmea</i> | 92 |
| 13.2. <i>Vacina antitumoral</i> | 96 |
| 13.3. <i>Terapia imunogenética</i> | 99 |
| V. CONCLUSÕES..... | 105 |
| VI. REFERÊNCIAS..... | 109 |

I. Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Câncer

1.1. Neoplasia

É a proliferação anormal de células originárias de quaisquer tecidos do corpo que sofreram diferenciações biológicas e estruturais anormais, que causam perda de função celular e cujo crescimento compromete o funcionamento adequado do órgão afetado levando à sua falência (Tanaka, 2009).

1.1.1. Câncer primário

É a neoplasia maligna presente no tecido em que se originou e seu nome se refere ao tipo celular afetado, como: carcinoma, células epiteliais; sarcoma, células de tecidos moles e osteócitos; linfoma, células do sistema linfático; glioblastoma, astrócitos no cérebro, etc. O desenvolvimento tumoral pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão.

A iniciação de um câncer depende de mutações ou deleções de genes, espontâneas ou causadas por agentes carcinogênicos, que atuem na regulação do ciclo celular e que resultem em maiores taxas de proliferação e sobrevivência, tornando a população de células mutadas autônoma em relação às demais também existentes no mesmo tecido (Rudin, 1997; Klein, 2009). Mesmo assim, estas células podem se manter inofensivas até posteriores transformações.

A fase de promoção é quando a população monoclonal de células inicialmente mutadas é exposta contínua e prolongadamente ao agente carcinogênico, de forma a adquirir novas mutações que a torne insensível ao controle desempenhado pelo ambiente celular local e sistema imunológico (Devi, 2004).

Durante a fase de progressão as células que compõem a massa tumoral são heterogêneas e algumas adquirem novas mutações que elevam sua

capacidade de induzir o recrutamento de novos vasos sanguíneos ao tumor (angiogênese), que é absolutamente necessário para sua expansão quando o crescimento do volume tumoral está limitado pela escassez de nutrientes (Zetter, 1998). Também neste estágio, algumas células malignas se tornam capazes de se desprender do tumor original, alcançar e invadir outros órgãos, processo conhecido como metástase.

1.1.2. Metástase

Conforme avança o desenvolvimento de um tumor, algumas de suas células perdem a capacidade de aderir à massa tumoral e se desprendem, invadindo tecidos vizinhos. Estas mesmas células podem ser transportadas a órgãos distantes da neoplasia primária, através da circulação sanguínea e linfática. O fenômeno pelo qual células cancerosas se espalham pelo corpo estabelecendo novos tumores em órgãos distantes de onde surgiram originalmente é conhecido como metástase e é a marca registrada de tumores malignos, sendo a principal causa de óbito dentre os pacientes com câncer (Bacac, 2008).

Células tumorais devem adquirir uma série de propriedades para que possam ter sucesso no processo de metástase: ter habilidade de induzir angiogênese; ser resistente à apoptose; sobreviver à migração; ter capacidade de invadir novos tecidos e ter capacidade de adaptar-se a um novo microambiente. Todos estes processos são influenciados por células não malignas presentes no microambiente tumoral (Joyce, 2009).

A angiogênese é essencial para que se inicie o processo de metástase, pois proporciona um caminho para que células tumorais entrem na corrente sanguínea ao se desprenderem do tumor primário. A densidade de vascularização pode ser utilizada na determinação de prognóstico a respeito do potencial de metástase, pois tumores bastante vascularizados têm maior incidência de metástase que aqueles pouco vascularizados (Zetter, 1998).

A maioria das células sadias é sensível às condições do meio extracelular e entra rapidamente em apoptose, se removida de seu ambiente natural. Células tumorais metastáticas são envolvidas e protegidas por plaquetas enquanto circulam pelo sangue formando uma espécie de coágulo que é capaz de entupir pequenos vasos ajudando estas células tumorais a se alojarem em um novo tecido (Rudin, 1997).

O crescimento e desenvolvimento de um tumor secundário dependem novamente do estabelecimento de vasculatura, proporcionado pela produção de fatores angiogênicos e recrutamento de células endoteliais, por células tumorais metastáticas (Joyce, 2009).

1.2. Carcinogênese

Tumores se desenvolvem mais frequentemente em indivíduos que foram expostos continuamente a carcinógenos, sendo que sua incidência aumenta exponencialmente em função da idade. Esta exposição leva ao surgimento e estabelecimento de mutações em genes que controlam o ciclo celular, oncogenes e genes supressores de tumor, resultando no desenvolvimento de uma população de células clonais com capacidade exacerbada de sobrevivência e proliferação, levando à formação de uma massa tumoral (Poirier, 2004; Loeb, 2008).

Alguns fatores são comprovadamente tumorigênicos, como a presença de alguns tipos de vírus, carcinógenos químicos e radiação (Fialkow, 1998).

1.2.1. Alterações genéticas

O câncer é causado por um processo que envolve várias etapas de alterações genéticas sequenciais. Estas mutações fornecem os sinais necessários para que células tumorais comecem a se dividir descontroladamente (Croce, 2008).

Proto-oncogenes (como ras, wnt, met, ron) estão envolvidos no processo de transcrição do DNA ou promovem crescimento celular produzindo hormônios e mitógenos. Quando sofrem mutações podem modificar seu padrão de expressão aumentando a quantidade ou atividade da proteína codificada, tornando-se oncogenes, que promovem a proliferação desregulada de células, aumentando a probabilidade de que uma célula normal se transforme em maligna, podendo levar ao desenvolvimento de câncer (Liu, 2009).

Genes ras codificam proteínas de membrana que regulam a diferenciação e transdução de sinais que mediam proliferação celular, movimento de vesículas, sobrevivência e envelhecimento celular, apoptose e ativação de células T. Estas proteínas estão envolvidas na regulação da promoção e inibição de apoptose (Diaz, 2004).

A rota de sinalização estimulada pelos ligantes codificados pelo gene wnt remete a vários eventos de diferenciação celular durante o desenvolvimento de embriões e levam à formação de tumores quando ativada incorretamente. Mutações neste gene são causa de 90% dos cânceres colo-retais, porém aparecem em menor frequência em outros como carcinomas hepatocelulares (Giles, 2003).

Os genes met e ron codificam uma série de receptores tirosina cinase em células epiteliais que, ao se ligar ao Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e Proteína Estimuladora de Macrófagos (MSP), respectivamente (Follenzi, 2000) conferem a estas células capacidade de crescimento invasivo.

Genes supressores de tumor codificam sinais e proteínas anti-proliferativas envolvidas em vários processos que levam a inibição de cânceres: regulação do ciclo celular, possibilitando divisão celular; reparação de DNA, prevenindo o estabelecimento de mutações; indução de apoptose, quando DNA danificado não pode ser reparado; adesão celular, prevenindo o desprendimento de células malignas, evitando metástase (Strachan, 2004).

Quando esses genes sofrem mutações ou deleções conferem às células vantagens proliferativas sobre as demais, as quais podem formar uma população monoclonal de células neoplásicas.

Um exemplo de gene supressor de tumor é o p53 que, quando perde sua função, confere às células capacidade de escapar dos mecanismos de apoptose e transforma lesões pré-cancerosas em cancerosas (Negrini, 2010).

1.2.2. Carcinógenos químicos

Agentes químicos provocam mutações genéticas e epigenéticas aleatoriamente no DNA celular, de forma que células malignas sobrevivem aos mecanismos de seleção natural presentes no organismo quando estas mutações lhes conferem vantagens de sobrevivência e proliferação sobre células saudáveis. Moléculas carcinógenas presentes no ambiente causam cânceres principalmente em tecidos com grande superfície de exposição como pele, pulmões e trato gastrointestinal (Loeb, 2008).

O hábito de fumar cigarros é a principal causa de câncer em humanos. A fumaça contém hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), sendo o benzopireno o mais abundante. Estes compostos são metabolizados a di-idrodióis, precursores de di-idrodiolepóxidos que podem se ligar a resíduos de guanina presentes nas moléculas de DNA (Figura 1). Isto interfere no processo de replicação de DNA aumentando a probabilidade de que ocorram mutações. A carcinogenicidade de HAPs aumenta com sua semelhança estérica a esteróides (Rubin, 2002).

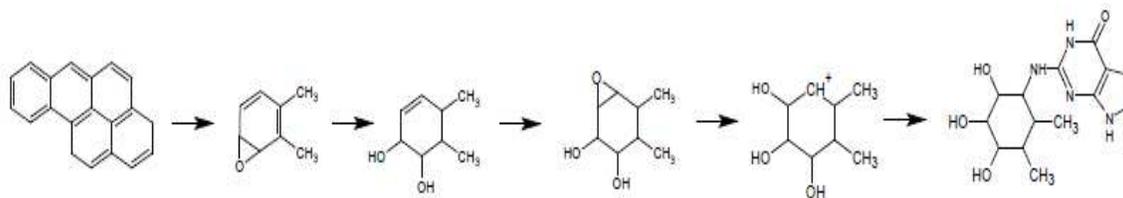


Figura 1- Metabolismo de benzopireno e ligação do metabólito di-idrodiolepóxido em molécula de guanina (Kuffe, 2003).

Aflatoxinas (Figura 2) são subprodutos do crescimento de fungos *Aspergillus* encontrados em grãos produzidos e estocados em locais úmidos. Eles podem se ligar às moléculas de DNA, provocando a abertura do anel imidazólico de resíduos de guanina e, conseqüentemente, promovendo erros durante a replicação, aumentando em até nove vezes o risco de desenvolver câncer no fígado (Poirer, 2004).

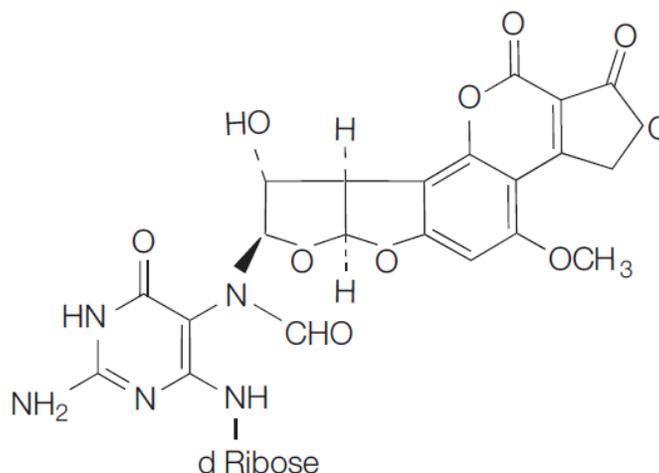


Figura 2 - Aflatoxina B1 ligada a resíduo de guanina, componente da molécula de DNA (Poirer, 2004).

O sistema imune pode participar ativamente no processo de carcinogênese. Em resposta a microorganismos patogênicos e toxinas, seus componentes liberam citocinas inflamatórias e espécies radicalares de nitrogênio e/ou oxigênio que podem danificar o DNA, induzindo fragmentação de cromossomos e modificando proteínas (Hussain, 2003; Loeb, 2008), danos que podem levar à transformação de células normais para um fenótipo maligno.

1.2.3. Radiação ionizante

Radiação ionizante, em doses elevadas, pode iniciar a carcinogênese ao colidir com moléculas do organismo gerando de radicais livres que causam dano aleatoriamente ao DNA e outros constituintes celulares, podendo inclusive romper ao mesmo tempo a dupla hélice de DNA. A exposição a este tipo de radiação

induz leucemia e outros cânceres (Rothkamm, 2002). Alguns tipos de radiação são mais carcinogênicos, pois são capazes de produzir radicais livres com maior eficiência. O dano biológico causado por altas doses de radiação ionizante pode ser exemplificado através das altas incidências de câncer em sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki e na população afetada pelo vazamento radiativo da usina nuclear de Chernobyl. O efeito biológico da exposição a baixas doses de radiação ainda não é claro (Bonner, 2003; Brenner, 2003; Brooks, 2007).

1.2.4. Vírus

Uma característica comum entre todos os cânceres é que suas células crescem aceleradamente ao adquirir vantagens sobre as originais, através de mutações genéticas. Quando vírus tumorais se integram ao DNA celular exercem o papel de carcinógenos, levando oncogenes às células ou ativando proto-oncogenes, que podem interferir na função celular através da produção de fatores de crescimento que desregulam o controle do crescimento e proliferação resultando em transformação maligna.

Vírus reconhecidos como causadores de neoplasias humanas têm capacidade de evitar a ação do sistema imunológico, permanecendo em estado latente no interior das células. Ao se integrarem ao genoma destas, as imortalizam para que sua própria replicação seja garantida. As células infectadas expressam genes virais que, por sua vez, são capazes de induzir crescimento e proliferação celular e evitar apoptose.

Vírus tumorais que portam moléculas de DNA (como HPV, EBV, HBV e KSHV) normalmente persistem no interior de células integrando seu genoma ao DNA celular ou se mantendo em formas episomais. Alguns vírus tumorais que portam RNA, como HIV e HTLV-1, utilizam da mesma estratégia. Já HCV, incapaz de integrar-se ao genoma celular, exerce papel tumorigênico como consequência da inflamação crônica que causa no tecido hepático (Carrilo-Infante, 2007).

1.3. Defesas naturais do organismo contra o câncer

Mutações genéticas podem fornecer vantagens em termos de proliferação e sobrevivência de células assim como aumentar sua suscetibilidade a outras mutações, possibilitando o surgimento e crescimento de uma população com fenótipo maligno que caracteriza um câncer primário. Elas ocorrem com frequência porém o organismo humano tem mecanismos de reparo que garantem a integridade do material genético celular e, conseqüentemente, da função celular.

Células mutadas podem escapar à reparação; porém, podem ser identificadas e destruídas pelo sistema imunológico que as detecta devido a diferenças encontradas no padrão de expressão de proteínas ou mesmo devido à expressão de proteínas mutadas.

1.3.1. Reparo de DNA

Células possuem uma série de mecanismos que atuam no reparo de DNAs alterados pela ação de agentes exógenos ou endógenos. Estes mecanismos garantem a perpetuação do fenótipo normal de cada tipo celular e previnem o aparecimento de populações de células malignas.

Existem vários modos de correção, dentre eles: reparo de bases mal pareadas, que reconhece e corrige nucleotídeos incorretamente pareados; reparo por excisão de nucleotídeos, que repara lesões extensas no DNA pela clivagem da ligação base nitrogenada – desoxirribose, eliminando trechos de DNA danificado contendo até 27 nucleotídeos e preenchendo a região com as bases corretas; reparo por excisão de bases, que repara lesões pequenas removendo pedaços defeituosos de DNA de até 13 nucleotídeos e preenchendo a região com as bases corretas; reparo direto, que atua na remoção de grupos alquila provenientes de mutações epigenéticas em bases nitrogenadas sem removê-las da fita de DNA (Hansen, 2000; Alberts, 2002).

1.3.2. Sistema imunológico

A principal defesa do organismo frente a células tumorais são os linfócitos T citotóxicos, descritos em detalhes no Capítulo 3.3 (Resposta imune frente a tumores) desta Dissertação.

1.4. Quimioterapia

A quimioterapia usa fármacos que atuam sistemicamente para destruir células que se dividem rapidamente, como as neoplásicas. A destruição de células sadias causa efeitos colaterais e adversos que muitas vezes limitam o uso de doses aceitáveis do fármaco. Ela pode ser executada sozinha ou aliada a terapias locais, diminuindo o tamanho do tumor antes da cirurgia (quimioterapia neoadjuvante) ou destruindo células malignas remanescentes após cirurgia e/ou radioterapia (quimioterapia adjuvante).

1.4.1. Ciclo celular

Alguns fármacos utilizados na quimioterapia de cânceres em geral agem interrompendo a divisão celular, com objetivo de inibir o crescimento acelerado de células tumorais. O ciclo celular é constituído de cinco fases: G_0 , G_1 , S, G_2 e M.

Durante a fase G_0 a célula desempenha sua função normal sem estar em processo de divisão. Na fase G_1 o metabolismo celular aumenta e são sintetizadas enzimas, proteínas estruturais e organelas necessárias para a reprodução celular. Em seguida, na fase S, o DNA é replicado. Quando todos os componentes celulares estão duplicados, a célula entra na fase G_2 , onde se prepara para a mitose produzindo fusos mitóticos. A última fase é a M, onde pares de cromossomos idênticos são separados em dois núcleos (mitose) e, enfim, a célula é dividida em duas novas (citocinese), que estarão em fase G_0 (Ferdinandi, 2009).

1.4.2. Agentes quimioterápicos

Agentes quimioterápicos podem ser separados em classes, de acordo com seu modo de ação e estrutura química: antimetabólitos, inibidores de mitose, alquilantes, antibióticos, inibidores de topoisomerase, anti-angiogênicos (American Cancer Society, 2009; sítio na web do INCA - Quimioterapia).

Antimetabólitos (5-fluorouracil, floxuridina, idoxuridina, citarabina, capecitabina, azacitidina, gemcitabina, fludarabina, tioguanina, pentostatina, cladribina, 6-mercaptopurina, metotrexato, pemetrexedo) são moléculas análogas de pirimidinas, purinas e ácido fólico e citidina e as substituem durante a produção de DNA e RNA interferindo neste processo e causando dano às células durante a fase S da divisão celular.

Inibidores de mitose (paclitaxel, docetaxel, ixabepilone, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, estramustina) agem durante a fase M da divisão celular inutilizando a proteína tubulina que é necessária para a migração de cromossomos durante a metafase, bloqueando o processo de mitose.

Alquilantes (mecloretamina, clorambucila, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan, estreptozocina, carmustina, lomustina, bussulfam, dacarbazina, temozolomida, tiotepa e altretamina) substituem átomos de hidrogênio por radicais alquila, impedindo a separação das fitas componentes da dupla hélice de moléculas de DNA e inviabilizando sua replicação. Cisplatina, carboplatina e oxalapatina não são alquilantes, mas também impedem a separação das fitas de DNA.

Antraciclinas (daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina) são antibióticos que inibem a síntese de DNA interagindo com enzimas envolvidas no processo de replicação e atuam em todas as fases do ciclo celular.

Inibidores de topoisomerase (topotecano, irinotecano, etoposídeo, teniposídeo, mitoxantrona) interferem na ação de topoisomerasas, enzimas que atuam na separação de fitas de DNA durante a replicação.

Anti-angiogênicos (bevacizumab, sunitinib, sorafenib, endostatina, talidomida) atuam inibindo a construção de vasos sanguíneos em tumores, interrompendo o suprimento de nutrientes à massa tumoral o que impede seu crescimento.

A maioria dos quimioterápicos destrói células que proliferam rapidamente, sejam elas neoplásicas ou que apresentem esta propriedade naturalmente como é o caso das células da medula óssea, cabelo, pele, boca e sistema digestivo.

Os efeitos adversos e colaterais mais comuns decorrentes do uso desses fármacos são: fraqueza; diarreia; alterações na pele; queda parcial ou total de cabelos e pêlos; náuseas e vômitos; mucosites na boca; infecções devido à diminuição do número de leucócitos (leucopenia); hemorragias devido à diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia); anemia devido à diminuição do número de glóbulos vermelhos (eritrocitopenia); tumores secundários; cardio, hepato e nefrotoxicidade; febre (NCI, 2007).

2. Fígado

É a maior glândula do corpo humano. Está situado na parte direita inferior da cavidade torácica e pesa cerca de 1,5 kg. É um órgão bastante vascularizado e apresenta coloração marrom-avermelhado escuro. Sua consistência é sólida, porém é bastante frágil, sendo facilmente lacerado (Gray, 1918).

2.1. Morfologia e anatomia

O fígado pode ser dividido, de maneira simplificada, em duas partes: o lobo direito e o esquerdo (Figura 3, visto da parte posterior). O direito é seis vezes maior que o esquerdo e são separados por um ligamento falciforme.

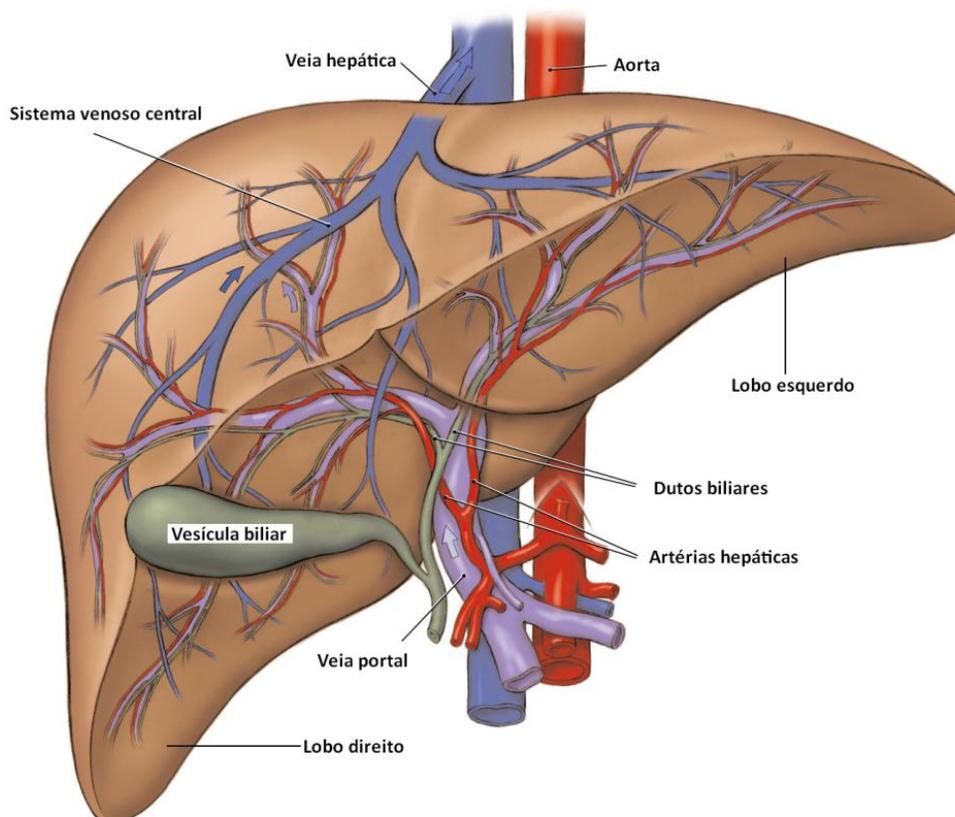


Figura 3 - Morfologia e anatomia simplificada do fígado (adaptado de <http://www.arizonatransplant.com/healthtopics/liver.html>).

As principais veias conectadas ao fígado são a artéria hepática, a veia porta e as veias hepáticas. Outra estrutura importante é o duto biliar que se encontra na parte posterior do lado direito e a artéria hepática no lado esquerdo. A veia porta está atrás e entre essas duas estruturas.

As veias hepáticas levam sangue venoso para fora do fígado. A veia porta, que drena sangue do sistema digestivo e glândulas associadas, e a artéria hepática, que leva sangue oxigenado ao fígado, entram neste órgão pela mesma cavidade e se dividem em canais e ramificações.

O fígado se mantém fixo na cavidade torácica, pois é ligado ao diafragma e pressionado para cima pelas vísceras. Além disso, as veias cava e hepática também ajudam na fixação de sua posição (Gray, 1918).

2.2. Histologia

O fígado é constituído de milhares de estruturas microscópicas hexagonais chamadas lóbulos, envoltas por tecido conectivo (Figura 4). Cada lóbulo é constituído por outros milhares de hepatócitos que se organizam ao redor de uma veia hepática central. Em cada vértice dos lóbulos existem ramificações da artéria hepática e veia porta, assim como dutos biliares.

Hepatócitos contribuem com quase 80% da massa do fígado e desempenham as principais funções deste órgão: metabólica, endócrina e secretória. Cada hepatócito faz fronteira com outros ou com sinusóides, estruturas capilares que permitem o trânsito de sangue até a veia lobular central (Figura 5).



Figura 4 - Hepatócitos organizados em lóbulos (estruturas hexagonais) ao redor de veias centrais (círculos brancos) (Bowen, 1997).

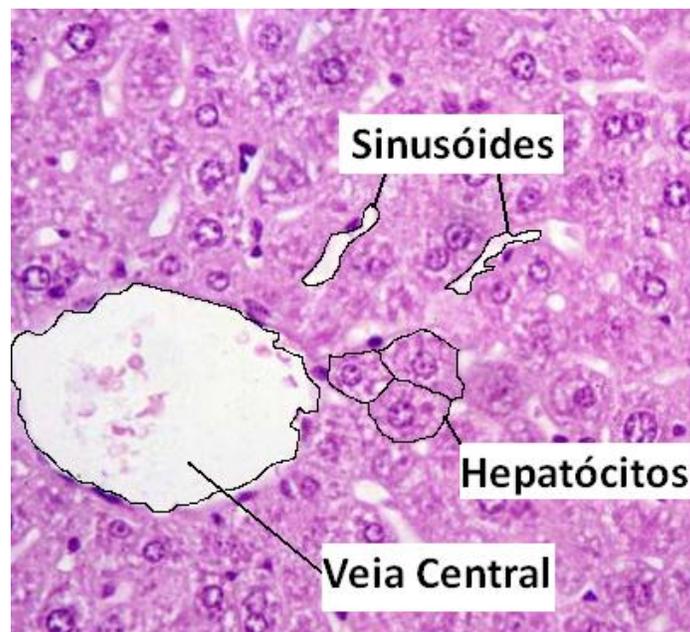


Figura 5 - Hepatócitos organizados ao redor de uma veia central e sinusóides hepáticos

2.3. Fisiologia

Centenas de processos químicos fundamentais ocorrem no fígado, órgão que pode ser considerado o laboratório do corpo humano. Nutrientes e outras moléculas absorvidas no trato gastrointestinal são levadas ao fígado onde são metabolizadas de acordo com as necessidades do organismo.

No fígado, proteínas como albumina sérica, fibrinogênio, protrombinas, proteína C, proteína S, antitrombina e lipoproteínas são sintetizadas, assim como colesterol e triglicerídeos que quando em excesso são preparados para o estoque em adipócitos. Células de Kupffer destroem micróbios, ingerem eritrócitos velhos e desativam substâncias tóxicas de origem endógena ou exógena como hemoglobina, etanol e algumas drogas. Hepatócitos armazenam substâncias, como vitaminas A, B12, D, E, K, minerais como ferro e cobre, glicose na forma de glicogênio e também convertem amônia, fruto do processo de desaminação de aminoácidos, rapidamente em uréia. Insulina e outros hormônios são desativados no fígado. Neste órgão se produz a bile que é armazenada na glândula biliar e excretada no duodeno para auxiliar o processo de digestão de gorduras (Guyton, 2000).

3. Hepatocarcinoma

Carcinoma hepatocelular (CHC) é um câncer primário de fígado, sendo um dos cinco cânceres mais comuns em todo o planeta. É caracterizado pela resistência à quimioterapia e pela rápida progressão, não existindo nos dias de hoje qualquer tratamento sistêmico que seja efetivo contra esta enfermidade que é responsável por cerca de 600.000 mortes ao ano em todo o globo (Pang, 2007; But, 2008).

Geralmente a doença é diagnosticada quando em estágio avançado e frequentemente associada à cirrose (Bolondi, 2001) que pode ser resultado de diferentes etiologias responsáveis por dano hepático, como hepatite viral, álcool, sobrecarga de ferro e outros (Villanueva, 2010). Este quadro torna o tratamento de CHC mais complexo que os de outros cânceres, pois neste caso o fígado é afetado por cirrose e pela progressão tumoral, o que contribui para que a expectativa de vida destes pacientes seja muito pequena.

Programas de vigilância em pacientes cirróticos têm facilitado a detecção de CHC em estágios precoces, permitindo melhores prognósticos. Porém, somente 1/3 dos casos diagnosticados é elegível para terapias potencialmente curativas, como cirurgia para ressecção tumoral e transplantes de fígado. (Bruix, 2005).

Novas terapias e técnicas de diagnóstico precoce de CHC são necessárias, senão imprescindíveis, para diminuir a incidência, o avanço e letalidade dessa neoplasia.

3.1. Epidemiologia

3.1.1. Distribuição dos casos

Os casos de CHC são heterogeneamente distribuídos entre as regiões do globo (Figura 6) e também entre gêneros, raças e idades (El-Serag, 2007). Esta distribuição não é homogênea devido às particularidades regionais, que levam a exposições diferentes das populações a fatores de risco como hepatites B (HBV) e C (HCV), aflatoxina, consumo de álcool, dentre outros (Bosch, 2004).

Por exemplo, a incidência de CHC em países do leste asiático e África subsaariana é muito alta em relação ao resto do planeta. Só a China abriga 50% dos indivíduos com esta doença (El-Serag, 2007).

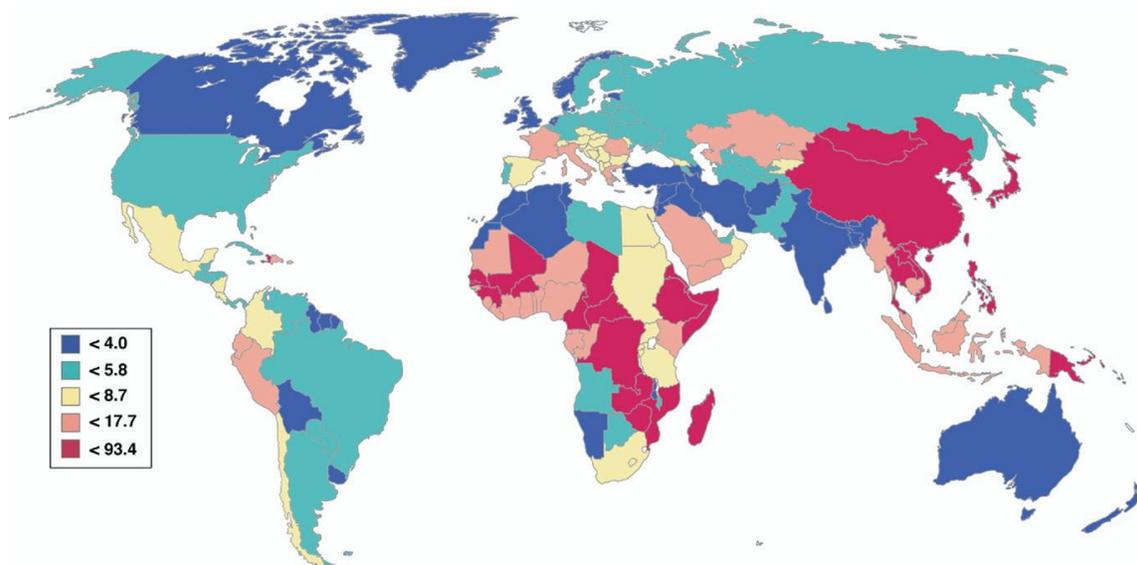


Figura 6 - Incidência/100.000 habitantes de CHC na população mundial (El-Serag, 2007)

Em uma mesma população, as diferentes etnias e raças desenvolvem CHC com freqüências distintas. Por exemplo, nos Estados Unidos, duas vezes mais indivíduos de origem asiática são diagnosticados com CHC que negros afro-americanos e estes, duas vezes mais que americanos caucasianos. As razões para estas diferenças podem ser inúmeras: genéticas, culturais, sociais ou mesmo a mistura destas.

Homens são mais afetados por CHC que mulheres (Figura 7). Alguns estudos afirmam que a concentração do hormônio testosterona e a maior massa corpórea masculina poderiam ser responsáveis por esta diferença (Bosch, 2004).

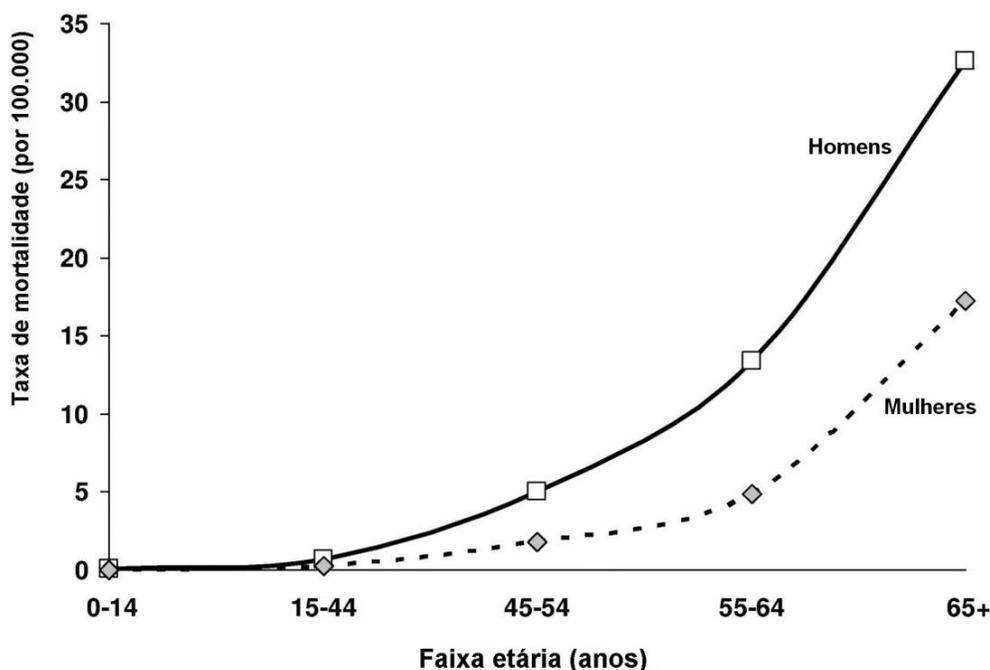


Figura 7 - Mortalidade por CHC nos EUA em homens e mulheres em função da idade (adaptado de Bosch, 2004).

Quase 90% dos casos de carcinoma hepatocelular surgem em fígados cirróticos, decorrente ou não de alcoolismo, hepatites B ou C. Isto significa que a doença raramente ocorre em fígados saudáveis, mas sim em fígados já acometidos com uma enfermidade que geralmente resulta de longos períodos de consumo exagerado de álcool ou pelas contínuas lesões resultantes de um quadro crônico de hepatite (Bosch, 2005).

As curvas de incidência média de CHC em função da idade do indivíduo (Figura 8) refletem o longo período envolvido no processo de hepatocarcinogênese: baixa incidência durante a infância e juventude e um súbito aumento de casos aos 45 anos, estabelecendo-se um *plateau* aos 65 anos.

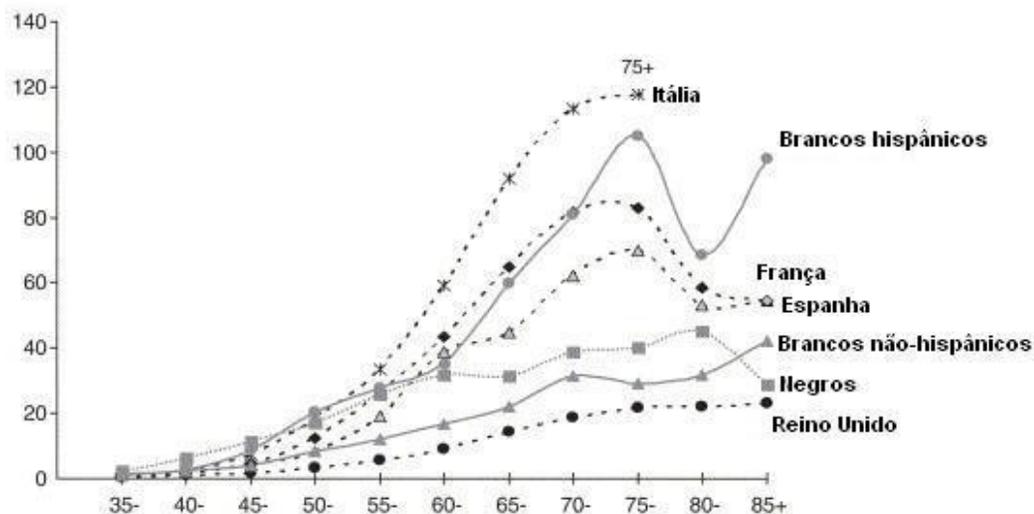


Figura 8 - Incidência média de CHC em função da faixa etária em alguns países e dentro de grupos étnicos norte-americanos (adaptado de Bosch, 2005).

3.1.2. Fatores de risco

O CHC normalmente surge em indivíduos com histórico de doenças crônicas do fígado, como as hepatites B (HBV) e C (HCV) e cirrose. Doenças associadas ao consumo de álcool e autoimunes do fígado, hemocromatose primária e doença de Wilson também são associadas ao desenvolvimento de CHC, assim como tumores com metástase hepática e exposição à aflatoxina (El-Serag, 2007).

i) Hepatites B e C

A importância da infecção por hepatites B e C no desenvolvimento de CHC varia bastante entre os países (Figura 9). Na maioria dos países da Ásia e África, assim como no Brasil, pacientes com CHC estão infectados por HBV; já na América do Norte e Europa, assim como no Japão, a infecção dos pacientes por HCV é mais frequente. Em alguns países asiáticos mais de 10% dos pacientes estão co-infectados por ambos os vírus da hepatite. Nos EUA e países nórdicos da Europa a prevalência da ausência de infecção por hepatite aponta para a importância de outros fatores de risco, como o consumo exagerado de álcool (Raza, 2007).

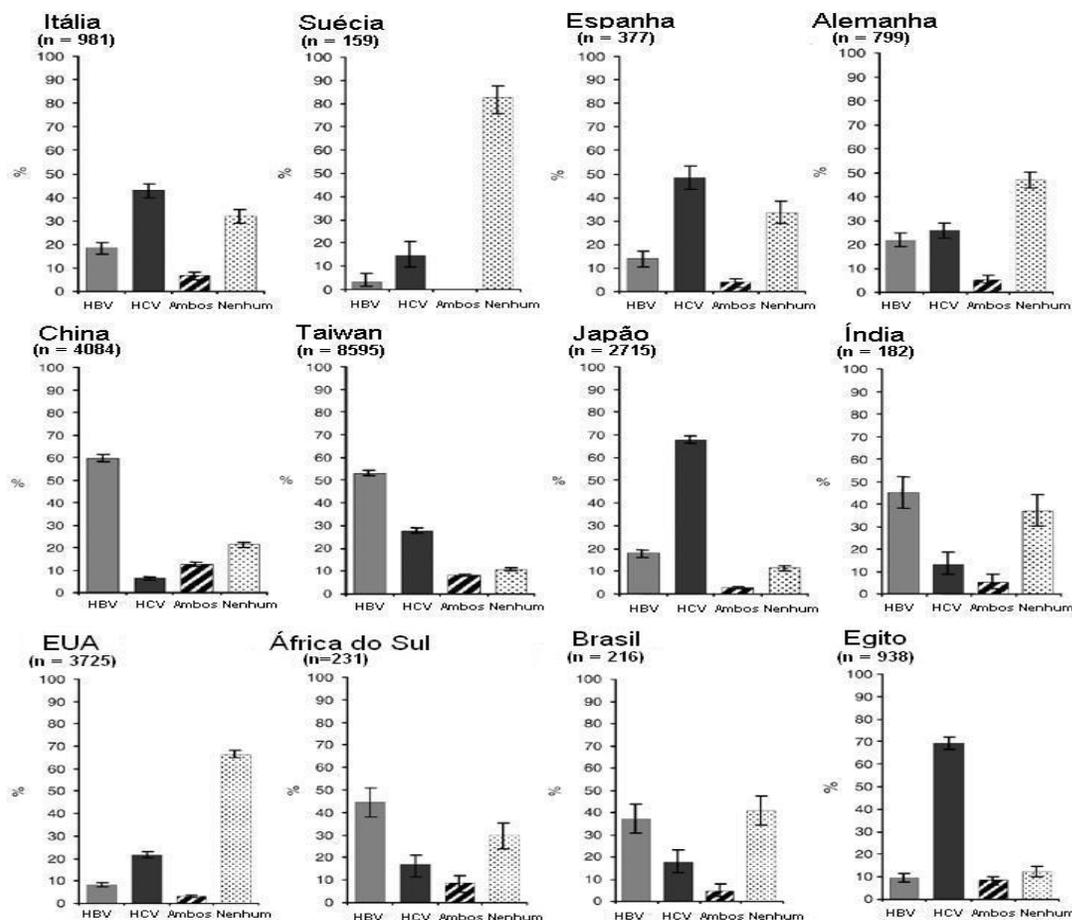


Figura 9 - Presença de vírus da HBV/HCV em pacientes diagnosticados com CHC (n: número de pacientes analisados) (Raza, 2007)

Estima-se que nos países desenvolvidos 23% dos casos de CHC podem ser atribuídos à infecção por HBV e 20% à HCV. Nos casos em países em desenvolvimento esses valores são, respectivamente, 59% e 33% (Raza, 2007).

Um programa nacional de vacinação contra HBV foi implementado em Taiwan em 1984. Como resultado, analisando a incidência de CHC em crianças de 6 a 14 anos deste país entre os anos de 1981 a 1994, observou-se que a incidência anual média por 100.000 indivíduos caiu de 0,70 entre 1981 e 1986 para 0,57 entre 1986 e 1990 e para 0,36 entre 1990 e 1994 (Chang, 1997).

Estes dados suportam iniciativas de prevenção de infecção por hepatites como política pública de saúde, através de vacinação ou mesmo práticas seguras de injeção e cuidados especiais na coleta de sangue para doação.

No Brasil, o Ministério da Saúde criou em fevereiro de 2002 o Programa Nacional para Prevenção e Controle das Hepatites Virais (PNHV) (Ferreira, 2004; Ministério da Saúde, 2002).

ii) Álcool

A ingestão exagerada de álcool por longos períodos é fator de risco muito bem estabelecido para CHC. O consumo diário de mais de 75 g de álcool pode induzir dano hepático e toxicidade levando ao desenvolvimento de fibrose e cirrose (Donato, 2002).

Durante o metabolismo do etanol são gerados acetaldeído e radicais livres que estão associados ao desenvolvimento de doenças do fígado (Lieber, 1990). Neste sentido, pode-se especular que a frequência destes mecanismos deve aumentar com maior consumo de álcool e que, conseqüentemente, o desenvolvimento destas doenças está correlacionado com a magnitude do consumo de álcool (Hassan, 2002).

Alcoólatras de longa data que param de beber correm risco de desenvolver CHC. Uma explicação é que, nestes indivíduos, o fígado se regenera e este processo aumenta o risco de CHC, porém os que não param podem morrer de complicações relacionadas ao aumento de pressão na veia porta hepática antes que o câncer possa se desenvolver (Morgan, 2004; Donato, 2002).

Há evidências de sinergia entre consumo exagerado de álcool e infecção por HCV/HBV, fatores estes operando juntos no aumento do risco de ocorrência de CHC devido à maior probabilidade de desenvolver cirrose (Donato, 1997).

iii) Aflatoxina

Aflatoxinas (Figura 2) são produzidas por fungos presentes em culturas de soja, amendoim e em cereais armazenados sob condições de alta umidade e temperatura. Experimentos com animais mostraram que estas toxinas são hepatocarcinógenos potentes, o que levou a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) a classificá-las como carcinogênicas.

Algumas ações individuais ou coletivas podem ser tomadas com objetivo de diminuir a exposição da população a aflatoxinas. Por exemplo, um indivíduo pode ser instruído a mudar sua dieta alimentar eliminando ou evitando alimentos que são frequentemente contaminados por essas toxinas. Outra medida é que os indivíduos que consomem estes alimentos sejam medicados com agentes que reduzam a toxicidade da aflatoxina uma vez já ingerida. Outra opção é a modificação genética dos grãos inibindo a presença do fungo produtor de aflatoxinas (Turner, 2002).

Intervenções para reduzir a exposição às aflatoxinas apresentam grande impacto, especialmente em populações onde a infecção por HBV é endêmica (Turner, 2002).

iv) Câncer colo-retal

Este fator etiológico de CHC é uma neoplasia maligna que afeta a parede intestinal e é responsável pela morte de aproximadamente 650.000 pessoas por ano, sendo o terceiro tipo mais comum no mundo (Simmonds, 2006). Mais de 20% dos pacientes diagnosticados em fase avançada possuem metástases isoladas no fígado, pois a circulação venosa do intestino grosso é feita pela veia porta hepática. Estes focos são detectados geralmente por tomografia computadorizada do abdomen (Garden, 2006).

Este câncer em geral está relacionado ao sedentarismo, obesidade, tabagismo, história familiar de câncer colo-retal, predisposição genética, dieta rica em carnes vermelhas e, possivelmente, à dieta pobre em fibras.

Na maioria das vezes, o diagnóstico de câncer colo-retal é feito através de colonoscopia e o tratamento consiste na retirada cirúrgica do tumor. A retirada de nódulos metastáticos no fígado garante sobrevida de 5 anos à 50% dos pacientes, porém se não retirados o prognóstico é muito ruim (Fong, 1995). Além disso, pode haver necessidade de tratamento complementar com quimioterapia e radioterapia para evitar recorrência.

3.2. Sintomas

Muitos pacientes com CHC inicialmente não apresentam sintomas. Em países onde câncer de fígado é muito comum, ele é descoberto geralmente em estágios muito avançados. Estes estão em sua maioria no grupo de países em desenvolvimento onde o acesso à saúde ainda é limitado e, ao mesmo tempo, nos quais programas de vigilância de pacientes pertencentes a grupos de risco (portadores de hepatite, pacientes cirróticos) não estão disponíveis.

Dor abdominal é o sintoma mais comum de CHC e normalmente indica a existência de um tumor bastante grande ou com amplo comprometimento do fígado. Um fígado inchado e algumas vezes enrijecido é sinal comum.

CHCs são muito vascularizados e isto resulta no aumento do fluxo sanguíneo na artéria hepática, causando turbulência. Esta produz um som alterado no fígado que pode ser ouvido, em ≈50% dos pacientes, com estetoscópio (sítio na web do “University of Southern California Comprehensive Liver Cancer Center”).

Outro sinal de CHC em pacientes com cirrose é o aparecimento súbito de uma série de complicações, como acúmulo de líquido na região abdominal (ascite), amarelamento/esverdeamento da pele e perda de massa muscular sem causas aparentes.

CHC metastático se espalha frequentemente pelo fígado, provavelmente devido ao sentido da corrente sanguínea. Normalmente, pacientes com este tipo de metástase não apresentam sintomas e são diagnosticados através de exames de raios-X.

Em geral, os sintomas do hepatocarcinoma estão relacionados ao comprometimento da função do fígado e geralmente indicam presença de câncer avançado.

3.3. Diagnóstico

3.3.1. Marcadores moleculares

A detecção de uma série de moléculas presentes no soro sanguíneo (alfa-fetoproteína, des-gama-carboxiprotrombina, alfa-L-fucosidase, glipicana-3, antígeno de carcinomas de células escamosas, proteína 73 do complexo de Golgi, fator de crescimento de hepatócitos, fator transformador de crescimento β 1) vem sendo utilizada clinicamente no diagnóstico de hepatocarcinoma.

i) Alfa-fetoproteína (AFP)

O primeiro exame laboratorial a ser feito em pacientes com suspeita de câncer hepático é a dosagem sérica de alfa-fetoproteína (AFP), proteína presente em fetos em fase de desenvolvimento e cuja expressão é reprimida em indivíduos adultos (Wright 2007).

Valores de concentração maiores que 20 ng/mL, e acima de 400 ng/mL em pacientes com cirrose ou hepatite B ou C, são indicativos da presença de CHC, mas não oferecem diagnóstico conclusivo, já que alguns pacientes com CHC apresentam níveis normais de AFP e outras enfermidades hepáticas também podem elevar seu nível sérico.

ii) Des-gama-carboxiprotrombina (DCP)

Uma forma alterada da proteína pró trombina, normalmente secretada por hepatócitos, conhecida como des-gama-carboxiprotrombina (DCP) pode ser encontrada no soro de pacientes de CHC. Esta proteína é produzida em células malignas devido a um defeito na expressão do gene que codifica a enzima gama-carboxilase (Wright 2007).

Em diagnósticos clínicos, indicam com bastante especificidade a presença de hepatocarcinoma. Ao mesmo tempo, o método não é sensível o suficiente para a detecção de tumores menores que 3 cm, sendo pouco conclusivo na determinação de ausência de CHC.

iii) Alfa-L-fucosidase (AFU)

Alguns estudos têm indicado que a dosagem de alfa-L-fucosidase, enzima envolvida no catabolismo de glicoconjugados contendo fucose, pode ser útil como teste complementar à quantificação de AFP (Giardina, 1991).

Sua concentração no soro de pacientes com CHC é elevada em relação aos sadios, sendo indicativo da enfermidade nível maior que 443 nmol/mL. Além disso, a atividade de AFU não é elevada somente em CHC primário mas também em casos de câncer colo-retal e de ovário.

iv) Glipicana-3 (GPC3)

É uma glicoproteína expressa em mais de 70% dos tecidos acometidos por CHC e ausente em hepatócitos de indivíduos sadios ou portadores de hepatite. GPC3 também está presente no soro sanguíneo em mais de 50% dos pacientes com CHC e não é detectada no soro de indivíduos sadios ou com hepatite crônica(Wright 2007).

A detecção conjunta de AFP e GPC3 fornece informação segura, com alta sensibilidade e especificidade, no diagnóstico de CHC.

v) Antígeno de carcinomas de células escamosas (SCCA)

SCCA é um inibidor de serino-proteases, expressado por células da pele e epiteliais escamosas, sendo super expressado em tecidos com CHC (Gianelli, 2005)

Níveis séricos de SCCA maiores que 0,37 ng/mL podem indicar, com bastante sensibilidade, a presença de hepatocarcinoma; porém, é um método pouco seletivo já que esta molécula também pode ser detectada em tecidos de câncer de pele, pescoço e cabeça, dentre outros. Por conta disto sua dosagem no diagnóstico de CHC é pouco utilizada.

vi) Proteína 73 do complexo de Golgi (GP73)

GP73 é uma proteína trans-membranar, específica do complexo de Golgi, expressada no fígado sadio em células do epitélio biliar e quase ausente em hepatócitos. A expressão de GP73 em hepatócitos é detectável em pacientes com hepatite aguda, cirrose e hepatocarcinoma derivado de HBV ou HCV (Marrero, 2005 b)

A dosagem de GP73 permite sua detecção precoce de CHC em pacientes com cirrose com mais eficiência em comparação à dosagem tradicional de AFP.

vii) Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)

HGF é uma citocina mitogênica, morfogênica e antiapoptótica. Tem sido utilizada como marcador no prognóstico de pacientes com CHC, já que níveis séricos maiores ou iguais a 1,0 ng/mL têm sido associados à baixa sobrevida. Também pode ser utilizado na predição precoce de recorrência tumoral após hepatectomia parcial (Gomaa, 2009).

viii) Fator transformador de crescimento – $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)

TGF- β é uma citocina multifuncional, importante na supressão da resposta imune e carcinogênese. Níveis séricos desta citocina e do respectivo mRNA em pacientes com CHC são significativamente altos se comparados com pacientes de enfermidades hepáticas não-malígnas (Gomaa, 2009).

Quando sua dosagem, usando o valor limite de 1,2 $\mu\text{g/L}$, é feita simultaneamente à de AFP a especificidade de detecção de CHC chega a impressionantes 97,4%, fazendo dessa combinação uma poderosa ferramenta no diagnóstico deste tumor.

3.3.2. Métodos de diagnóstico por imagem: US, CT e MRI.

As principais tecnologias utilizadas para obtenção de imagens do fígado são tomografia computadorizada (CT), ultrassonografia (US) e ressonância magnética nuclear (MRI) (Outwater, 2010).

US é uma técnica fundamental para obter imagens do fígado, de forma rápida, simples e barata e é a mais utilizada em avaliações periódicas e rotineiras.

A resolução das imagens obtidas é baixa, o que dificulta a avaliação de lesões pequenas. Porém, ela pode ser melhorada com agentes de contraste. Em contrapartida, altas resoluções podem ser obtidas quando executada diretamente no fígado durante cirurgias, sendo mais sensível que CT e MRI em pequenas lesões.

Esta técnica é ferramenta valiosa em procedimentos de intervenção, em tempo real, no fígado, como biópsias, injeção percutânea de etanol e ablação por radiofrequência.

A ultrassonografia apresenta duas principais limitações: os resultados dependem da habilidade do ultrassonografista e em alguns casos é difícil diferenciar um nódulo maligno dentre outros benignos. Nestes casos a técnica de CT é a mais indicada.

A CT é utilizada em fígados cirróticos ou não na sondagem de CHC. Ela permite avaliar anatômica, inteira e homoganeamente o fígado e, em comparação com a ultrassonografia, permite avaliação sistemática de metástases extra-hepáticas. Uma desvantagem é que a técnica requer o uso de contraste intravenoso.

CT é capaz de mostrar localização, artérias e drenagem venosa de CHCs. Tumores pequenos podem ser identificados por apresentarem hiper vascularização devido à angiogênese. A varredura também é útil na avaliação do CHC após intervenções terapêuticas como ressecção e ablação. É útil para avaliar os resultados de terapias como embolização ou quimioterapia.

Imagens por MRI são obtidas usando radiofreqüências na presença de fortes campos magnéticos que perturbam prótons de moléculas de água e lipídeos presentes em tecidos vivos. O contraste na imagem é dado pelas diferentes suscetibilidades magnéticas dos tecidos e concentrações de água e lipídeo.

Esta técnica não utiliza radiações ionizantes, o que permite ao paciente exposição extensa que fornece informações mais detalhadas sobre tecidos, órgãos e tumores. Por esta razão é mais poderosa que a CT na caracterização dos mesmos.

Existe, ainda, a possibilidade de utilizar contrastes especiais que são absorvidos pelas glândulas biliares ou por células de Kupffer. A técnica permite distinguir várias possíveis lesões hepáticas como cistos, hemangiomas e focos de CHC.

Apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico por imagem como US, CT e MRI, ainda restam limitações na determinação do estágio da doença e localização de recorrência, assim como dificuldades na avaliação da resposta do paciente a determinado tratamento (Kudo, 2008). Neste sentido, esforços têm sido feitos no desenvolvimento de técnicas e dispositivos que possibilitem caracterizar regiões menores de tecido e sua fisiologia.

3.4. Prognóstico

Para escolher a opção de tratamento mais adequada para um paciente com CHC dentre as opções disponíveis, se faz necessária a definição de seu prognóstico, tarefa bastante importante e extremamente complicada. Além de fornecer informações clínicas como expectativa de vida, o prognóstico também é essencial para comparações entre grupos de ensaios clínicos e entre estudos distintos (Kudo, 2003; Marrero, 2005).

Idealmente, um sistema de prognóstico para CHC deve sugerir a opção de tratamento mais apropriada e ajudar a prever a sobrevivência dos pacientes de distintos grupos a partir de variáveis individuais (Cillo, 2006). Alguns sistemas de prognóstico para CHC foram propostos e muito se tem debatido sobre qual seria o melhor. Dentre eles, os sistemas: *UNOS-modified Tumor Node Metastasis* (TNM), *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), *Cancer of Liver Italian Program* (CLIP), *Japanese Integrated System* (JIS), *Groupe d'Etude de Traitement du Carcinoma Hepatocellulaire* (GRETCH), *Chinese University Prognostic Index* (CUPI) e o sistema de Okuda (Marrero, 2005).

O sistema de Okuda é um dos mais populares para determinar o estágio de CHC, pois inclui informações sobre tamanho tumoral e status funcional do fígado na definição de prognóstico. Porém, este sistema foi desenvolvido na década de setenta, quando os pacientes eram diagnosticados em sua maioria em estágio avançado. Nos dias de hoje este sistema está defasado, pois não considera fatores importantes na determinação de prognóstico para pacientes com CHC em estágio inicial (Kudo, 2003).

O sistema BCLC inclui variáveis como: status tumoral (que diz respeito ao tamanho e número de nódulos), morfologia e espalhamento extra-hepático, função hepática (determinada pelos níveis de bilirrubina), presença de hipertensão porta e classificação de Child-Pugh e sintomas, cujo status é avaliado pelo teste de performance ECOG. Este sistema é atualmente o que proporciona os prognósticos mais realistas e ajuda na escolha da melhor terapia a ser seguida (Villanueva, 2010; Marrero, 2005).

De acordo com essa classificação (Tabela 1), pacientes em estágio inicial (estágio 0-A) podem sobreviver mais que 60 meses se tratados com terapias potencialmente curativas como ressecção cirúrgica, transplante ou ablação percutânea. Pacientes em estágio intermediário (estágio B) podem chegar a 20 meses de sobrevivência seguindo quimioembolização e os diagnosticados com CHC em estágio avançado (estágio C) podem sobreviver quase 11 meses em regime de quimioterapia, utilizando o inibidor de tirosina cinase Sorafenib.

Tabela 1 - Sistema de estágios BCLC: utiliza status tumoral, status de funcionalidade do fígado e saúde do paciente na definição de prognósticos.
(adaptado de Villanueva, 2010)

| | Estágio Inicial (BCLC -0/A) | Estágio Intermediário (BCLC -B) | Estágio Avançado BCLC -C) | Estágio Terminal (BCLC -D) |
|-------------------------------|---|--|--|--|
| | - Nódulo único ou três nódulos com até 3 cm de diâmetro. -Sem comprometimento extra-hepático. - Status de performance ¹ 0 - Child-Pugh ² A | - Nódulos múltiplos - Sem comprometimento extra-hepático - Status de performance 0 | - Invasão da artéria porta - Espalhamento extra-hepático presente. - Status de performance 1-2 | - Status de performance >2 - Child – Pugh C |
| Terapia Padrão | Tratamentos curativos | Quimioembolização | Sorafenib | Sintomático |
| Sobrevivência Prevista | >60 meses | ~20 meses | ~11 meses | <3 meses |

¹Escala ECOG de performance: definida em termos da progressão da doença e estado de saúde do paciente. ²Classificação de Child-Pugh: usada para avaliar o prognóstico de pacientes com doença hepática crônica.

3.5. Tratamento

3.5.1. Tratamentos curativos

Pacientes diagnosticados com CHC em estágio inicial podem ser tratados com terapias curativas, como ressecção cirúrgica, transplante de fígado e ablação percutânea, o que confere sobrevida de 5 anos em até 70% dos casos tratados (Singal, 2010).

i) Transplante de fígado

Na década de 80 e início dos anos 90, transplantes de fígado apresentavam resultados desanimadores como terapia contra CHC. O critério de Milão, elaborado em 1996, permitiu identificar grupos de pacientes com CHC com menor probabilidade de desenvolver recorrência tumoral e maior sobrevivência após o transplante. A partir de então, esta terapia mostrou-se eficaz no tratamento de carcinomas hepatocelulares pequenos e não removíveis, sendo o único procedimento que, simultaneamente, trata o câncer e outra doença hepática instalada, como cirrose (Mazzafero, 1996; Pelletier, 2009).

Infelizmente quase 70% dos pacientes são diagnosticados em estágio avançado e o transplante nestes casos não proporciona sobrevida relevante. Em termos de saúde pública, também é desinteressante, pois afeta diretamente outros pacientes que apresentariam melhores prognósticos pós-transplante (Volk, 2008).

ii) Hepatectomia

A retirada cirúrgica de tecido hepático maligno, conhecida por hepatectomia, é considerada como potencialmente curativa e apresenta melhores resultados em termos de sobrevida do paciente quando seguida por quimioembolização arterial (Chong Zhong, 2009).

Nos casos de CHC precocemente detectado o transplante de fígado é a terapia mais adequada devido à alta incidência de recorrência quando pacientes são sujeitos à ressecção. Porém, o transplante deixa o paciente vulnerável a

infecções relacionadas ao posterior tratamento com imunossupressores e, quando se opta pelo transplante, o tempo de espera pelo órgão pode levar o paciente à progressão tumoral tal que o transplante já não é eficaz.

Uma abordagem interessante é a ressecção, que pode ser executada com brevidade e enquanto o paciente aguarda pela disponibilidade de fígado, seguida então pelo transplante, evitando assim que a progressão do tumor o exclua do grupo de pacientes operáveis (Poon, 2006).

iii) Ablação percutânea

É a melhor alternativa para pacientes em estágio inicial de CHC que não são elegíveis para transplante de fígado ou cirurgia de ressecção tumoral. As duas técnicas mais usadas são a Injeção Percutânea de Etanol (PEI) e a ablação por radiofrequência (RFA) (Singal, 2010).

A ablação por radiofrequência consiste na destruição de células tumorais de uma região limitada de tecido hepático, induzida por radiação, necrosando o tecido doente (Brunello, 2008).

Esta terapia foi proposta como alternativa à injeção percutânea de etanol para tratamento de pequenos tumores de CHC, não removíveis cirurgicamente (Rossi, 1996).

Existem duas modalidades de radioterapia: a interna, que usa isótopos radioativos como Ítrio-90 (^{90}Y), Iodo-131 (^{131}I) e Hólmio-199 (^{199}Ho) e a externa, que usa fonte externa de radiação (Seong, 2009; Gough-Palmer, 2008).

A resposta dos pacientes frente à RFA é pouco superior à PEI, mas os ganhos em termos de sobrevida e custo-benefício não são significativos (Brunello, 2008).

3.5.2. Tratamentos paliativos

Têm como objetivo melhorar a qualidade de vida de pacientes com quadro grave até que venham a óbito, amenizando o sofrimento causado por incômodos decorrentes da doença como habilidades motoras limitadas e dor.

No caso de CHC em estágios intermediário e avançado os tratamentos são paliativos e a quimioembolização transarterial e a quimioterapia sistêmica são os mais empregados.

i) Quimioembolização transarterial (TACE)

Tumores grandes são muito dependentes da artéria hepática e o restante do fígado em sua maior parte depende do sangue proveniente da veia porta para se nutrir. A quimioembolização transarterial proporciona entrega seletiva de quimioterápicos intra-arterialmente ao tumor, com ajuda de um catéter inserido através da artéria femoral, seguida por embolização que obstrui a irrigação do tecido doente, com objetivo de induzir necrose. Este tratamento confere sobrevida de 2 anos em até 63% dos casos (Singal e Marrero, 2010).

ii) Quimioterapia sistêmica

A eficácia da quimioterapia sistêmica nunca havia sido demonstrada em CHC. Apesar da falta de evidências, doxorubicina (Figura 10) é aceita por alguns médicos como um possível tratamento ao mesmo tempo em que outros desaconselham esta prática (Bruix, 2005). Em alguns ensaios clínicos recentes, a combinação de cisplatina, doxorubicina, 5-fluorouracil e interferon não mostraram qualquer vantagem em comparação à doxorubicina administrada sozinha (Edeline, 2009).

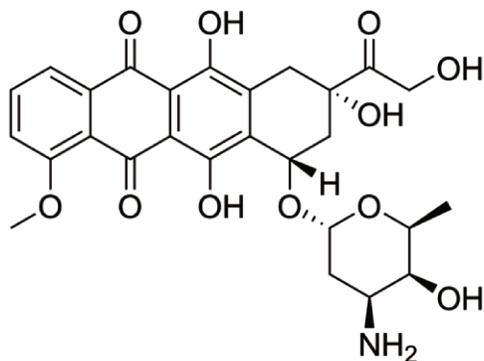


Figura 10 - Fórmula estrutural da Doxorubicina.

Mais recentemente, em pacientes com CHC avançado, o fármaco Sorafenib (Nexavar; Bayer Pharmaceuticals Corp., West Haven, Connecticut, USA) (Figura 11) mostrou-se de certa forma eficiente conferindo ≈ 3 meses de vida a mais aos pacientes tratados em relação aos que receberam placebo (Llovet, 2008).

Sorafenib é inibidor de múltiplas cinases, bloqueando a proliferação de células tumorais e aumentando a taxa de apoptose. Seus alvos incluem serina-treonina cinases (Raf-1 e B-Raf), o receptor tirosina cinase de fatores de crescimento epiteliais vasculares (VEGFRs) e o receptor B do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). Ele atua interferindo em mecanismos de sinalização que são desregulados e em receptores super expressados em CHC (Zhang, 2010).

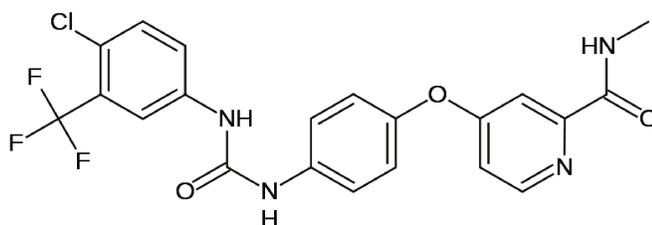


Figura 11 - Fórmula molecular do Sorafenib.

Este fármaco representa a primeira terapia sistêmica dos últimos 30 anos que é efetiva contra CHC avançado. As pesquisas atuais focam na combinação de terapias moleculares, basicamente Sorafenib e inibidores de EGFR como Erlotinib,

inibidores de mTOR como Everolimus, inibidores de c-MET ou de IGF. Também estão sendo testadas terapias antiangiogênicas utilizando Bevacizumab, Sunitinib e Brivanib (Villanueva, 2010).

Mesmo assim, as quimioterapias sistêmicas continuam sendo uma péssima opção no caso de pacientes em estágio inicial e intermediário de CHC, e mesmo nos casos avançados, onde a quimioterapia de maior eficiência age de maneira paliativa e apenas confere alguns meses de vida a mais ao paciente.

4. Imunoterapia

Novas estratégias que inibam o desenvolvimento e recorrência de carcinomas hepatocelulares são necessárias (Butterfield, 2004). O tratamento sistêmico usual é a quimioterapia, que tenta destruir células tumorais através de fármacos que bloqueiem o processo de divisão celular ou que as destruam enquanto se dividem. Esta abordagem também leva à destruição de células saudáveis provocando uma série de efeitos adversos graves nos pacientes, como perda de massa corporal, náusea, diarreia, queda de cabelos; podendo inclusive levá-los a óbito em alguns casos (ver detalhes no capítulo 1.4. Quimioterapia).

Uma abordagem moderna em quimioterapia antineoplásica é a imunoterapia, que tem como proposta usar o sistema imunológico do paciente contra o câncer, com vantagem de ser específica, auto-regulada e sensível, encontrando seu alvo onde quer que esteja. Ela já vem sendo utilizada em vários regimes de tratamento, muitas vezes aliada à quimioterapia tradicional (Dougan, 2009).

Em geral, a imunoterapia contra o câncer se vale do fato de que células tumorais expressam uma série de proteínas que podem ser reconhecidas como antígenos pelo sistema imunológico. Algumas terapias já estabelecidas empregam diferentes estratégias para ativar a imunidade antitumoral, dentre elas: imunização passiva com anticorpos monoclonais (Weiner 2010), administração sistêmica de citocinas (Dranoff, 2004; Fyfe, 1995), vacinas e células dendríticas ativadas com antígenos (Andrews, 2008; Timmerman, 1999).

4.1. Sistema imunológico

Um sistema imunológico deve ser capaz de reconhecer e destruir uma série de patógenos e, ao mesmo tempo, capaz de tolerar a presença de antígenos produzidos pelo próprio indivíduo (Janeway, 2002).

Humanos possuem dois sistemas que trabalham em cooperação: o sistema imunológico inato, que atua na defesa imediata do organismo frente a um micróbio e o sistema imunológico adaptativo, que molda sua resposta imune em função da natureza do invasor, tornando-a específica e eficiente (Abbas, 2003).

4.1.1. Sistema imunológico inato

O sistema imunológico inato é geneticamente programado para detectar propriedades invariantes de micróbios invasores através de uma série de receptores secretados na corrente sanguínea ou presentes na superfície celular e em compartimentos intracelulares de células que integram este sistema, como macrófagos, neutrófilos, células Natural Killer (NK) e células dendríticas, para reconhecer moléculas que são essenciais ao metabolismo microbiano, como: lipopolissacarídeos (LPS); peptidoglicanas; ácidos lipoteicóicos; DNA não-metilado e RNA de dupla cadeia (Beutler, 2004; Iwasaki, 2010).

A atuação destes receptores é vasta, participando na opsonização de micróbios; na ativação do sistema complemento e cascatas de coagulação; na fagocitose; na ativação de mecanismos pró-inflamatórios de sinalização e na indução de apoptose (Janeway, 2002).

Após reconhecimento, os micróbios presentes no meio extracelular são ingeridos e destruídos por macrófagos e neutrófilos. Ao mesmo tempo, células NK destroem células infectadas enquanto células dendríticas ativam a resposta imune adaptativa, que aumenta a potência da defesa inata e participa ativamente na eliminação de micróbios ainda presentes no organismo (Abbas, 2003).

i) Macrófagos e neutrófilos

Macrófagos estão distribuídos por todo o organismo e são morfologicamente diferenciados em cada tecido: células de Kupffer, no fígado e microglíocitos, no sistema nervoso central, por exemplo. Neutrófilos são bastante numerosos e vivem por apenas 6 h antes de entrar em apoptose (Beutler, 2004). Ambos têm como primeira função identificar e ingerir micróbios que possam ser

ameaça ao organismo. Este reconhecimento é possibilitado por receptores celulares, como os do tipo Toll-like, receptores de manose e receptores de opsoninas, que reconhecem padrões moleculares presentes em micro organismos (PAMPs).

Quando macrófagos reconhecem micróbios, liberam as citocinas IL-1 e Fator de Necrose Tumoral (TNF), que estimulam células endoteliais próximas à região afetada pela infecção a expressar proteínas membranares capazes de promover frágil adesão de macrófagos e neutrófilos, que circulam na corrente sanguínea, direcionando-os ao foco de infecção. Próximo a este, a adesão é fortalecida pela ação de quimiocinas e macrófagos e neutrófilos migram, rápida e diretamente, através de espaços inter-endoteliais até o tecido infectado (Abbas, 2003).

Macrófagos participam da ativação da resposta imune adaptativa, digerindo os invasores e apresentando seus fragmentos proteicos complexados com a proteína MHC de classe II em sua superfície e excretando a citocina IL-12, que estimula células NK e células T a produzirem Interferon gama (IFN- γ), citocina que aumenta a capacidade destrutiva dos macrófagos.

ii) Células NK (Natural Killers)

Células NK pertencem à imunidade inata, mas desempenham funções similares às de células T, que pertencem à imunidade adaptativa, pois são capazes de destruir células infectadas por micróbios e também de ativar macrófagos através da liberação da citocina IFN- γ . Uma importante distinção entre os dois tipos celulares é que células NK não são capazes de identificar a mesma infinidade de antígenos que células T e são incapazes de produzir a citocina IL-2, que atua na proliferação de células T (Lanier, 1998; Lanier, 2005).

iii) Células dendríticas

Células dendríticas (DCs) patrulham constantemente o sangue, tecidos e órgãos linfóides em busca de invasores, que são capturados, internalizados e digeridos. As partes proteicas são fragmentadas em peptídeos que se ligam a uma

proteína conhecida como Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), o qual, ligado ao peptídeo, é apresentado na superfície celular em processo conhecido como apresentação de antígenos (Guermonprez, 2002).

A função mais pertinente de DCs é sensibilizar o sistema imunológico contra um antígeno específico. Isto ocorre quando o peptídeo apresentado por MHCs é reconhecido por receptores celulares presentes em células T (TCRs). As células T sensibilizadas, específicas contra o antígeno, se proliferam, se diferenciam e se ativam (Fong, 2000).

4.1.2. Sistema imunológico adaptativo

A imunidade adaptativa é capaz de reconhecer patógenos e moléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, etc., com ajuda de células especializadas e anticorpos. Estas células podem ser divididas em dois grupos: células B, originárias da medula óssea, e células T, originárias do timo.

i) Células T

Estas células atuam de maneira específica frente a invasores, reconhecendo um vasto número de antígenos através de receptores presentes em suas superfícies celulares conhecidos como TCRs. Alguns subgrupos são conhecidos: células T citotóxicas, células T auxiliares e as T regulatórias.

Células T citotóxicas (CTLs) quando ativadas são capazes de limitar o alastramento de infecções por patógenos intracelulares, como vírus e bactérias, através do reconhecimento e eliminação de células infectadas. Ao mesmo tempo, produzem citocinas como Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) que aumentam a eficiência da resposta imune inata. Células T são fundamentais na limitação do potencial de proliferação de células tumorais (Kim, 2010).

Células T são ativadas quando seus receptores TCRs se ligam a peptídeos complexados em moléculas MHC de classe I, que são expressadas na superfície de quase todas as células nucleadas ligadas a peptídeos. Estes peptídeos provêm da degradação de proteínas presentes no citosol, que são transportados ao

retículo endoplasmático, onde são ligados às moléculas de MHC de classe I com ajuda de chaperonas. Então, o complexo estável peptídeo-MHC I é transportado até a superfície celular da célula apresentadora de antígeno (APC) (Pamer, 1998; Schotsaert, 2010).

Para que a ativação de células T citotóxicas seja concretizada é necessária co-estimulação que é proporcionada pela ligação da molécula CD28 presente em CTLs à molécula B7 presente em APCs (Lenschow, 1996).

Células T auxiliares (T_h) funcionam como intermediários da resposta imune promovendo a produção de anticorpos eficientes por células B e aumentando a capacidade destrutiva das células componentes da resposta imune inata, levando ao desaparecimento de micróbios que persistam no meio extra e intracelular (Szabo, 2003).

A ativação destas células ocorre quando seus receptores TCRs ligam-se a peptídeos complexados a moléculas MHC de classe II, presentes em células dendríticas e células B. Estes peptídeos são produto da degradação de antígenos de origem exógena e se ligam exclusivamente aos TCRs de células T auxiliares.

ii) Células T regulatórias

Células T regulatórias (T_{reg}) são capazes de inibir a ativação de outras células T, através da secreção de citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10 (Shevach, 2001), sendo importantes na proteção contra doenças autoimunes e na prevenção de rejeição em transplantes. Estas células induzem tolerância de tumores pelo sistema imunológico (Sakaguchi, 2001).

iii) Células B

Linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos. Eles utilizam imunoglobulinas presentes em suas superfícies como receptores para internalizar antígenos. A consequência imediata é a proliferação do clone que produzirá anticorpos específicos contra este antígeno. Anticorpos secretados são capazes de se ligar a antígenos extracelulares ajudando o sistema imunológico inato a

identificá-los e eliminá-los. Ao internalizá-los, células B têm a capacidade de processá-los e apresentá-los ligados a moléculas de MHC-II assim como MHC-I e, ao mesmo tempo, expressar moléculas co-estimuladoras podendo, então, estimular linfócitos T (Abbas, 2003; Basta, 2007).

4.2. Resposta imune frente a tumores

A principal defesa do organismo frente a tumores são os linfócitos T citotóxicos. Classicamente, antígenos provenientes do meio extracelular, como os presentes em células tumorais, são processados, ligados a MHCs de classe II e ativam linfócitos T auxiliares. MHCs de classe I são expressados na superfícies de quase todas células nucleadas e, até recentemente, imaginava-se que somente eram capazes de apresentar peptídeos derivados de proteínas endógenas. Entretanto, macrófagos, células dendríticas, células B, células endoteliais e neutrófilos podem ingerir, processar e apresentar antígenos exógenos provenientes de células tumorais na forma de peptídeos ligados a MHCs de classe I em um processo conhecido como apresentação cruzada e, então, ativar linfócitos T citotóxicos (Shen, 2006; Basta, 2007; Kim, 2010; Nagata, 2010).

Alguns antígenos tumorais provocam produção de anticorpos por células B. Estes anticorpos aderem às superfícies de células tumorais e auxiliam no reconhecimento destas por macrófagos e células NK em mecanismo conhecido como citotoxicidade dependente de anticorpos, mediada por células (Niwa 2004).

Células NK podem ajudar na destruição de células tumorais que, por mecanismo de seleção, não expressam complexos MHC de classe I e escapam da ação de CTLs. Mesmo assim, seu papel na defesa contra tumores ainda não está esclarecido (Drake, 2006).

Macrófagos podem destruir células tumorais da mesma maneira que destróem organismos invasores, através da liberação de enzimas lisossomais, moléculas oxidantes e/ou óxido nítrico (Abbas, 2003).

4.3. Mecanismos de evasão da resposta imune por tumores

O sistema imunológico constantemente reconhece e elimina células que sofreram mutações genéticas e epigenéticas (Pardoll, 2003). Neste contexto, o desenvolvimento de tumores pode ser visto como uma falha do sistema imunológico em conter a proliferação de células malignas (Mapara, 2004).

Células tumorais sobrevivem quando desenvolvem mecanismos que as permitam crescer e se espalhar pelo organismo, sem induzir resposta imune que seja prejudicial à sua existência. Células tumorais podem alcançar esta façanha através de mecanismos de escape ou de resistência frente ao sistema imunológico, como: tornar o sistema imunológico tolerante à sua presença; conter a ação de células citotóxicas; promover a proliferação de células T regulatórias; utilizar citocinas pró-inflamatórias em prol de sua proliferação descontrolada (Pawelec, 2004; Drake, 2006).

A barreira imposta pelos mecanismos de evasão da resposta imune utilizados por células tumorais deve ser quebrada para que o sistema imunológico possa reconhecê-las e eliminá-las com eficiência (Pardoll, 2003).

i) Alteração da expressão de antígenos tumorais e de MHC de classe I

A inibição da expressão de proteínas fundamentais para a maquinaria de apresentação de antígenos, como as componentes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (Drake, 2006) ou a perda da expressão de moléculas reconhecidas por células T como antígenos tumorais, comprometem o processo de apresentação de antígenos por células tumorais e, conseqüentemente, comprometem a ação de CTLs, que são as principais componentes da resposta imune frente ao câncer, levando o tumor a escapar do patrulhamento exercido pelo sistema imunológico (Rabinovitch, 2007).

ii) Expressão desregulada de moléculas co-estimulatórias

A expressão de moléculas co-estimulatórias por células dendríticas e células malignas é desregulada no microambiente tumoral. A apresentação de antígenos tumorais por células dendríticas, somada à co-estimulação inapropriada, não ativa células T, levando a tolerância das células tumorais pelo sistema imunológico (Rabinovitch, 2007).

iii) Secreção de moléculas solúveis imunossupressoras

Citocinas imunossupressoras podem ser encontradas no soro de pacientes com câncer. Dentre as mais importantes estão a IL-10 e o TGF- β (Tada, 1991; Inge, 1992; Gerlini, 2004). Efeitos imunossupressores, mediados por estas citocinas, levam à tolerância dos tumores pelo sistema imunológico.

iv) Indução de células T regulatórias

Acredita-se que tumores são tolerados pelo sistema imunológico porque a proliferação, recrutamento e ativação de T_{regs}, são estimulados em seus microambientes. Uma evidência que aponta nesta direção é a de que a depleção de T_{regs} pode inibir o crescimento tumoral em modelos animais de câncer (Liyanage, 2002; Sakaguchi, 2001).

4.4. Imunoterapia contra tumores

A imunoterapia não visa substituir terapias curativas já empregadas, mas contribuir para o tratamento de cânceres que não respondem bem às terapias convencionais, como é o caso de hepatocarcinomas não operáveis ou em estágio intermediário/avançado.

A distribuição da resposta imune em um indivíduo abrange quase toda sua extensão, colocando a imunoterapia como possível solução para tratamento de metástases. Além disso, a eliminação do tumor pelo sistema imunológico permitiria produzir memória imunológica contra as células malignas, prevenindo recorrência tumoral (Lattime, 2002).

4.4.1. Vacinas antitumorais

Indivíduos portadores de tumores geram espontaneamente respostas imunes contra os mesmos e respostas adicionais potencializadas podem ser induzidas com ajuda de vacinas preparadas com antígenos presentes nestes tumores (Mapara, 2004; Cavallo, 2006).

Para que a vacina induza produção de linfócitos T específicos contra células malignas, os antígenos tumorais administrados devem ser capazes de ativar células T. Existem vários destes antígenos: 1) antígenos expressados por células tumorais, porém expressados em baixas quantidades por células normais; 2) antígenos expressados por células normais e super-expressados por células tumorais; 3) proteínas mutadas presentes apenas em células tumorais; 4) antígenos codificados por vírus associados à carcinogênese, como os vírus da hepatite B e C (Lattime, 2002; Stevanovich, 2002).

Imunidade pode ser obtida com sucesso através da imunização com peptídeos, em associação ou não com adjuvantes como o IFA (Incomplete Freund's Adjuvant), com peptídeos internalizados em células dendríticas ou com peptídeos codificados por adenovírus sem capacidade de replicação (Melief 1996).

Vacinas anticâncer baseadas em peptídeos sintéticos podem ser bastante melhoradas através da depleção de células T regulatórias do indivíduo ou mesmo através da inibição de citocinas imunossupressoras produzidas por estas, como o TGF- β (Sutmuller, 2001; Cavallo, 2006; Palena 2010).

Recentemente, uma vacina contra câncer de próstata, chamada Sipuleucel-T (Provenge®), foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) (American Cancer Society, 2010).

4.4.2. Terapia de citocinas no combate ao câncer

Citocinas são proteínas com propriedades imunomoduladoras, secretadas por linfócitos. No microambiente tumoral existe naturalmente várias citocinas que dão forma à resposta imune gerada por um indivíduo. A manipulação terapêutica

desse microambiente através da administração de algumas citocinas pode levar à ativação da imunidade antitumoral (Dougan 2009).

Alguns resultados obtidos em terapias anticâncer, mediadas pela administração de citocinas, podem ser vistos na Tabela 2 .

Tabela 2 - Citocinas manipuladas em terapia anti-câncer

| Citocinas | Atividade na presença de tumores |
|------------------|--|
| IL-2 | Melhora a função de células NK e T citotóxicas |
| IL-6 | Melhora a função de células B e T |
| IL-10 | Inibe a apresentação de antígenos por tumores |
| IL-12 | Melhora imunidade e citotoxicidade promovida por T auxiliares e inibe angiogênese |
| IL-15 | Melhora citotoxicidade em geral |
| IFN- α | Melhora a citotoxicidade da resposta imune e melhora a apresentação de antígenos por tumores |
| IFN- γ | Melhora a citotoxicidade da resposta imune e melhora a apresentação de antígenos por tumores |
| TNF- α | Induz apoptose de células tumorais |
| TGF- β | Inibe a função de células T ativadas |

*adaptado de Dranoff, 2004.

Como se pode ver, a imunoterapia através da administração de citocinas já vem sendo bastante estudada no tratamento de vários tipos de câncer. Esta terapia é uma promessa de cura, inclusive de cânceres metastatisados e poderia evitar recorrência tumoral devido ao estabelecimento de memória imunológica.

Os efeitos adversos da administração sistêmica de citocinas são normalmente os limitantes da dose e se parecem aos de infecções sistêmicas, como pressão baixa, vômito, diarreia e febre (Fyfe 1995).

i) Interleucina 12 (IL-12)

É uma citocina heterodimérica, de 70 kDa, produzida por células fagocíticas em resposta a parasitas intracelulares, bactérias e seus produtos. Esta citocina atua como fator de crescimento de células NK e T ativadas que, em resposta,

produzem principalmente IFN- γ . Além disso, aumenta a citotoxicidade de células NK e favorece a geração de linfócitos T.

IL-12 atua em diferentes estágios durante a defesa do organismo contra infecções. No início induz a produção de IFN- γ que ativa macrófagos e neutrófilos contribuindo para instaurar inflamação. Em conjunto com o IFN- γ , favorece a diferenciação de células T auxiliares para um subtipo que produz maiores quantidades de IFN- γ e contribui ainda para a proliferação destas células em resposta a antígenos.

Basicamente, IL-12 atua na comunicação entre a resistência imediata promovida pela resposta imune inata e a seguinte resposta imune adaptativa que é antígeno-específica (Trinchieri, 1995).

IL-12, produzida por tumores e células adjacentes a nódulos neoplásicos, ativa intensamente células NK, induz imunidade antitumoral específica, estimula a expressão de moléculas de adesão nas veias tumorais e tem efeito antiangiogênico poderoso, propriedades que, em conjunto, levam à regressão tumoral. Além disso, esta citocina tem se revelado como agente anticâncer potente também quando administrado na forma de proteína recombinante (Barajas, 2001; Mazzolini, 2000).

ii) Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) e seu inibidor P17

É uma citocina imunossupressora produzida por células T regulatórias, cuja função primordial é atuar no sistema imunológico regulando a proliferação, diferenciação e sobrevivência de linfócitos, promovendo tolerância (Li, 2006). P17¹ é um peptídeo sintético, solúvel em água, composto por 15 aminoácidos

¹ Este peptídeo foi desenvolvido no Centro de Investigação Médica Aplicada (CIMA) da Universidade de Navarra-Espanha e patenteado pela empresa Digna Biotech.

(KRIWFIPRSSWYERA), de 1995,6 kDa, capaz de inibir a atividade de Tregs *in vitro* e *in vivo* ligando-se à citocina imunossupressora TGF- β .

A administração de P17 a camundongos imunizados com vacinas contendo antígenos tumorais intensifica a resposta imune frente aos antígenos e melhora a imunidade destes animais frente ao re-desafio (Dotor, 2007; Serrati, 2009).

Estas descobertas demonstram que peptídeos inibidores de TGF- β demonstram ser úteis na melhora da eficiência de vacinas e na quebra de tolerância contra antígenos tumorais.

4.4.3. Administração de anticorpos monoclonais

A imunoterapia não se resume a administração de citocinas ou vacinas antitumorais. Outra abordagem é a administração de anticorpos monoclonais específicos contra determinados cânceres que, quando administrados, se ligam às superfícies de células tumorais e ajudam o sistema imunológico a identificá-las e eliminá-las.

Nos últimos dez anos a FDA aprovou vários anticorpos monoclonais para tratamento de certos cânceres: rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin®), gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), cetuximab (Erbix®), bevacizumab (Avastin®), panitumumab (Vectibix®), ofatumumab (Arzerra®) (American Cancer Society, 2010).

5. Sistemas para entrega sustentada de ativos

Proteínas recombinantes, peptídeos e DNA plasmídico são exemplos de macromoléculas que atuam no citoplasma e núcleo celulares, respectivamente. Se administradas a humanos, invariavelmente sofrem ação de enzimas com propriedades degradativas. A meia vida destas macromoléculas é bastante curta, havendo necessidade de que sejam administradas várias vezes para que se obtenha efeito terapêutico. DNAs exógenos necessitam encontrar e integrar-se ao DNA nuclear ou mitocondrial para que tenham seus genes transcritos.

Sistemas nano particulados para entrega de fármacos foram propostos como solução para a administração, segura e sustentada, de peptídeos, proteínas, vacinas, moléculas biologicamente ativas, DNA, dentre outras moléculas. Estes sistemas devem garantir a proteção do material encapsulado frente a proteases e nucleases (Soppimatha, 2001; Vasir, 2007). Sua eficiência também está relacionada com sua interação com membranas celulares e com a capacidade de escapar de vesículas endossomais após endocitose.

Estes dispositivos podem ser administrados de várias maneiras: tópica (atua localmente: epiderme, mucosa nasal, conjuntiva), enteral (atua sistemicamente: oral, via reto), parenteral (atua sistemicamente: intravenosa, intraperitoneal, intramuscular), dependendo da função do ativo e resposta desejada.

5.1. Sistemas não-virais para entrega de macromoléculas

Lipossomas e nanopartículas (NPs) poliméricas são sistemas não-virais que podem ser utilizados para entrega de macromoléculas. Elas têm fundamentalmente diâmetro menor que 1000 nm e podem ser vantajosas se comparadas com micropartículas, por serem mais adequadas para administração intravenosa. Isto ocorre porque o diâmetro dos menores capilares sanguíneos está entre 5 e 6 μm e, desta forma, nanopartículas com diâmetro significativamente

menor que 5 μm e baixa polidispersividade, assim como seus agregados, não causam embolismo (Hans, 2002).

É interessante que sistemas nanoparticulados possam carregar fármacos em grande quantidade, para que se reduza o número de NPs administradas durante uma terapia. Estes fármacos podem ser incluídos em nanopartículas durante a preparação das mesmas, podem ser aderidos às suas superfícies quando já prontas, ou ambos. Porém, a quantidade de fármaco que pode ser adsorvido na superfície de nanopartículas é menor que aquela que pode ser encapsulada em seu interior (Soppimatha, 2001).

A carga superficial de nanopartículas determina com que facilidade serão internalizadas por células, se irão formar agregados no sangue e dita sua aderência e interação com membranas celulares e opsoninas.

Perfis de liberação dependem basicamente da natureza do sistema carreador. O ativo encapsulado pode ser liberado de seu interior por difusão através do material ou erosão da matriz polimérica. Há, também, a possibilidade da liberação do ativo que permaneceu aderido à superfície da nanopartícula, sendo essa liberação normalmente rápida (Soppimatha, 2001).

5.1.1. Nanopartículas poliméricas biodegradáveis

Nanopartículas poliméricas biodegradáveis utilizadas para entrega sustentada de ativos, proteínas terapêuticas, DNA plasmídico, etc. são feitas de polímeros que foram aprovados para uso clínico em humanos pela FDA (*US Food and Drug Administration*). Dentre eles estão polímeros sintéticos como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), e seu copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) conhecidos por sua biocompatibilidade e reabsorção pelo organismo humano, através de mecanismos naturais (Vasir, 2007).

De acordo com a necessidade de aplicação e tipo de ativo a ser encapsulado, nanopartículas poliméricas biodegradáveis podem ser sintetizadas por vários métodos (Kumari, 2010; Pinto Reis, 2006). Esses dispositivos são produzidos, em sua maioria, por técnicas de emulsão simples ou dupla, seguida pela evaporação do solvente. A encapsulação do fármaco, tamanho de partícula,

aditivos adicionados durante a formulação, massa molecular do polímero, razão dos copolímeros constituintes e morfologia de superfície podem influenciar as características de liberação.

A eficiência de encapsulação e as taxas de liberação desses dispositivos podem ser otimizadas para melhorar sua resposta terapêutica (Shih, 2007; Jain, 2000).

i) Nanopartículas de PLGA

PLGA (poli (ácido lático-co-glicólico)) é um dos polímeros biodegradáveis mais utilizados no desenvolvimento de nanomedicamentos (Figura 12). Ele foi aprovado para uso terapêutico em humanos pela FDA. Nanopartículas deste polímero são degradadas através da hidrólise de suas ligações éster, produzindo metabólitos biocompatíveis, como os ácidos lático e glicólico. Estes metabólitos são consumidos, pelo organismo e, dessa forma, a toxicidade sistêmica associada ao uso de PLGA é mínima.

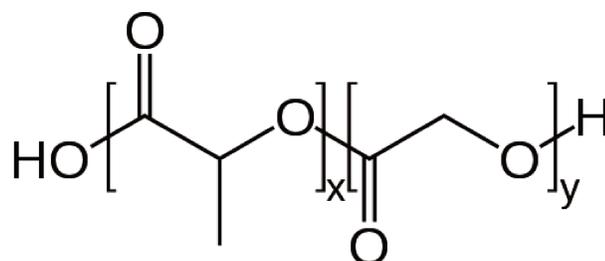


Figura 12- Fórmula estrutural do polímero sintético biodegradável PLGA onde x e y representam o número de unidades de ácido lático e glicólico, respectivamente.

PLGA é sintetizado pela copolimerização aleatória de dois monômeros, os dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-dionas) de ácido glicólico e lático. Durante a polimerização os dímeros cíclicos são abertos e interconectados via ligações éster formando o poliéster linear e alifático PLGA, que pode ser obtido em diferentes formas, dependendo da razão entre os monômeros utilizados para a síntese. Todos os PLGAs são amorfos e, em geral, apresentam transição vítrea no intervalo entre 40-60 °C (Cai, 2007).

Alguns protocolos foram otimizados para a preparação de partículas de PLGA e vários ativos relacionados ao tratamento de câncer foram incorporados em PLGA. Estes sistemas oferecem proteção a fármacos com tempo de vida curto na circulação e são pequenos o suficiente para penetrar o tecido endotelial de capilares, serem internalizados por células e ainda escapar de endossomas.

Muitas propriedades podem ser avaliadas na preparação de nano medicamentos com PLGA: tamanho de partícula, distribuição de tamanho, morfologia da superfície, química de superfície, carga superficial, adesão superficial, erosão superficial, porosidade, difusão de fármacos, eficiência de encapsulação, estabilidade do fármaco, perfis de liberação, dentre outros.

Nanopartículas de PLGA podem ser produzidas pelo método de emulsão seguida por evaporação do solvente. A primeira fase do processo consiste em preparar uma emulsão o/a onde a fase oleosa é constituída pelo PLGA juntamente com um fármaco lipofílico dissolvidos em solvente orgânico imiscível em água (clorofórmio, diclorometano) e uma fase aquosa contendo surfatante (PVA, TPGS). Outra opção, no caso de fármacos hidrofílicos, é produzir uma emulsão múltipla a/o/a onde a fase aquosa interna contém o fármaco, a fase oleosa é composta por PLGA em solvente orgânico imiscível em água e a fase aquosa externa é uma solução de surfatante.

Estas emulsões são preparadas em sonicadores, dispersores e homogeneizadores de alta energia, possibilitando que sejam finamente divididas em unidades com dimensão nanométrica.

A segunda etapa consiste na evaporação do solvente, por agitação branda e contínua ou sob pressão reduzida e aumento na temperatura, que induz precipitação do polímero na forma de nano esferas, onde as moléculas do ativo se encontram homogeneamente dispersas na matriz polimérica (Pinto Reis, 2006).

ii) Lipossomas

Lipossomas são vesículas com compartimento interno aquoso, formadas por bicamadas de fosfolípidos (Figura 13). Neste compartimento moléculas hidrofílicas podem ser incorporadas ao passo que moléculas anfifílicas ou lipofílicas podem ser alojadas no seio das bicamadas lipídicas. Lipossomas são em geral pouco imunogênicos, apresentam baixa toxicidade e são biodegradáveis (Massing, 2000).

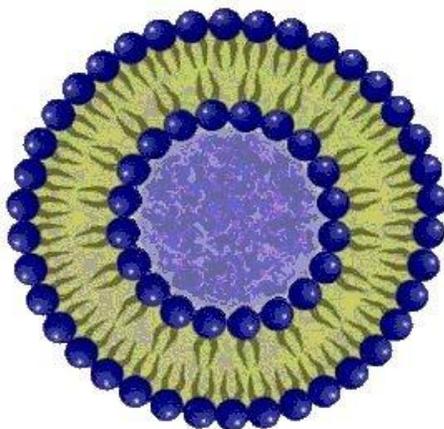


Figura 13 – Lipossoma: bicamada lipídica esférica envolvendo um núcleo aquoso.

Quando ativos são encapsulados em lipossomas suas farmacocinéticas são substituídas pelo comportamento farmacocinético destas vesículas possibilitando, dessa forma, proteger o composto encapsulado da degradação durante a circulação na corrente sanguínea. Porém, quando aplicados via intravenosa são rapidamente eliminados por macrófagos dos órgãos do sistema reticulo endotelial (RES) (Lasic 1991). Este inconveniente pode ser solucionado adicionado o polímero hidrofílico polietilenoglicol (PEG) em suas superfícies. As cadeias poliméricas do PEG são bastante hidratadas e inibem interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre componentes do sangue e a superfície das nanopartículas, impedindo a adesão de opsoninas e o reconhecimento e eliminação destas nanoestruturas por macrófagos do RES, aumentando o tempo de meia vida em circulação (Gabizon, 2001).

A principal desvantagem de lipossomas em relação à nanopartículas poliméricas é que não são muito estáveis quanto ao tamanho e polidispersividade ao longo do tempo.

5.1.4. Perfis de liberação de ativos por nanopartículas de PLGA

A liberação sustentada de ativos é uma característica bastante desejável ao se desenvolver um sistema nano particulado. É conveniente que o perfil de liberação de ativos aprisionados nestas estruturas obedeça a uma cinética de ordem zero, ou seja, com liberação constante ao longo do tempo. Porém, nanopartículas com perfis de liberação mais complexos são relativamente comuns e, desde que mantenham a concentração do fármaco no sangue nos níveis entre a concentração máxima segura e a concentração mínima efetiva, podem ser úteis em aplicações médicas (Acharya, 2006).

Normalmente, padrões de liberação consistem em dois processos: uma liberação inicial bastante rápida (*burst*), causada pelo desprendimento de moléculas aderidas à superfície das nanoesferas e pela difusão de moléculas aprisionadas na camada mais externa das partículas e uma segunda fase dependente da difusão dos ativos aprisionados na matriz polimérica e de sua degradação e erosão, que no caso de nanopartículas de polímeros biodegradáveis como PLGA, ocorrem via hidrólise ao longo de semanas ou meses (Mogi, 2000; Freiberg, 2004).

Interações físicas e químicas entre o polímero PLGA, que compõe as nanopartículas, e a molécula encapsulada influenciam diretamente os perfis de liberação destas. Especificamente, alguns fatores que afetam esta propriedade são: a natureza da molécula encapsulada (existência de grupos ácidos, tamanho, estrutura, nucleofilicidade) e sua distribuição dentro das partículas, massa molar e cristalinidade do PLGA, assim como a porosidade das partículas (Freiberg, 2004; Saxena, 2004; Cai, 2007).

Ativos encapsulados que tenham grupos nucleofílicos em suas estruturas podem, em alguns casos, induzir quebra da cadeia polimérica de PLGA. Por outro

lado, seus produtos de degradação podem desestabilizar moléculas encapsuladas que normalmente apresentem atividade biológica (Freiberg, 2004; Cai, 2007).

A distribuição radial do ativo incorporado em nano esferas pode influenciar o perfil de liberação porque afeta a distância que suas moléculas deverão percorrer para que sejam liberadas no meio. Se as moléculas do ativo estiverem, em sua maioria, aprisionadas no corpo dessas nanopartículas, espera-se que sua liberação seja lenta, se estiverem em sua maioria aprisionadas próximo à superfície, a liberação será bastante rápida (Kakish, 2002).

Durante o processo de precipitação do polímero na forma de nano esferas a difusão do solvente determina a porosidade destas partículas. A porosidade afeta diretamente a cinética de liberação, pois poros funcionam como canais por onde ativos aprisionados na matriz polimérica podem escapar (Yang, 2000; Saxena, 2004).

5.2. Sistemas para entrega direcional de macromoléculas

5.2.1. Nanopartículas de PLGA com superfície modificada

A superfície de nanopartículas de PLGA pode ser química ou fisicamente alterada através da ligação ou adsorção de espécies químicas que conferem a estas partículas propriedades singulares, como: direcionamento a órgãos, tecidos, células e organelas; inibição da adesão de opsoninas, aumentando o tempo de circulação do dispositivo frente ao reconhecimento por macrófagos, etc.

Uma estratégia de direcionamento é a associação de ligantes que se ligam especificamente a receptores celulares, que promovem a adesão das nanopartículas à membrana celular e facilita sua internalização pelo processo de endocitose mediada por receptores (Vasir 2007). A funcionalização química de NPs de PLGA com anticorpos (Kocbek, 2007), heparina, folato e o derivado de vitamina E TPGS (Zhang, 2007; Chen, 2009), assim como a adesão eletrostática de assialofetuína (Díez, 2009) e quitosana (Chung 2010), já foi estudada como direcionadora para distintos tipos celulares.

Nanopartículas de PLGA podem ser funcionalizadas covalentemente através da modificação química dos grupos ácido carboxílico presentes em sua superfície. Estes grupos podem ser ativados através da reação com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) e posterior reação com o aminoácido cisteína (Figura 14), que leva a formação de grupos tiol na superfície das nanopartículas. Estes grupos são posteriormente ligados a ligantes tiolados de diversas naturezas (Nobs, 2003 e 2004).

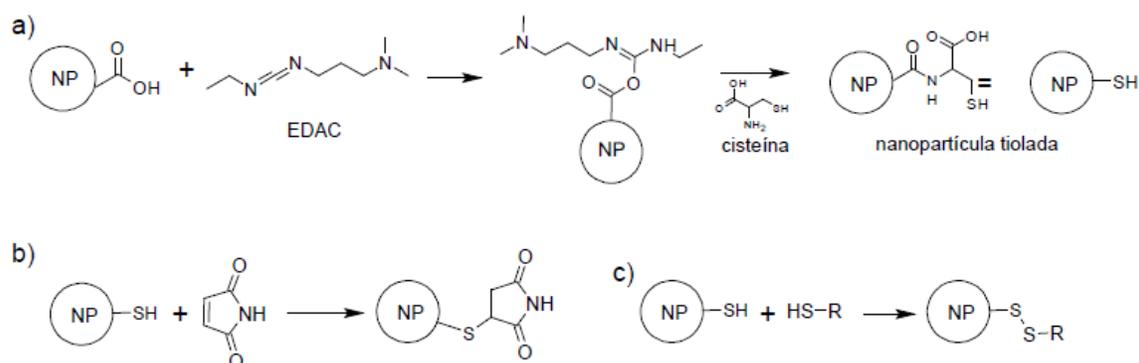


Figura 14 - Modificação química de nanopartículas de PLGA (adaptado de Nobs 2003 e 2004): a) preparação de nanopartículas de PLGA tioladas; b) e c) conjugação de ligantes (R) a nanopartículas tioladas.

A modificação química da superfície de nanopartículas de PLGA com PEG (Park, 2009) e a adesão de albumina (Feng, 2009), inibem o processo de opsonização que segue a administração parenteral destas estruturas, aumentando seu tempo na circulação (Pinto Reis, 2006).

5.2.2. Sistemas virais de entrega de macromoléculas

Vírus são nanopartículas de origem biológica encontradas na natureza e que ao serem engenhasdas, modificadas e produzidas por humanos podem ser utilizados como sistemas para entrega direcional de genes ao núcleo, através do DNA presente no vírus recombinante. O tratamento de doenças através desta estratégia é conhecido como terapia genética.

Vetores virais devem possuir algumas propriedades para que sejam ideais: 1) devem ser simples de produzir; 2) devem expressar o gene de modo sustentado ou regulado; 3) não devem ser imunogênicos, podendo permanecer no organismo durante tempo suficiente para que o transgene seja expressado; 4) devem ser específicos quanto ao tecido (tropismo definido); 5) devem ser capazes de abrigar DNA viral que codifique proteínas de todos tamanhos; 6) devem ser capazes de integrar seu material genético no DNA celular ou residir no núcleo em formas episomais; 7) devem ser capazes de infectar células em processo de divisão ou não (Somia, 2000).

i) Vírus adeno-associados recombinantes

Vírus adeno-associados (AAV) são nanopartículas icosaédricas de aproximadamente 25 nm de diâmetro compostas por 60 subunidades proteicas que encapsulam DNA de cadeia simples, com 4700 pares de bases. O genoma consiste em duas *open reading frames* (ORFs) flanqueadas por duas sequências de repetições terminais invertidas (ITR). Estas sequências são necessárias para replicação do genoma e montagem do vírus. A parte esquerda da ORF (rep) codifica quatro proteínas que regulam a replicação (Rep 78, Rep 68, Rep 52, Rep 48) e a parte direita (cap) codifica as três proteínas que compõem o capsídeo viral (VP1, VP2, VP3) (Wu, 2006; Lu, 2004).

AAV não são capazes de se replicar sem ajuda de adenovírus ou vírus herpes simplex e, na ausência destes, permanecem latentes no núcleo celular em formas episomais ou integrados ao núcleo.

AAV recombinantes são interessantes como carreadores de genes para terapia genética porque não são patogênicos, tampouco imunogênicos e possuem amplo tropismo celular e tecidual. Os ITR são os únicos elementos em cis necessários para o empacotamento e montagem dos AAV e o genoma restante pode ser substituído por um transgene alvo, visando atividade terapêutica (Figura 15).

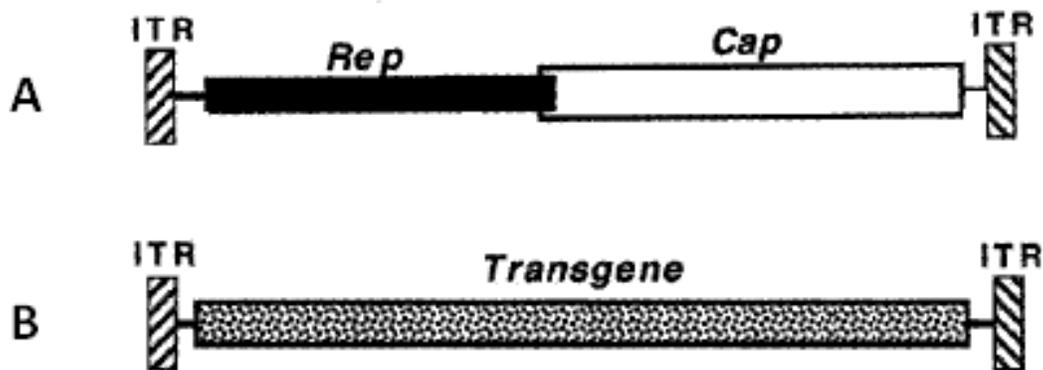


Figura 15 - a) DNA viral de AAV; b) DNA viral de rAAV (Lu 2004)

Porém, AAV apresentam algumas desvantagens: 1) seu tamanho reduzido limita o número de pares de bases do transgene incluído no DNA viral; 2) a expressão do DNA viral se inicia lentamente porque há necessidade de conversão do DNA viral de cadeia simples em DNA viral de cadeia dupla (Coura, 2007).

ii). Adenovírus recombinante de última geração (gutless)

Uma alternativa aos vírus adenoassociados, porém com DNA viral que comporta um maior número de pares de bases, são os adenovírus recombinantes de última geração conhecidos como “gutless”. Assim como os vírus adenoassociados, necessitam que proteínas virais sejam fornecidas em trans para que seja possível a montagem do vírus. O termo gutless refere-se ao fato de que os genes virais presentes no DNA original do adenovírus são eliminados, tornando o vírus recombinante menos imunogênico. Seu capsídeo, porém, diferentemente dos vírus adeno-associados, é reconhecido por células componentes do sistema imunológico inato como macrófagos e células dendríticas, de forma que são rápida e facilmente eliminados do meio extracelular (Alba, 2005).

5.3. Testes clínicos envolvendo o uso de formulações nano particuladas

Buscando no site <http://ClinicalTrials.gov> pode-se ter acesso a informações sobre inúmeros testes clínicos, em estágio de recrutamento de pacientes, em andamento ou mesmo concluídos, utilizando formulações nano particuladas no tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer. Para deixar clara a importância destas estruturas para a medicina contemporânea, alguns resultados para a busca “*nanoparticles*” e “*adeno associated virus*” são reproduzidos e comentados em seguida.

5.3.1. NCT00734682 - Formulação nano lipossomal do fármaco Irinotecano em pacientes com glioma recorrente

Este estudo em Fase I propõe tratar pacientes de gliomas recorrentes, dentre os quais: gliolastoma multiforme, gliosarcoma, astrocitoma anaplástico, oligodendroglioma anaplástico e astrocitomas malignos em geral; com uma formulação nano lipossomal do fármaco Irinotecano.

Quando encapsulado em lipossomas este fármaco apresenta menor toxicidade que quando administrado sozinho e, por isso, espera-se resultados mais promissores em pacientes tratados com esta formulação.

5.3.2. NCT00825201 - Nanopartículas estabilizadas com albumina encapsulando paclitaxel no tratamento de pacientes com câncer avançado da cavidade peritoneal

Neste teste em Fase I procura-se estudar os efeitos colaterais e encontrar a dose adequada de nanopartículas estabilizadas com albumina encapsulando paclitaxel, em pacientes com câncer avançado da cavidade peritoneal.

A formulação nano particulada de paclitaxel estabilizada com albumina permite entrega sustentada do fármaco ao longo de um tempo maior que quando

administrado sem o carreador e espera-se que esta estratégia possa ajudar a destruir mais células tumorais.

5.3.3. NCT01103791 - Nanopartículas poliméricas encapsulando docetaxel, para tratamento de pacientes com tumores sólidos malignos, em estágio avançado

Este estudo em Fase I tem como objetivo determinar a máxima dose tolerada e a dose recomendada de uma formulação de nanopartículas poliméricas encapsulando docetaxel para posteriores testes em Fase II, em pacientes com tumores malignos sólidos em estágio avançado. Também tem como objetivo avaliar a segurança e farmacocinética da formulação.

Este teste visa explorar as mudanças farmacocinéticas conferidas ao fármaco docetaxel, devido ao fato de estar encapsulado em nanopartículas poliméricas, na busca de novos e melhores resultados no tratamento dos tumores anteriormente mencionados.

5.3.4. NCT00004533 - Vírus adeno-associados recombinantes contendo gene *cftr* no tratamento de fibrose cística

Este estudo visa determinar a dose máxima tolerada de vírus adeno-associado recombinante portando o gene *cftr*, em pacientes com fibrose cística. Também será avaliada a capacidade de transfecção do vírus *in vivo* e em seguida o padrão de expressão do gene *cftr* e conseqüente atividade fisiológica e monitorar a resposta imune contra a formulação, avaliando sua segurança.

Neste caso, um vetor viral é utilizado para corrigir uma doença genética, levando genes ao tecido pulmonar que codificam corretamente uma proteína que, em pacientes de fibrose cística, não é corretamente expressada.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

O trabalho descrito nesta Dissertação de mestrado é multi- e interdisciplinar abrangendo tópicos em química coloidal, biologia molecular, imunologia e virologia, assuntos estes, estudados por químicos, farmacêuticos, biotecnólogos, biólogos e médicos.

Estas características estão visivelmente presentes nos objetivos de trabalho, abaixo expostos:

- 1) Preparar e caracterizar nanopartículas de PLGA funcionalizadas com a proteína recombinante assialofetuína, encapsulando o peptídeo P17, bloqueador da citocina imunossupressora TGF- β .
- 2) Preparar dois vírus adenoassociados recombinantes do serotipo oito: um cujo DNA viral codifica a citocina imunoestimulatória IL-12 murina (rAAV8-mIL12), outro cujo DNA viral codifica a enzima luciferase (rAAV8-LUC).
- 3) Testar, em modelo murino BALB/c fêmea com tumores subcutâneos da linha de células BNL de câncer de fígado, a terapia combinada entre vetores virais recombinantes expressando a citocina interleucina-12 e nanopartículas de PLGA funcionalizadas com assialofetuína encapsulando o peptídeo P17, bloqueador da citocina TGF- β .
- 4) Testar, em modelo murino BALB/c fêmea, a influência da liberação sustentada do peptídeo P17 por nanopartículas de PLGA na potencialização de vacinas contra células de câncer colo-retal CT26.

III. Parte Experimental

III. PARTE EXPERIMENTAL

6. Preparação, caracterização e funcionalização de nanopartículas de PLGA

Reagentes e materiais: peptídeo P17 (KRIWFIPRSSWYERA, 1995,6 Da) (Digna Biotech, Pamplona, Espanha), pDNA LUC (fornecido pela Profa. Glória Gonzalez-Aseguinolaza), ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA, 50:50) 24-38 kDa com terminação ácida (Resomer RG503H, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemanha), DOTAP 18:1 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EUA), PVA 13-23 kDa, 87-89% hidrolisado (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha), assialofetúina (AF tipo I, Aldrich, EUA), sacarose (Panreac, Barcelona, Espanha), clorofórmio grau HPLC (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha). Equipamentos: sonicador (Microson XL 2000, Misonix Incorporated, Farmingdale, NY, EUA), liofilizador (Genesis 12EL, Virtis, NY, EUA), microbalança analítica (XS204DR, Mettler Toledo), ultra-centrífuga (Multipurpose Centrifuge 5804R, Eppendorf, Alemanha), medidor de potencial Zeta e diâmetro de partículas (ZetaSizer Nano Series, Malvern Instruments, Malvern, UK); espectrofotômetro UV-Vis (NanoDrop® ND-1000, BCM, Houston, TX, EUA).

Nanopartículas de PLGA, contendo o peptídeo P17 ou plasmídeo com o gene codificando luciferase inserado (pDNA LUC), foram preparadas pelo método de dupla-emulsão, seguida por evaporação do solvente, que envolve a preparação de uma emulsão múltipla do tipo água/óleo/água.

Para a preparação de partículas encapsulando P17, a fase aquosa interna, composta por 120 µL de solução aquosa 0, 25, 50, 75 ou 100 mg/mL do fármaco, é misturada à fase oleosa, composta por 0, 5, 10, 15, 20 ou 25 mg de DOTAP, 100 mg de PLGA e 650 µL de clorofórmio, com o sonicador Microson XL 2000 em máxima potência, por 30 s. A emulsão resultante é gotejada sobre a fase aquosa externa, composta por 2 mL de uma solução aquosa 9% de PVA e a mistura é sonicada em máxima potência, por 30 s.

A emulsão obtida é então gotejada sobre 8 mL de uma solução 0,9% de PVA, sob agitação magnética branda, que é mantida por 4 hs ou até que evapore todo o clorofórmio.

A dispersão de nanopartículas obtida após evaporação do clorofórmio é centrifugada (40000 g, 20 min, 4 °C) e o *pellet* formado é ressuspensionado em água deionizada. Este procedimento de lavagem é repetido três vezes.

Adiciona-se 50 mg de sacarose à dispersão de nanopartículas lavadas e após sua dissolução a dispersão é congelada em *freezer* a -80 °C e liofilizada.

Para a preparação de nanopartículas encapsulando pDNA LUC seguiu-se o mesmo procedimento utilizando, porém, como fase aquosa interna 120 µL de solução 2 mg/mL deste plásmideo e adicionando-se 15 mg de DOTAP à fase oleosa.

6.1. Caracterização

Diâmetro, polidispersividade e potencial Zeta das nanopartículas foram determinados com o equipamento Zeta Sizer Nano Series. Uma dispersão de nanopartículas diluída em água deionizada, de acordo com as especificações do aparelho, foi colocada em cuveta de acrílico e foram feitas medidas em triplicata.

Uma curva de calibração do fármaco P17 foi obtida por espectroscopia no UV através da determinação, em triplicata, da absorção em 280 nm para várias concentrações no intervalo de 0 a 2 mg/mL. Esta curva permitiu determinar o conteúdo de P17 em nanopartículas de PLGA-DOTAP.

No caso do plasmídeo, utilizou-se o recurso do software de interface original do espectrofotômetro NanoDrop® que determina a concentração de DNA em soluções aquosas sem necessidade de curvas de calibração externas.

Para quantificação, dissolvem-se 5 mg de nanopartículas 1 mL de clorofórmio grau HPLC em um vial pequeno e adiciona-se 1 mL de água deionizada. A mistura é deixada sob agitação durante a noite, o clorofórmio

evapora, a dispersão resultante é centrifugada e o sobrenadante separado. No caso de nanopartículas encapsulando P17, a absorção em 280 nm do sobrenadante é determinada, em triplicata, e utilizando a curva de calibração previamente preparada, determina-se o conteúdo de fármaco nas nanopartículas. No caso de nanopartículas encapsulando plasmídeo, a concentração é determinada, em triplicata, diretamente no espectrofotômetro e determina-se o conteúdo de DNA nestas partículas.

6.2. Funcionalização

Nanopartículas liofilizadas (1 mg) foram ressuspensas em soluções aquosas de assialofetuína nas concentrações: 0, 2, 10, 20, 30, 40, 100 µg/mL. Após 1 h, foram caracterizadas como descrito anteriormente (diâmetro, polidispersividade e potencial Zeta) ou foram utilizadas em testes *in vivo*.

7. Preparação dos vírus adenoassociados rAAV8-mIL12 e rAAV8-LUC

Reagentes e materiais: Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (GibcoBRL Life Technologies, Barcelona, Espanha), polietilenoimina (PEI) 25 kDa (Polysciences, Warrington, PA, EUA), DNase e RNase (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemanha), dispositivo de filtragem para centrifuga (Ultrafree 15, Millipore, Bedford, MA, EUA), iodixanol (Optiprep, Lucron Bioproducts BV, Gennepe, Netherlands), sacarose (Panreac, Barcelona, Espanha), tampão fosfato pH 7,2 (PBS). Equipamentos: termociclador (LightCycler System, Roche Diagnostics, Basel, Suíça), tubos de centrifuga (Quick-Seal Centrifuge Tubes Ultra Clear (24×89 mm), Beckman), ultracentrifuga (Coulter Optima L-90, Beckman), centrifuga (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha).

Células 283 T foram cultivadas em meio DMEM completo até atingir 70-80% de confluência, em placas de 150 mm de diâmetro. Neste momento foi adicionada a cada placa uma mistura de plasmídeos, fornecidos pela Dra. Glória Gonzalez-Asequinolaza (CIMA-UNAV), contendo: 40 µg de plasmídeo portando os genes rep-cap; 20 µg de plasmídeos portando genes adenovirais; 20 µg de plasmídeos portando genes que codificam interleucina-12 murina ou luciferase; 300 µL de PEI 10 mM e soro fisiológico estéril suficiente para obter volume final de 1 mL de mistura por placa. Após 48 h, as células foram coletadas, ressuspendidas em DMEM (2,5 mL por placa) e lisadas com três ciclos de congelamento a -80 °C seguido de descongelamento a 37 °C. A mistura foi centrifugada a 2500 rpm durante 5 min e o sobrenadante separado.

Um volume de 19,5 mL de sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore 0,45 µm e adicionado ao fundo do tubo Beckman com ajuda de pipeta Pasteur. Em seguida são adicionadas, uma a uma, soluções de iodixanol com diferentes concentrações: a 15 % (9 mL), 25% (5 mL), 40% (5 mL) e 60 % (3 mL).

O tubo foi ultracentrifugado a 60.000 rpm por 70 min a 16 °C e 5 mL da fase mais densa, onde estão os vírus, foi coletada.

Estes 5 mL da fase densa foram purificados em dispositivo de filtração para centrífuga, adicionando 10 mL de PBS com 5% sacarose e centrifugando a 3000 rpm por 10 min, três vezes. O líquido restante no filtro após a terceira lavagem foi separado e PBS com 5% sacarose foi adicionado até o volume de aproximadamente 1 mL. O concentrado de rAAV8-mIL12 ou rAAV8-LUC foi congelado e estocado a -80 °C até sua utilização.

7.1. Quantificação

A titulação dos vírus assim produzidos foi realizada por Q-PCR, em tempo real, monitorada e controlada em termociclador, após digestão por DNase e RNase.

8. Biodistribuição de nanopartículas de PLGA em camundongos

Reagentes e materiais: D-Luciferina (Promega), camundongos BALB/c fêmeas (Harlán Ibérica Laboratories, Barcelona, Espanha), quetamina 500 (Imalgene, Merial), xilacina (Rompum, Bayer), kit de extração de DNA (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, EUA). Equipamentos utilizados: câmera escura com detector CCD (IVIS CCD Camera System, Xenogen), termociclador (LightCycler System, Roche Diagnostics, Basel, Suíça).

Nanopartículas funcionalizadas com assialofetuína e nanopartículas não-funcionalizadas, ambas encapsulando pDNA com genoma de luciferase, foram injetadas em dois grupos de três camundongos cada. Depois de 12 h, 100 μ L luciferina 150 μ g/mL foi injetada intraperitonealmente em cada um dos animais já sedados com 50 μ L de uma mistura 9:1 (v:v) de quetamina e xilazina. A luz emitida foi detectada, durante 5 min, por CCD e analisada pelo software Living Image 2.20 (Xenogen).

Depois de 12 h, os animais foram sacrificados e órgãos e tecidos coletados: cérebro, pulmões, coração, estômago, baço, intestino, fígado, ovários, músculo da coxa, rins, pâncreas e útero. O DNA total nestes tecidos foi extraído com um kit seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=200373>) e quantificou-se os genomas de luciferase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) em cada órgão e tecido por Q-PCR em tempo real.

9. Vacina antitumoral

Reagentes e materiais: peptídeo AH1 (SPSYVYHQF, 1128 Da), adjuvante incompleto de Freund (IFA) (Difco, Detroit, EUA), peptídeo P17 (KRIWFIPRSSWYERA, 1995,6 Da) fornecido pela Digna Biotech (Pamplona, Espanha), nanopartículas de PLGA contendo P17 (preparadas como previamente descrito), quetamina 500 (Imalgene, Merial), xilacina (Rompum, Bayer), camundongos BALB/c fêmeas com 6-7 semanas de vida (Harlán Ibérica Laboratories, Barcelona, Espanha), células CT-26 (America Type Culture Collection, MD, EUA), meio de cultura completo (RPMI 1640 contendo 10% soro bovino fetal (FCS) (HyClone, Thermo Scientific, EUA), 1% penicilina e 1% de estreptomicina (GIBCO-Invitrogen, EUA), 1% de piruvato de sódio (Lonza) e 10 μ L de 2-mercaptoetanol 0,50 mM (GibcoBRL Life Technologies, Barcelona, Espanha) por mL de meio. Equipamentos utilizados: incubadora (HepaClass100 Steri-Cycle CO₂ Incubator, Thermo Scientific, EUA)

Uma emulsão composta por 50 μ g do peptídeo AH1, 100 μ L de IFA e 100 μ L de água estéril foi injetada subcutaneamente nas plantas dos pés (50 μ L) e sob a cauda (100 μ L) de cada camundongo, previamente anestesiados com 50 μ L de uma mistura 9:1 (v:v) de quetamina e xilazina, e divididos em quatro grupos de 7 (dia 0). Um grupo à parte, composto por 7 camundongos, não recebeu qualquer tratamento. Os camundongos foram, então, divididos em 5 grupos de tratamento (Tabela 3): (1) controle (camundongos sem tratamento); (2) imunizados com AH1; (3) imunizados com AH1 + dose única de 300 μ g de P17; (4) Imunizados + dose única de nanopartículas encapsulando 300 μ g P17; (5) Imunizados com AH1 + cinco doses de 60 μ g P17.

Os camundongos dos grupos 2, 3 e 4 receberam injeções intraperitoneais, de acordo com as especificações de tratamento de seu grupo após a imunização com AH1 no dia 5 e os camundongos do grupo 5 receberam uma dose diária de P17 durante cinco dias (dias 5, 6, 7, 8, 9).

Tabela 3 - Grupos de camundongos e respectivos tratamentos

| Grupos | Descrição do tratamento |
|---------------|---|
| 1 | Água destilada e esterilizada |
| 2 | Somente imunização frente ao peptídeo AH1 |
| 3 | Imunização e aplicação de dispersão aquosa de nanopartículas contendo P17 |
| 4 | Imunização e cinco aplicações de solução aquosa de P17 |
| 5 | Imunização e aplicação de única dose de P17 |

No dia 10 todos os camundongos foram inoculados no dorso, por via subcutânea, com $3,5 \times 10^5$ células CT26, cultivadas em meio RPMI suplementado em incubador, a 37 °C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂.

O tamanho dos tumores foi medido com paquímetro, em intervalos de 2 a 3 dias, assim que se tornaram visíveis. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical quando o volume de seus tumores chegou a 1600 mm³ ou quando alguma de suas dimensões ultrapassou 16 mm.

10. Terapia imunogenética

Reagentes e materiais: peptídeo P17 (KRIWFIPRSSWYERA, 1995,6 Da) fornecido pela Digna Biotech (Pamplona, Espanha), nanopartículas de PLGA contendo P17 (funcionalizadas ou não, preparadas como previamente descrito), vírus adeno-associados com genoma de interleucina-12 ou luciferase murino (AAV8-mIL12 ou AAV8-LUC, preparadas como previamente descrito), quetamina 500 (Imalgene, Merial), xilacina (Rompum, Bayer), camundongos BALB/c fêmeas com 6-7 semanas de vida (Harlán Ibérica Laboratories, Barcelona, Espanha), células BNL (Rockville, EUA), meio de cultura completo (Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (GIBCO-Invitrogen, EUA) contendo: 10% soro bovino fetal (FCS) (HyClone, Thermo Scientific, EUA), 1% penicilina e 1% de estreptomicina (GIBCO-Invitrogen, EUA), 1% de piruvato de sódio (Lonza), doxiciclina (Sigma, Madrid, Espanha), sacarose (Panreac, Barcelona, Espanha), D-luciferina (Promega). Equipamentos utilizados: incubadora (HepaClass100 Steri-Cycle CO₂ Incubator, Thermo Scientific, EUA).

Camundongos anestesiados com 50 µL de uma mistura 9:1 (v:v) de quetamina e xilazina, foram inoculados no dorso, por via subcutânea, com 2×10^6 células BNL, cultivadas em meio DMEM suplementado, em incubador, a 37 °C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂. Quando os tumores atingiram volume tumoral médio de 3 mm³ os camundongos foram separados em 5 grupos de n animais (Tabela 4) e iniciaram-se distintos tratamentos (dia 0): (1) 5×10^{10} partículas virais de rAAV-LUC (controle), n=7; (2) 5×10^{10} partículas virais de rAAV8-mIL12, n=7; (3) 5×10^{10} partículas virais de rAAV8-mIL12 + 5 doses de solução aquosa de 60 µg de P17, n=7; (4) 5×10^{10} partículas virais de rAAV8-mIL12 + nanopartículas encapsulando 300 µg P17, n=7; (5) 5×10^{10} partículas virais de rAAV8-mIL12 + nanopartículas funcionalizadas com assialofetuína encapsulando 300 µg P17, n=8.

Tabela 4 Grupos de camundongos inoculados com BNL e respectivos tratamentos

| Grupos | Descrição do tratamento |
|--------|---|
| 1 | rAAV8-LUC intratumoral (i.t.) (sem tratamento) |
| 2 | rAAV8-mIL12 i.t. |
| 3 | rAAV8-mIL12 i.t. + 5 doses de 50 µg de P17 |
| 4 | rAAV8-mIL12 i.t.+ 1 dose de 50 µg de P17 em nanopartículas de PLGA |
| 5 | rAAV8-mIL12 i.t.+ 1 dose de 50 µg de P17 em nanopartículas de PLGA funcionalizadas com assialofetúina |

Os vírus suspendidos em soro fisiológico foram injetados intratumoralmente e as nanopartículas suspendidas em água estéril foram injetadas intraperitonealmente.

A expressão dos DNAs virais tranfectados foi induzida por doxiciclina adicionada na água dos camundongos (2 mg/mL, 5% de sucrose) durante 10 dias a partir do dia 0.

O tamanho dos tumores foi medido com paquímetro, desde o dia 10, em intervalos de 2 ou 3 dias. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical quando o volume de seus tumores chegou a 1600 mm³ ou quando alguma de suas dimensões ultrapassou 16 mm.

IV. Resultados e discussão

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

11. Preparação, caracterização e funcionalização de nanopartículas de PLGA

O objetivo inicial foi preparar nanopartículas poliméricas que pudessem ser administradas em modelos animais de hepatocarcinoma. Atualmente, os polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados em sistemas de entrega sustentada de fármacos e que cuja aplicação clínica já foi aprovada pelo FDA são os derivados do ácido poli-lático e ácido glicólico e seus co-polímeros como o ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA).

O fármaco encapsulado foi o peptídeo P17 (sequência KRIWFIPRSSWYERA, massa molar 1995,6 g/mol), um peptídeo que bloqueia a citocina imunossupressora TGF- β e intensifica a proliferação das células que compõe a resposta imune celular adaptativa (Llopiz, 2009).

Como este peptídeo é solúvel em água, decidiu-se preparar nanopartículas de PLGA pelo método de emulsão múltipla seguida por evaporação do solvente. O método consiste em preparar uma emulsão múltipla finamente dividida com ajuda de sonicadores e/ou homogeneizadores que mecanicamente promovem seu cisalhamento em gotículas. A fase aquosa interna abriga o fármaco, a fase oleosa o polímero e a aquosa externa, um surfatante. Durante o processo de evaporação do solvente, as gotículas diminuem de volume e o polímero precipita na forma de esferas sólidas que aprisionam o fármaco dissolvido na fase aquosa interna.

Para que pudessem ser administradas intravenosamente com segurança, o diâmetro alvo de 200 nm foi estabelecido, diminuindo a possibilidade que as nanopartículas ou seus agregados pudessem obstruir pequenos vasos sanguíneos, causando embolia.

Nanopartículas negativamente carregadas são rapidamente opsonizadas quando na corrente sanguínea e, conseqüentemente, eliminadas por macrófagos. Além disso, o processo de internalização celular destas estruturas é dificultado

pela repulsão eletrostática entre as mesmas e a superfície da membrana celular, composta majoritariamente de cabeças polares de fosfolipídeos negativamente carregadas. Neste sentido, dispositivos com carga superficial positiva prometem melhores resultados.

Classicamente, nanopartículas de PLGA possuem carga superficial negativa. Para reverter esta polaridade indesejada acrescentamos à formulação o lipídeo catiônico 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP, Figura 16).

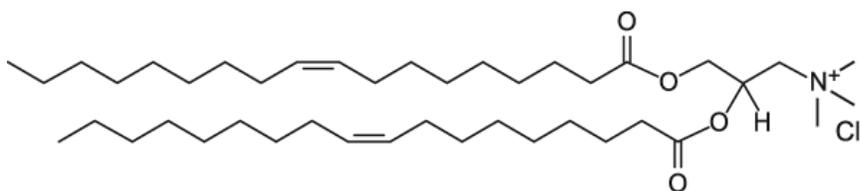


Figura 16 - Fórmula estrutural do 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP).

Via de regra, a estabilidade coloidal de dispersões de nanopartículas é garantida quando apresentam potencial Zeta próximo a $|30|$ mV e, por isso, este valor foi estabelecido como meta nas preparações.

O método escolhido para produção das nanopartículas apresenta muitos fatores que, a princípio, podem influenciar as características das nanopartículas a serem produzidas, como: potência e tempo de sonicação; temperatura; volume de solventes; massas de polímero, fármaco e DOTAP.

Avaliamos a influência da concentração de P17 (mg/mL) e massa de DOTAP (mg) nas variáveis diâmetro e potencial Zeta inicialmente através de quatro formulações (A, B, C e D) compondo um planejamento fatorial quadrado 2^2 (Tabela 5) (Barros, 2007) com ajuda do software STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc. , EUA), mantendo fixas as demais variáveis.

Em poucas palavras, um planejamento fatorial consiste em uma série de experimentos controlados que produzem uma superfície de resposta a qual permite diminuir o número de experimentos necessários para que uma determinada propriedade do sistema seja otimizada.

Tabela 5 - Fatores “concentração de P17 na fase aquosa interna” (P17) e “massa de DOTAP na fase oleosa” (DOTAP) e níveis avaliados em planejamento fatorial completo 2^2

| Fatores | Níveis | | | |
|-------------|--------|----|-----|-----|
| | A | B | C | D |
| P17 (mg/mL) | 0 | 0 | 100 | 100 |
| DOTAP (mg) | 0 | 15 | 0 | 15 |

As dispersões de nanopartículas obtidas em cada uma destas 4 formulações foi caracterizada quanto ao diâmetro, polidispersidade e potencial Zeta, conforme. Os resultados se encontram na Tabela 6.

Tabela 6 – Diâmetro e potencial Zeta de várias formulações

| Formulação | Diâmetro (nm) | Polidispersidade | Potencial Zeta (mV) |
|----------------|---------------|------------------|---------------------|
| A ^a | 190±12 | 0,1±0,1 | -21±3 |
| B ^a | 161±7 | 0,09±0,02 | 40±3 |
| C ^b | 200±4 | 0,09±0,02 | -14,8±0,3 |
| D ^a | 183±27 | 0,15±0,06 | 29±9 |

*a e b, respectivamente: em duplicata e triplicata.

A magnitude da influência de cada um dos dois fatores estudados e da interação entre os mesmos no diâmetro das partículas, com 95% de significância, se encontra exposta na Figura 17, gráfico superior. Esta estimativa de efeitos possibilita afirmar que, no intervalo dos níveis estudados, a massa de DOTAP opera exclusivamente na diminuição do tamanho das partículas, sendo a importância dos demais fatores e interações estatisticamente irrelevante. A magnitude da influência de cada um dos dois fatores estudados e da interação entre os mesmos, no potencial Zeta das partículas, com 95% de significância, se encontra na Figura 17, gráfico inferior.

Esta estimativa de efeitos permite afirmar que, no intervalo dos níveis estudados, a massa de DOTAP influencia fortemente o aumento de carga superficial das nanopartículas e que, em menor magnitude, a interação entre os fatores opera em sua diminuição.

Com objetivo de obter partículas com o maior conteúdo possível de P17 e que, ao mesmo tempo, tivessem diâmetro de aproximadamente 200 nm e potencial Zeta de aproximadamente +30 mV, preparou-se nove formulações distintas, em replicata, que compuseram um planejamento fatorial estrela completo 2×2^2 com ponto central (Tabela 7), baseando nos dados obtidos através do planejamento anteriormente descrito e expostos na Tabela 6.

Determinou-se o conteúdo de fármaco e calculou-se a eficiência de encapsulação para cada formulação, assim como diâmetro, polidispersidade e potencial Zeta (Tabela 8).

Tabela 7 - Fatores “concentração de P17 na fase aquosa interna” (P17) e “massa de DOTAP na fase oleosa” (DOTAP) e níveis avaliados em planejamento fatorial completo 2×2^2 com ponto central.

| Fatores | Níveis | | | | | | | | |
|-------------|--------|----|----|----|-----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | PC |
| DOTAP (mg) | 15 | 10 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 20 | 15 |
| P17 (mg/mL) | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | 75 | 50 | 25 | 50 |

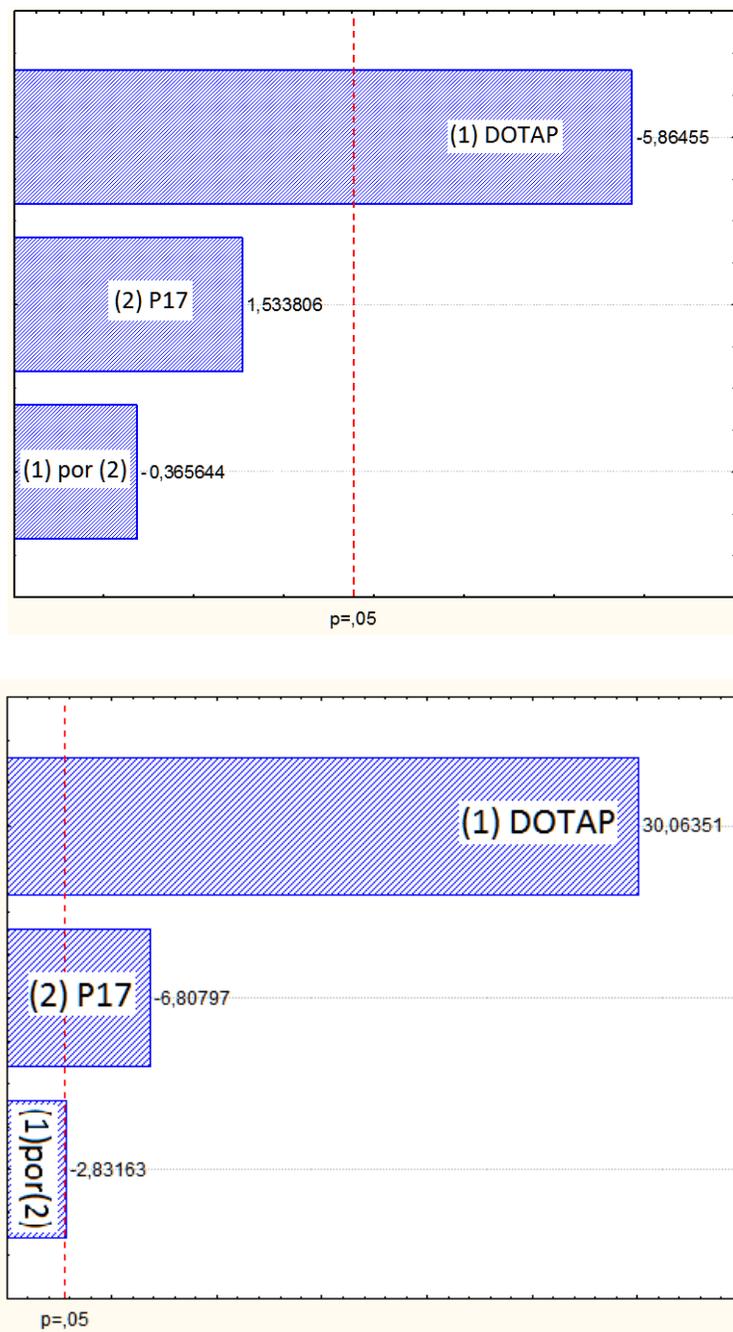


Figura 17 - Influência dos efeitos massa de DOTAP na fase oleosa ((1) DOTAP) e concentração de P17 na fase aquosa interna ((2) P17) e interação entre estes fatores ((1) por (2)), com 95 % de significância estatística ($p=0,05$), no diâmetro (gráfico superior) e potencial Zeta (gráfico inferior) de nanopartículas de PLGA preparadas pelo método de dupla emulsão. Valores negativos indicam influência na diminuição do fator.

Tabela 8 - Diâmetro médio ($\langle d \rangle$), polidispersidade (PD), potencial Zeta (PZ), conteúdo de fármaco (DC) e eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas das formulações (n) componentes do planejamento 2×2^2 com ponto central (estrela).

| N | $\langle d \rangle$ (nm) | PD | PZ (mV) | DC ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de NP) | EE (%) |
|----------------|-------------------------------------|-------------|----------|-------------------------------------|--------|
| 1 ^a | 161±7 | 0,09±0,02 | 40±3 | --- | --- |
| 2 ^a | 196±24 | 0,16±0,07 | 48,0±0,1 | 8±9 | 32±28 |
| b | 151±9 | 0,33±0,07 | n.d. | 4±4 | 7±6 |
| 4 ^b | 196±9 | 0,11±0,01 | 47±4 | 51±5 | 57±5 |
| 5 ^b | 183±27 | 0,14±0,06 | 29±9 | 54±7 | 45±6 |
| 6 ^a | 185±29 | 0,12±0,03 | 46,0±0,3 | 7±5 | 8±5 |
| 7 ^a | 192±36 | 0,13±0,03 | 43±1 | 9±12 | 16±9 |
| 8 ^b | 170±11 | 0,101±0,006 | 45±2 | 9±1 | 31±4 |
| C ^c | 181±9 | 0,15±0,08 | 48±2 | 43±12 | 72±19 |

* a, b, c, respectivamente: em duplicata, triplicata e quadruplicata

A formulação 5, preparada com uma solução de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de P17 e com 15 mg de DOTAP levou aos maiores conteúdos de fármaco, apresentou potencial Zeta de +29±9 mV e diâmetro médio de 183±27 nm, sendo escolhida como aquela a ser utilizada nos posteriores testes em animais.

A magnitude da influência de cada um dos fatores e interações entre os mesmos no conteúdo de fármaco, com 95% de significância, se encontra exposto na Figura 18. Esta estimativa de efeitos permite afirmar que, no intervalo dos

níveis estudados, o fator mais importante é a concentração do fármaco na fase aquosa interna da múltipla emulsão usada para preparar as nanopartículas. Ao mesmo tempo, o aumento na massa de DOTAP influencia a diminuição da quantidade de fármaco encapsulado.

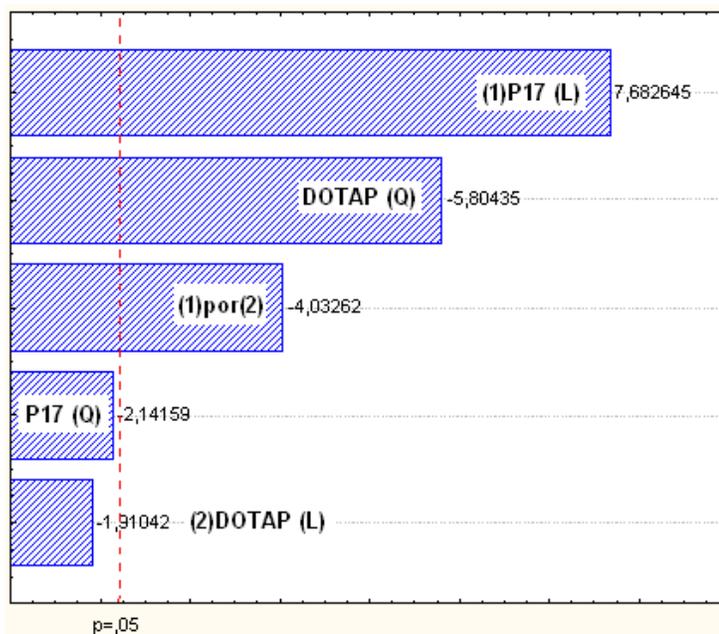


Figura 18 - Influência dos termos lineares e quadráticos das variáveis massa de DOTAP na fase oleosa ((1) DOTAP (L) e DOTAP (Q)) e concentração de P17 na fase aquosa interna ((2) P17 (L) e P17 (Q)) e a interação entre os termos lineares ((1) por (2)), com 95 % de significância estatística ($p=0,05$), no conteúdo de P17 em nanopartículas de PLGA preparadas pelo método de dupla emulsão. Valores positivos indicam influência no aumento do conteúdo de P17.

Nanopartículas de PLGA contendo pDNA codificando a enzima luciferase foram preparadas de acordo com o procedimento experimental, aproveitando os parâmetros otimizados nos planejamentos anteriores. Estas partículas foram utilizadas em ensaios posteriores de biodistribuição em camundongos BALB/c fêmeas. A Tabela 9 contém os dados relativos à caracterização destas nanopartículas.

Tabela 9 - Diâmetro médio ($\langle d \rangle$), polidispersidade (PD), potencial Zeta (PZ), conteúdo de fármaco (DC) e eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas de PLGA encapsulando pDNA codificando a enzima luciferase*.

| $\langle d \rangle$ (nm) | PD | PZ (mV) | DC ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de NP) | EE (%) |
|-------------------------------------|-----------------|----------------|-------------------------------------|--------|
| 208 \pm 10 | 0,18 \pm 0,09 | 41,5 \pm 0,1 | 1 | 57,7 |

* em duplicata

11.1. Funcionalização

Queríamos direcionar nanopartículas de PLGA aos hepatócitos e, para tal, decidimos aderir às mesmas a glicoproteína assialofetuína (AF), que possui cadeias ramificadas de galactose covalentemente ligadas a resíduos de asparagina, treonina e serina (Dam 2005) e que se liga aos receptores assialoglicoproteína (ASGPr) presentes em abundância em hepatócitos (Wu, 1998), promovendo direcionamento das nanopartículas ao fígado. Em meio com pH 7 esta proteína é negativamente carregada e adere eletrostaticamente à superfície das nanopartículas de PLGA-DOTAP que é positivamente carregada.

A adesão desta proteína à superfície das nanopartículas afeta suas propriedades físicoquímicas. A quantidade de assialofetuína utilizada na preparação influencia diretamente o potencial Zeta diminuindo sua magnitude (Figura 6). Isto ocorre porque a parte da carga elétrica positiva de cada nanopartícula é neutralizada pela adesão de AF que, em pH 7, é negativamente carregada.

Ao aumentar a disponibilidade de moléculas de galactose na superfície das nanopartículas espera-se que a probabilidade de internalização destas estruturas por hepatócitos seja maior. Neste sentido, a concentração de assialofetuína escolhida foi a maior possível e com potencial Zeta acima de +20 mV, visando a estabilidade coloidal da dispersão de nanopartículas durante a preparação e administração das mesmas.

Em relação ao diâmetro das nanopartículas, a adesão de AF pouco o afetou, exceto em altas concentrações (Tabela 10).

Nesta condição, é provável que a carga superficial destas não seja alta o suficiente para manter a dispersão coloidal estável, levando à formação de agregados que emulam partículas esféricas com diâmetro maior quando são identificados pelo ZetaSizer.

Tabela 10 - Diâmetro e potencial Zeta de nanopartículas funcionalizadas com assialofetuína

| Assialofetuína/NP (µg/mg) | Diâmetro (nm) | Polidispersidade | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| 0 | 182±6 | 0,27±0,03 | 25,8±0,5 |
| 2 | 179±3 | 0,23±0,02 | 24,6±0,5 |
| 10 | 172±1 | 0,18±0,02 | 23,6±0,4 |
| 20 | 168±4 | 0,19±0,03 | 22,4±0,8 |
| 30 | 172±1 | 0,20±0,03 | 19±2 |
| 40 | 182 | 0,22±0,01 | 18,9±0,5 |
| 100 | 1125±53 | 0,34±0,04 | 4,4±0,7 |

12. Preparação de vírus adenoassociados recombinantes

Preparou-se dois tipos de vírus adenoassociados recombinantes do serotipo oito (rAAV8) cujo DNA viral codificava interleucina-12 murina (mIL12) ou luciferase. Este sistema viral carreador de genes não é reconhecido pela imunidade inata como padrão molecular associado à patógenos (PAMP). Além disso, este serotipo apresenta especificidade para o tecido hepático e transfecta com eficiência, promovendo direcionamento para o fígado do terapêutico codificado em seu DNA. Estas propriedades são bastante desejáveis em se tratando de um sistema carreador de genes a ser usado no tratamento de carcinomas hepatocelulares e por isso foi testado.

O DNA de vírus adenoassociados é de cadeia simples e somente as repetições terminais invertidas são necessárias para a montagem destes carreadores. Isto permite trocar grande parte do genoma original dos vírus por uma sequência que codifique proteínas de interesse que desempenhem atividade terapêutica.

A produção destas partículas foi feita transfectando células 293 T, com três plasmídeos complexado em polietilenoimina (PEI), cada qual contendo diferentes insertos. Estes pDNAs são lidos e traduzidos levando a autoorganização dos produtos em vírus adenoassociados. Um primeiro plasmídeo contém o genoma codificando a proteína de interesse, um segundo, os genes referentes às componentes do capsídeo (*cap*) e das enzimas envolvidas em processos regulatórios (*rep*) e um terceiro contendo os genes presentes em adenovírus necessários para a replicação destas partículas (Figura 19).

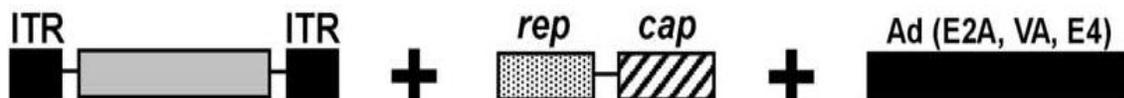


Figura 19 - Genes necessários para a produção de rAAV em células humanas 293 T: 1) genoma de interesse, 2) *rep* e *cap*, 3) genes adenovirais (E2A, VA, and E4) - adaptado de Grimm, 2002.

Os poliplexos pDNA-PEI têm carga superficial positiva e são usados para melhorar a eficiência de transfecção via interação eletrostática, pois a membrana celular é negativamente carregada.

Após replicação destas partículas, as células são lisadas e suas membranas e outros componentes insolúveis são separados por centrifugação. Para o isolamento dos vírus se faz necessário a utilização de gradientes de densidade de iodixanol que permitem separar, em duas fases distintas, as partículas virais vazias e as partículas virais funcionais.

Este procedimento é padronizado, mas há a possibilidade de saber a composição de cada uma das fases, retirando pequenas alíquotas e quantificando o DNA viral em cada uma delas via qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) em tempo real, o que permite determinar a fase em que se encontra majoritariamente as partículas funcionais ou seja, que tenham a capacidade de desempenhar a atividade/função terapêutica planejada.

Como o capsídeo destes vírus tem diâmetro de cerca de 20 nm, a fase rica em vírus funcionais, que também possui proteínas, enzimas, material genético e outras moléculas hidrossolúveis presentes no interior das células, pode ser purificada utilizando filtros com poros de diâmetro menor que 20 nm e centrifugação.

Assim que os vírus são purificados, conforme o procedimento experimental descreve, são concentrados, seu título determinado por qPCR, e são armazenados a -20°C.

13. Experimentos *in vivo*

A interação de sistemas químicos com organismos vivos é bastante complexa. Testes em animais permitem melhorar o desempenho destes sistemas e julgar se são seguros para aplicação em humanos.

BALB/c são camundongos albinos, particularmente importantes no estudo de cânceres. Eles desenvolvem, naturalmente, uma série de tumores, como de pulmão e reto. Também são bastante usados nos estudos de imunologia, como em testes sobre toxicidade de espécies químicas e vacinas.

Nesta Dissertação descrevemos a avaliação, *in vivo*, em camundongos BALB/c fêmea, do uso de imunoterapia, mediada por carreadores virais (vírus adeno-associados) e não virais (nanopartículas de PLGA), no tratamento de hepatocarcinoma e de um de seus agentes etiológicos, o câncer de cólon retal.

O uso de fêmeas em testes iniciais é justificado pela simplicidade do modelo. BALB/c machos são agressivos e brigam entre si quando mantidos na mesma gaiola. Fêmeas são dóceis e, portanto, convenientes logisticamente, pois podem ser engaioladas em grupos de até dez animais, facilitando procedimentos de manutenção como limpeza e alimentação.

13.1. Biodistribuição de nanopartículas de PLGA em camundongos BALB/c fêmea

Determinar a biodistribuição em BALB/c das nanopartículas de PLGA-DOTAP, funcionalizadas ou não com assialofetúina, é essencial para verificar os efeitos desta modificação de superfície na internalização destes sistemas de entrega pelos diferentes tipos celulares deste modelo animal, que foi posteriormente utilizado no estudo de diferentes terapias para o tratamento de hepatocarcinoma e câncer cólon retal.

13.1.1. Biodistribuição via reação bioluminescente

Nanopartículas de PLGA contendo pDNA com genoma de luciferase (Tabela 10), funcionalizadas ou não com assialofetuína, foram injetadas em dois grupos de 3 camundongos fêmeas cada, conforme descrito no procedimento experimental.

Depois de 12 h, os animais foram sedados e luciferina foi administrada intraperitonealmente. A luciferina administrada a animais é oxidada por moléculas de ATP à oxiluciferina (Figura 20). Esta reação bioluminescente é catalisada pela enzima luciferase, expressada por células que foram transfectadas com sucesso com pDNA codificando luciferase, encapsulado em nanopartículas de PLGA.

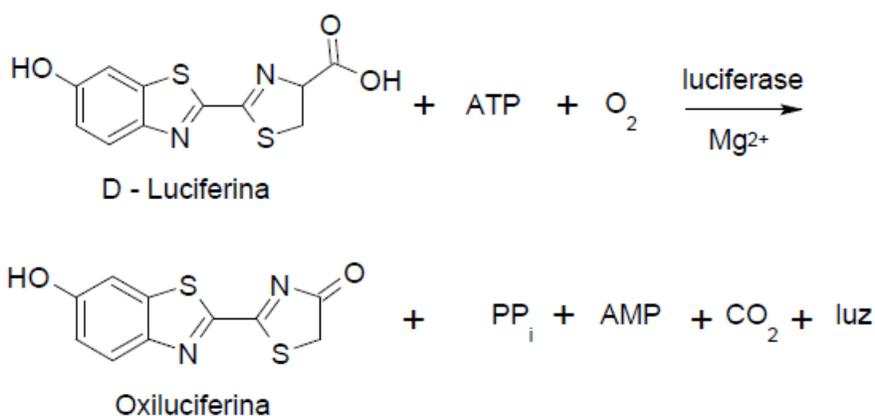


Figura 20 - Reação de oxidação da luciferina catalisada por luciferase

A luz emitida por esta reação pode ser detectada por CCD, em câmera escura, e, como resultado, se obtém imagem com o perfil de biodistribuição de luciferase.

Moléculas de DNA encapsuladas em nanopartículas de PLGA estão protegidas da degradação que ocorre no meio extracelular. Assim, espera-se que a transfecção das células nas quais a expressão de luciferase foi detectada, tenha sido mediada pelas nanopartículas. Consequentemente, o perfil de biodistribuição desta enzima sugere o perfil de biodistribuição das partículas internalizadas por células.

A Figura 21 mostra que as nanopartículas funcionalizadas foram direcionadas ao fígado, ocorrendo expressão de luciferase em 2/3 dos animais (Figura 21, camundongos de cima). Isto permite inferir que a funcionalização de nanopartículas de PLGA com a glicoproteína assialofetuína promove o direcionamento das mesmas aos hepatócitos, provavelmente por mecanismos de endocitose mediada pelo receptor assialoglicoproteína (ASGP).

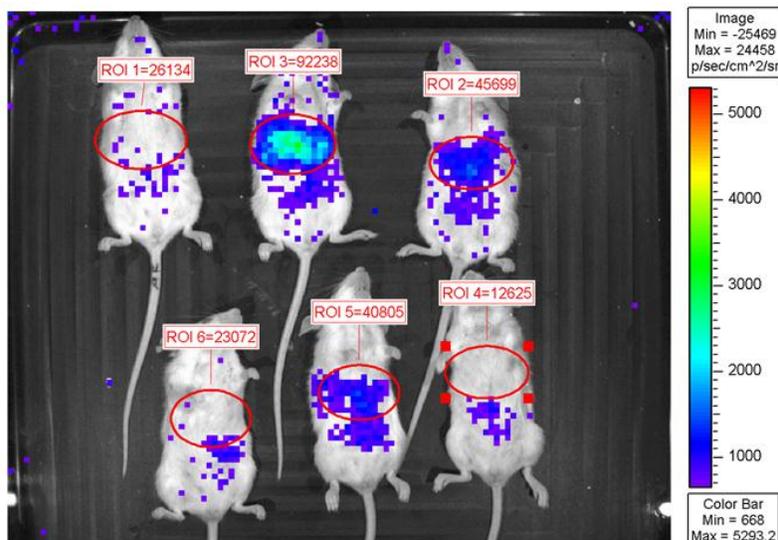


Figura 21 - Biodistribuição da enzima luciferase em camundongos BALB/c fêmeas que receberam intraperitonealmente nanopartículas de PLGA-DOTAP contendo pDNA codificando a enzima luciferase, funcionalizadas com a glicoproteína assialofetuína (três animais, parte superior) e não funcionalizadas (três animais, parte inferior).

13.1.2. Biodistribuição via qPCR em tempo real

Os camundongos do experimento anterior foram sacrificados 12 h após seu término. Seus cérebros, pulmões, corações, estômagos, baços, intestinos, fígados, ovários, músculos da coxa, rins, pâncreas e úteros foram coletados. O DNA total contido nestes tecidos foi extraído com um kit, conforme descrito no procedimento experimental, e através da técnica de qPCR em tempo real, pôde-se determinar a quantidade de genoma da enzima luciferase e da proteína GAPDH em cada órgão.

A técnica de qPCR em tempo real permite quantificar o total de genes de luciferase e GADPH em cada pedaço de tecido ou órgão coletado. O valor correspondente à quantidade de genes de luciferase é, então, normalizado pelo valor da quantidade do genes da proteína GADPH cuja expressão é ubíqua. Como resultado obtém-se a biodistribuição de genes codificando luciferase, estando dentro ou fora das células e, conseqüentemente, tem-se o perfil de biodistribuição de nanopartículas nos órgãos e tecidos estudados.

Os gráficos da Figura 22 mostram que os genes de luciferase, 24 h após sua administração mediada por nanopartículas de PLGA-DOTAP, se encontram em sua maioria nos ovários, músculos e útero. Como o polímero PLGA tem afinidade por solventes apolares espera-se que nanopartículas de PLGA-DOTAP, quando administradas intraperitonealmente, sofram adesão à gordura normalmente presente nas superfícies externas destes órgãos.

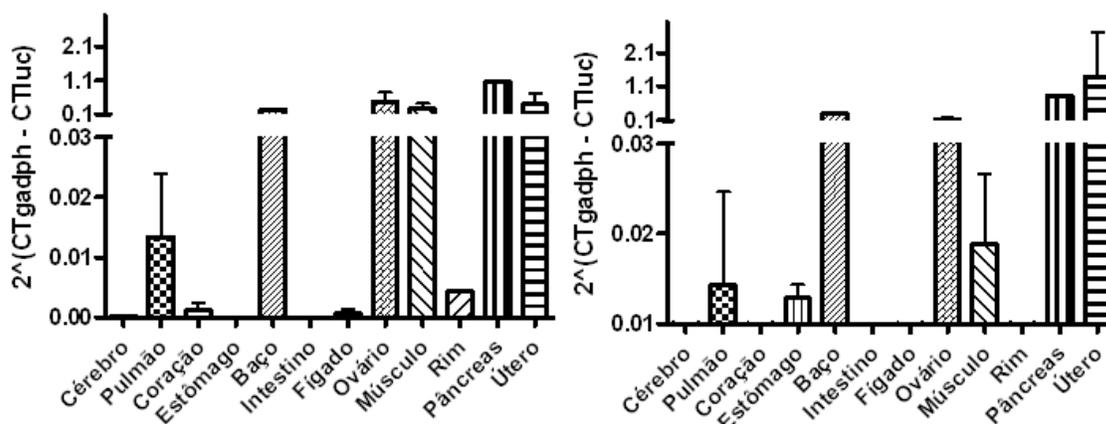


Figura 22 - Biodistribuição de nanopartículas funcionalizadas (gráfico à esquerda) e não-funcionalizadas (gráfico à direita) em camundongos BALB/c fêmea pela técnica de qPCR em tempo real.

Cada gráfico da Figura 22 foi elaborado a partir da média dos valores obtidos com os órgãos dos dois grupos de 3 camundongos que receberam nanopartículas não-funcionalizadas ou funcionalizadas com assialofetuína. A expressão de luciferase em órgãos como o baço e o pâncreas apareceram somente em 1 animal de cada grupo e, por isso, a barra de erros está ausente.

Há divergência entre os resultados obtidos neste experimento e no de biodistribuição por bioluminescência. Neste não se observa nenhuma expressão de luciferase no fígado e noutra quase que exclusiva no fígado.

É válido citar que o primeiro foi feito 12 h após injeção das nanopartículas e que outro intervalo de 12 h até sacrificar os animais para o segundo experimento pôde ter sido suficiente para que seus sistemas imunitários eliminassem os hepatócitos transfectados.

Também é fato que o experimento por bioluminescência é menos abrangente que por qPCR, pois somente detecta pDNA de luciferase transfectados, o que não ocorre no caso da qPCR, que quantifica o pDNA onde quer que esteja. Assim, estes dois experimentos se complementam.

13.2. Vacina antitumoral

Este experimento consistiu no teste de uma vacina antitumoral em camundongos BALB/c fêmea, contra câncer cólon retal que é um importante agente etiológico de hepatocarcinoma. Os animais, com idade entre 6 e 7 semanas, foram vacinados, conforme descrito no procedimento experimental, com o peptídeo AH1 (SPSYVYHQF, 1128 Da), antígeno de células tumorais CT26 capaz de ativar linfócitos T citotóxicos específicos contra as mesmas. A emulsão contendo AH1 e o adjuvante IFA, que é utilizado como potencializador de vacinas, foi injetada subcutaneamente nas plantas dos pés e sob a cauda dos camundongos, com objetivo de povoar seus nódulos inguinais, ciáticos, lombares e caudal, com linfócitos específicos frente a este antígeno.

Esse procedimento de imunização não é suficiente para garantir resposta imune suficientemente intensa para conter o crescimento de tumores CT26. Então, diferentes formulações do peptídeo P17 foram administradas em conjunto à imunização com AH1.

P17 tem capacidade de bloquear a citocina imunossupressora Fator Transformador de Crescimento (TGF- β), produzida por células T_{reg}, que inibe a proliferação de linfócitos T. Esperava-se que a administração de P17 favorecesse a proliferação, em maior escala, de linfócitos T citotóxicos específicos contra o antígeno AH1, formando uma população grande o suficiente para aumentar a intensidade da resposta imune frente à posterior destruição e eliminação das mesmas.

Os camundongos foram divididos em 5 grupos de oito e cada grupo recebeu um tratamento distinto, como descrito no procedimento experimental e apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Grupos de 8 camundongos BALB/c fêmea e respectivas estratégias de imunização testadas antes da inoculação com células tumorais de câncer de cólon retal CT26.

| Grupos | Descrição do tratamento |
|---------------|---|
| 1 | Água destilada e esterilizada |
| 2 | Somente imunização frente ao peptídeo AH1 |
| 3 | Imunização e aplicação de dispersão aquosa de nanopartículas contendo P17 |
| 4 | Imunização e cinco aplicações de solução aquosa de P17 |
| 5 | Imunização e aplicação de única dose de P17 |

O objetivo deste experimento foi verificar se a liberação sustentada do peptídeo P17 por nanopartículas poliméricas biodegradáveis de PLGA-DOTAP aplicadas intraperitonealmente em uma única dose em animais previamente vacinados com AH1 seria capaz de preparar os animais para que contivessem o crescimento de células tumorais CT26 injetadas posteriormente, da mesma forma que a aplicação de uma solução de P17 durante cinco dias é capaz de conter.

A Figura 23 mostra que os camundongos que não receberam tratamento (grupo 1) e os que foram somente vacinados com AH1 (grupo 2) não apresentaram qualquer diferença no perfil de crescimento tumoral, evidenciando a

ineficiência deste peptídeo em promover resposta imune eficiente contra as células tumorais mesmo com ajuda do potencializador de vacinas IFA.

O grupo que recebeu doses diárias de 60 µg de P17 ao longo de 5 dias e o grupo que recebeu dose única de 300 µg de P17 encapsulados em nanopartículas de PLGA apresentaram perfis de crescimento tumoral parecidos.

Este resultado mostra claramente que a liberação sustentada do fármaco P17 pelas nanopartículas de PLGA-DOTAP injetadas em dose única (grupo 3) desempenha eficiência semelhante às 5 injeções do fármaco em solução aquosa (grupo 4), o que sugere que temos efeito terapêutico quando a disponibilidade do fármaco é temporalmente mantida.

O grupo que recebeu dose única de 300 µg de P17 apresentou crescimento tumoral acelerado em relação aos controles, sugerindo um papel tumorigênico deste peptídeo quando administrado em grandes concentrações e evidenciando, mais uma vez, as diferenças farmacocinéticas entre as formulações livre e nano particulada contendo a mesma quantidade de P17.

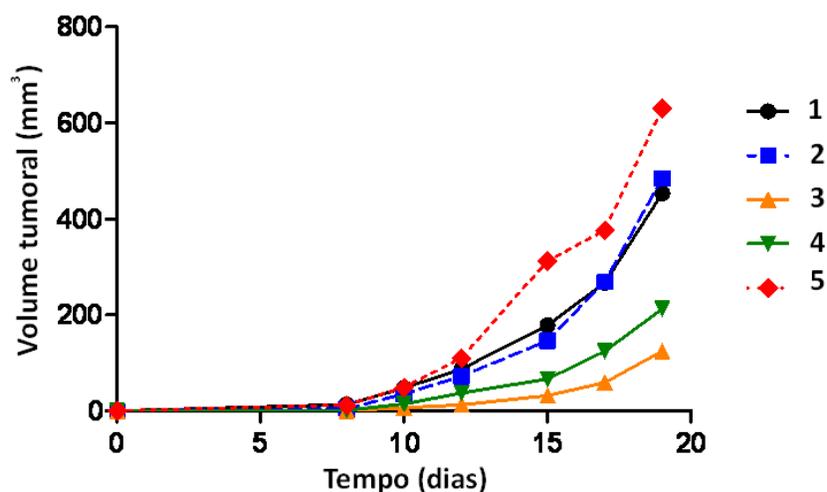


Figura 23 - Crescimento tumoral em grupos de 8 camundongos BALB/C fêmea previamente tratados e inoculados com células de câncer colo-retal CT26. Tratamento: grupo 1: sem tratamento; grupo 2: imunização com AH1; grupo 3: imunização com AH1 e nanopartículas com P17; grupo 4: imunização com AH1 e cinco doses de P17; grupo 5: imunização com AH1 e dose única de P17.

Uma informação adicional é que um camundongo do grupo 1, dois do grupo 2, quatro do grupo 3 e quatro do grupo 4 se mostraram imunes às células CT26, ou seja, neles o tumor não se desenvolveu. Este resultado aponta, mais uma vez, a similaridade em termos de eficiência dos tratamentos empregados nos grupos 3 e 4.

O fato que a vacina preveniu o desenvolvimento de tumores derivados da linha de câncer de cólon retal CT26 em alguns camundongos é importante também quando se fala em carcinomas hepatocelulares, pois se estima que 23% dos casos novos de pacientes com câncer cólon retal e mais de 60% dos recorrentes desenvolverão metástase hepática e o câncer de fígado é letal. Isto significa que uma vacina contra câncer cólon retal poderia diminuir a incidência de câncer no fígado e, conseqüentemente, a mortalidade devido às duas neoplasias.

13.3. Terapia imunogenética

Este experimento consistiu na terapia imunogenética em camundongos BALB/c fêmea, portando tumores subcutâneos derivados da linha de carcinoma hepatocelular murino BNL. Esta terapia foi mediada por interleucina-12 murina (mIL12), codificada por DNA viral de vírus adenoassociados recombinantes de serotipo 8 (rAAV8), que têm tropismo para o tecido hepático, em combinação com nanopartículas carreando o peptídeo P17, inibidor do Fator Transformador de Crescimento Beta (TGF- β).

A citocina IL-12 é responsável pela ativação das principais células da resposta imune adaptativa e é secretada por macrófagos e células dendríticas ao fagocitar micróbios ou mesmo células tumorais. Ao receber esta citocina, as células T ativadas liberam IFN- γ que é uma citocina imunoestimulatória, responsável pelo aumento da capacidade destrutiva de células da resposta imune inata, como macrófagos, ou seja, IL-12 desempenha papel de ativação da resposta celular em geral e aparece como citocina bastante atrativa como ferramenta em uma terapia para tratamento de tumores.

Neste sentido, preparamos vírus rAAV8 com DNA viral codificando mIL12 com expressão controlada por promotores hepatoespecíficos e induzíveis por doxiciclina, administrados intratumoralmente com objetivo de induzir a expressão de mIL12 por células tumorais e hepatócitos na vizinhança tumoral para aumentar a intensidade da resposta imune contra o tumor.

Aliada à terapia gênica, foram administradas nanopartículas de PLGA-DOTAP, preparadas de acordo com o descrito no procedimento experimental, encapsulando o peptídeo P17, funcionalizadas ou não com a glicoproteína assialofetuína, dependendo do grupo de tratamento. Esta proteína promove o direcionamento destes sistemas de entrega aos hepatócitos e células de hepatocarcinoma. O bloqueio da citocina imunossupressora TGF- β propiciado pelo P17, aliado à ação da mIL12 permitiria a proliferação exacerbada de células T citotóxicas específicas contra diferentes epítomos de células BNL, ampliando a

magnitude da resposta imune celular e as chances de se eliminar os tumores induzidos nos modelos.

Camundongos BALB/c fêmea foram inoculados no dorso, via subcutânea, com 5×10^5 células tumorais BNL cada. Quando os tumores atingiram o volume médio de 3 mm^3 foram divididos em 5 grupos para tratamento, conforme Tabela 12.

Tabela 12 - Grupos de n camundongos BALB/c fêmea e respectivas terapias testadas para tratamento de tumores subcutâneos derivados da linha celular de hepatocarcinoma murino BNL

| Grupos | Descrição do tratamento |
|----------------|---|
| 1 ^a | rAAV8-LUC intratumoral (i .t.) (sem tratamento) |
| 2 ^a | rAAV8-mIL12 i.t. |
| 3 ^a | rAAV8-mIL12 i.t. + 5 doses de 50 µg de P17 |
| 4 ^a | rAAV8-mIL12 i.t.+ 1 dose de 50 µg de P17 em nanopartículas de PLGA-DOTAP |
| 5 ^b | rAAV8-mIL12 i.t.+ 1 dose de 50 µg de P17 em nanopartículas de PLGA-DOTAP funcionalizadas com assialofetuína |

*em a e b, respectivamente: n=7, n=8

As curvas de sobrevivência (Figura 24) e crescimento tumoral (Figura 25) deixam claro que as terapias não surtiram o efeito esperado.

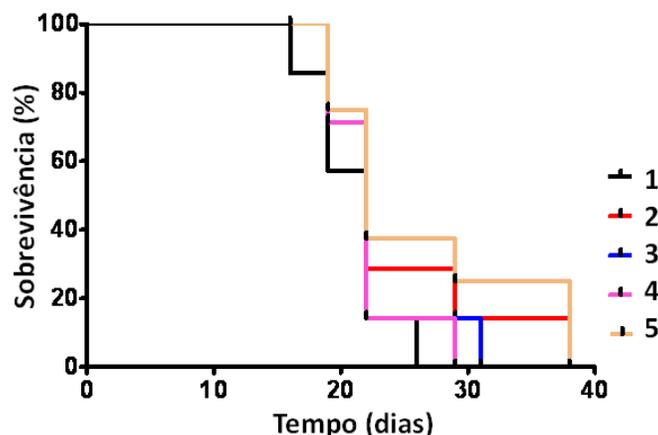


Figura 24 - Curva de sobrevivência referentes aos grupos de camundongos BALB/c com tumor BNL s.c. tratados com vírus adenoassociados e nanopartículas de PLGA. Tratamento: grupo 1: rAAV8-LUC i.t. (sem tratamento), n=7; grupo 2: rAAV8-mIL12 i.t., n=7; grupo 3: rAAV8-mIL12 i.t. + 5 doses de P17, n=7 ; grupo 4: rAAV8-mIL12 i.t. + uma dose de P17 encapsulado em nanopartículas de PLGA não-funcionalizadas, n=7; grupo 5: rAAV8-mIL12 i.t. + uma dose de P17 encapsulado nanopartículas de PLGA funcionalizadas com assialofetuína, n=8.

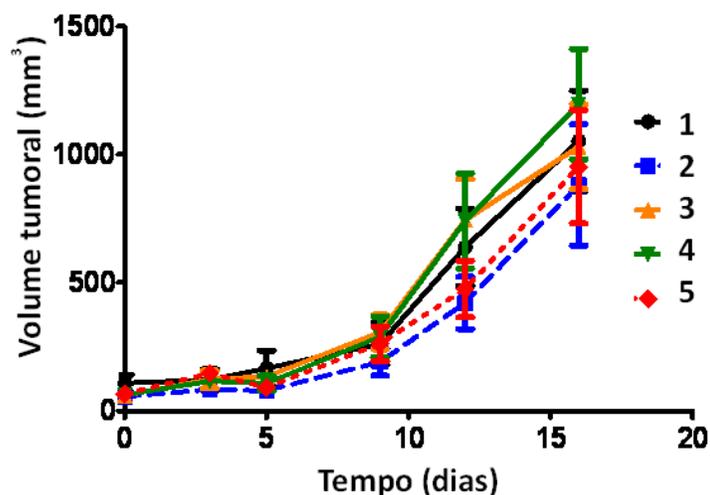


Figura 25 - Crescimento tumoral em grupos de n camundongos BALB/c fêmea com tumor BNL s.c., tratados posteriormente com vírus adenoassociados e nanopartículas de PLGA. Tratamento: grupo 1: rAAV8-LUC i.t. (sem tratamento), n=7; grupo 2: rAAV8-mIL12 i.t., n=7; grupo 3: rAAV8-mIL12 i.t. + 5 doses de P17, n=7; grupo 4: rAAV8-mIL12 i.t. + uma dose de P17 encapsulado em nanopartículas de PLGA não-funcionalizadas, n=7; grupo 5: rAAV8-mIL12 i.t. + uma dose de P17 encapsulado nanopartículas de PLGA funcionalizadas com assialofetuína, n=8.

É possível que os tumores tenham adquirido durante seu crescimento novas mutações que conferiram habilidade de não serem detectados por células T citotóxicas. Isto seria possível, por exemplo, se essas mutações levassem à não expressão de complexos MHC de classe I ou de moléculas co-estimulatórias como CD28. Neste caso, um aumento de células T citotóxicas específicas contra antígenos originários de BNL não proporcionaria melhora na eficiência da resposta imune, pois estas células seriam incapazes de identificar células tumorais que não apresentassem antígenos em sua superfície, ou as identificariam porém não desempenhariam seu papel citotóxico caso não estivessem presentes na superfície destas células as moléculas co-estimuladoras necessárias.

A rapidez com que morreram os animais, independentemente da terapia à qual foram submetidos, deixa evidente a agressividade do câncer estudado e confirmam o fato de que neoplasias hepáticas, como carcinoma hepatocelular, são muito difíceis de tratar e que novas terapias e abordagens são absolutamente necessárias para que a cura seja possível.

V. Conclusões

V. CONCLUSÕES

Em resposta a cada um dos objetivos expostos anteriormente obtivemos as seguintes conclusões:

- 1) A inclusão do lipídeo catiônico DOTAP na preparação de nanopartículas de PLGA altera suas cargas superficiais tornando-as positivas.
- 2) A proteína assialofetuína direciona nanopartículas poliméricas de PLGA-DOTAP para o tecido hepático.
- 3) A vacina contra câncer colo-retal testada em camundongos Balb/c fêmeas, inoculados subcutaneamente com células de câncer colo-retal murino CT26 tem sua eficácia visivelmente aumentada quando associada a administração de uma formulação nanoparticulada de P17.
- 4) Camundongos Balb/c fêmeas, com tumores subcutâneos da linha de carcinoma hepatocelular murino BNL, não respondem bem à terapia combinada de rAAV8-mIL12 e P17 (em solução ou em formulação nanoparticulada).

O sucesso obtido no experimento *in vivo* de vacina pode servir de incentivo para posteriores projetos envolvendo testes em modelos animais mais difíceis e realistas. O experimento de terapia genética falhou, contrariando expectativas muito bem fundamentadas, o que abre um leque de possibilidades em termos de novas abordagens para se tratar o modelo, como utilização de outros tipos de carreadores de genes (adenovirus *gutless*, nanopartículas poliméricas) ou mesmo a troca dos genes codificados por outros, aprimorando ou mudando de estratégia.

VI. Referências

VI. REFERÊNCIAS

- Abbas, A.; Lichtman, A. Cellular and molecular immunology, 5^a ed., W.B. Saunders Co., 2003.
- Acharya, G.; Park, K. Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2006) 58, 387–401.
- Alba, R.; Bosch, A.; Chillon, M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy* (2005) 12, 18–27.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the cell*. 4^a ed., Garland Science, 2002.
- American Cancer Society. *Chemotherapy*, 2009.
- American Cancer Society. *Types of Immunotherapy Guide*, 2010.
- Andrews, D.; Maraskovsky, E.; Smyth, M. Cancer vaccines for established cancer: how to make them better? *Immunology Reviews* (2008) 222, 242–55.
- Bacac, M.; Stamenkovic, I. Metastatic cancer cell. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (2008) 3, 221–47.
- Barajas, M.; Mazzolini, G.; Borrás-Cuesta, F.; Genové, G.; Bilbao, R.; Navaiza, I.; Schmitz, V.; Sangro, B.; Melero, I.; Qian, C.; Prieto, J. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin-12. *Hepatology* (2001) 33, 52-61.
- Barros, B.; Scarminio, I.; Bruns, E. *Planejamento e otimização de experimentos*, 3^aed., editora da UNICAMP, 2007.
- Basta, S.; Alatery, A. The cross-priming pathway: a portrait of an intricate immune system. *Scandinavian Journal of Immunology* (2007) 65, 311–9.
- Berns, K. Parvovirus replication. *Microbiological Reviews* (1990) 54, 316-29.
- Beutler, B. Innate immunity: a review. *Molecular Immunology* (2004) 40, 845–59.
- Bonner, W. Low-dose radiation: Thresholds, bystander effects, and adaptive responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2003) 100, 4973–5.
- Boewen, R. Histology of the liver, 1997. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/histology.html> - acessado em 14/9/2010

Bolondi, L.; Sofia, S.; Siringo, S.; Gaiani, S.; Casali, A.; Zironi, G.; Piscaglia, F.; Gramantieri, L.; Zanetti, M.; Sherman, M. Surveillance program of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* (2001) 48, 251-9.

Bosch, F.; Ribes, J.; Díaz, M.; Cléries, R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* (2004) 127, 5–16.

Bosch, F.; Ribes, J.; Cléries, R.; Díaz, M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clinics in Liver Disease* (2005) 9, 191-211.

Brenner, D.; Doll, R.; Goodhead, D.; Halla, E.; Land, C.; Little, J.; Lubin, J.; Preston, D.; Preston, J.; Puskin, J.; Ron, E.; Sachs, R.; Samet, J.; Setlow, R.; Zaider, M. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2003) 100, 13761–6.

Brooks, A.; Hui, E.; Couch, L. Very large amounts of radiation are required to produce cancer. *Dose-Response* (2007) 5, 263–74.

Bruix, J.; Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (2005) 42, 1208–36.

Brunello, F.; Veltri, A.; Carucci, P.; Pagano, E.; Ciccone, G.; Moretto, P.; Sacchetto, P.; Gandini, G.; Rizzeto, M. Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* (2008) 43, 727-35.

But, D.; Lai, C.; Yuen, M. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* (2008) 14, 1652-6.

Butterfield, H. Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* (2004) 127, 232–41.

Cai, C. Biodegradable polymer micro- and nanoparticles as protein delivery systems: influence of microparticle morphology and improvement of protein loading capacity of nanoparticles. *Dissertação de doutorado, Philipps-Universität Marburg*, 2007.

Carrillo-Infante, C.; Abbadessa, G.; Bagella, L.; Giordano, A. Viral infections as a cause of cancer (Review). *International Journal of Oncology* (2007) 30, 1521-8.

Cavallo, F.; Offringa, R.; van der Burg, S.; Forni, G.; Melief, C. Vaccination for treatment and prevention of cancer in animal models. *Advances in Immunology* (2006) 90, 175-213.

Chang, M.; Chen, C.; Lai, M.; Hsu, H.; Wu, T.; Kong, M.; Liang, D.; Shau, W.; Chen, D. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *The New England Journal of Medicine* (1997) 336, 1855-9.

Chen, H.; Yang, W.; Chen, H.; Liu, L.; Gao, F.; Yang, X.; Jiang, Q.; Zhang, Q.; Wang, Y. Surface modification of Mitoxantrone-loaded PLGA nanospheres with chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2009) 73, 212–18.

Chung, Y.; Kim, J.; Kim, Y.; Tae, G.; Lee, S.; Kim, K.; Kwon, I. The effect of surface functionalization of PLGA nanoparticles by heparin- or chitosan-conjugated Pluronic on tumor targeting. *Journal of Controlled Release* (2010) 143, 374–82.

Chung, Y.; Tae, G.; Yuk, S. A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors. *Biomaterials* 27 (2006) 2621–6.

Cillo, U.; Vitale, A.; Grigoletto, F.; Farinati, F.; Brolese, A.; Zanusi, G.; Neri, D.; Boccagni, P.; Srsen, N.; D'Amico, F.; Ciarleglio, F.; Bridda, A.; D'Amico, D. Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *Journal of Hepatology* (2006) 44, 723–31.

Coura, R.; Nardi, N. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology Journal* (2007) 4, 1-7.

Croce, C. Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine* (2008) 358, 502-11.

Dam, T.; Gabius, H.; Sabine, A.; Kaltner, H.; Lensch, M.; Brewer, F. Galectins bind to the multivalent glycoprotein asialofetuin with enhanced affinities and a gradient of decreasing binding constants. *Biochemistry* (2005) 44, 12564-71.

Devi, P. Basics of carcinogenesis. *Health Administrator* (2004) 17, 16–24.

Diaz, R.; Lopez-Barcons, L.; Ahn, D.; Garcia-Espana, A.; Yoon, A.; Matthews, J.; Manges, R.; Perez-Soler, R.; Pellicer, A. Complex effects of Ras proto-oncogenes in tumorigenesis. *Carcinogenesis* (2004) 25, 535-39.

Díez, S.; Navarro, G.; Tros de Ilduya, C. In vivo targeted gene delivery by cationic nanoparticles for treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gene Medicine Research* (2009) 11, 38–45.

Freiberg, S.; Zhu, X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics* (2004) 282, 1–18.

Donato, F.; Tagger, A.; Chiesa, R.; Ribero, M.; Tomasoni, V.; Fasola, M.; Gellatti, U.; Portera, G.; Boffetta, P.; Nardi, G. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case control study in Italy. *Hepatology* (1997) 26, 579–84.

Donato, F.; Tagger, A.; Gelatti, U.; Parrinello, G.; Boffetta, P.; Albertini, A.; Decarli, A.; Trevisi, P.; Ribero, M.; Martelli, C.; Porru, S.; Nardi, G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of

lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *American Journal of Epidemiology* (2002) 155, 323-31.

Dotor, J.; López-Vázquez, A.; Lasarte, J.; Sarobe, P.; García-Granero, M.; Riezu-Boj, J.; Martínez, A.; Feijó, E.; López-Sagaseta, J.; Hermida, J.; Prieto, J.; Borrás-Cuesta, F. Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine* (2007) 39, 106–15.

Dougan, M.; Dranoff, G. Immune therapy for cancer. *Annual Review of Immunology* (2009) 27, 83–117.

Drake, C.; Jaffee, E.; Pardoll, D. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in Immunology* (2006) 90, 51-81.

Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews on Cancer* (2004) 4, 11-22.

Edeline, J.; Raoul, J.; Vauleon, E.; Guillygomac'h, A.; Boudjema, K.; Boucher, E. Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: a retrospective study. *World Journal of Gastroenterology* (2009) 15, 713-6.

El-Serag, H.; Rudolph, L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* (2007) 132, 2557-76.

Ferdinandi, D.; Ferreira, A. Agentes alquilantes: reações adversas e complicações hematológicas. *AC&T Científica* (2009) 1, 1-12.

Ferreira, C; Silveira, T. Hepatites Virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia* (2004) 7, 473-87.

Fialkow, P. Clonal origin of human tumors. *Annual Review of Medicine* (1979) 30, 135-43.

Follenzi, A.; Bakovic, S.; Gual, P.; Stella, M.; Longati, P.; Comoglio, P. Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene* (2000) 19, 3041-49.

Fong, L.; Engleman, E. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annual Review of Immunology* (2000) 18, 245–73.

Fong, Y.; Blumgart, L.; Cohen, A. Surgical treatment of colorectal metastases to the liver. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (1995) 45, 50-62.

Fyfe, G.; Fisher, R.; Rosenberg, A.; Sznol, M.; Parkinson, D.; Arthur, C.; Louie, A. Results of treatment of 255 Patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Oncology* (1995) 13, 688-96.

Gabizon, A. Stealth Liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet. *Clinical Cancer Research* (2001) 7, 223–5.

Garden, O.; Rees, M.; Poston, G.; Mirza, D.; Saunders, M.; Ledermann, J.; Primrose, J.; Parks, R. Guidelines for resection of colorectal cancer liver metastases. *Gut* (2006) 55, 1-8.

Gerlini, G.; Tun-Kyi, A.; Dudli, C.; Burg, G.; Pimpinelli, N.; Nestle, F. Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *American Journal of Pathology* (2004) 165, 1853-63.

Gil-Guerrero, L.; Dotor, J.; Huijbregtse, I.; Casares, N.; López-Vázquez, A.; Rudilla, F.; Riezu-Boj, J.; López-Sagaseta, J.; Hermida, J.; van Deventer, S.; Bezunartea, J.; Llopiz, D.; Sarobe, P.; Prieto, J.; Borrás-Cuesta, F.; Lasarte, J. In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF- β 1. *Journal of Immunology* (2008) 181, 126-35.

Giles, R.; van Es, J.; Clevers, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* (2003) 1653, 1-24.

Gough-Palmer, A.; Gedroyc, W. Laser ablation of hepatocellular carcinoma - a review. *World Journal of Gastroenterology* (2008) 14: 7170-4.

Guermonprez, P.; Valladeau, J.; Zitvogel, L.; Théry, C.; Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology* (2002) 20, 621-67.

Guyton, A.; Hall, J. *Textbook of medical physiology*, 10^a ed., W.B. Saunders Company, 2000.

Gray, H. *Anatomy of the Human Body*, Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. (Disponível em <http://www.bartleby.com/107/> - acessado em 14/9/2010)

Grimm, D. Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods* (2002) 28, 146–57.

Hans, M.; Lowman, A. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* (2002) 6, 319–27.

Hansen, K.; Kelley, M. Review of mammalian DNA repair and translational implications. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2000) 295, 1-9.

Hassan, M.; Hwang, L.; Hatten, C.; Swaim, M.; Li, D.; Abbruzzese, J.; Beasley, P.; Patt, Y. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* (2002) 36, 1206-13.

Hubbell, J.; Thomas, S.; Swartz, M. Materials engineering for immunomodulation. *Nature* (2009) 26, 449-60.

Hussain, P.; Hofseth, L.; Harris, C. Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer* (2003) 3, 276-85.

Inge, T.; Hoover, S.; Susskind, B.; Barrett, S.; Bear, H. Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor. *Cancer Research* (1992) 52, 1386-92.

Iwasaki, A.; Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* (2010) 327, 291-5.

Jain, R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* (2000) 21, 2475-90.

Janeway, C.; Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* (2002) 20, 197-216.

Joyce, J.; Pollard, J. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer* (2009) 9, 239-53.

Kakish, H.; Tashtoush, B.; Ibrahim, H.; Najib, N. A novel approach for the preparation of highly loaded polymeric controlled release dosage forms of diltiazem HCl and diclofenac sodium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2002) 54, 75-81.

Kim, J.; Gambhir, V.; Alatery, A.; Basta, S. Delivery of exogenous antigens to induce cytotoxic CD8+ T lymphocyte responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2010) 2010, 1-10.

Klein, C. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Review Cancer* (2009) 9, 302-12.

Kocbek, P.; Obermajer, N.; Cegnar, M.; Kos, J.; Kristl, J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of Controlled Release* (2007) 120, 18-26.

Kudo, M.; Chung, H.; Osaki, Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). *Journal of Gastroenterology* (2003) 38, 207-15.

Kudo, M. Hepatocellular Carcinoma 2009 and beyond: from the surveillance to molecular targeted therapy. *Oncology* (2008) 75, 1-12.

Kufe, D.; Pollock, R.; Weichselbaum, R.; Bast, R.; Gansler, T.; Holland, J.; Emil Frei, E. *Holland-Frei cancer medicine*, 6^a ed., BC Decker Inc., 2003.

Kumari, A.; Yadav, S.; Yadav, S. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2010) 75, 1–18.

Lanier, L. NK cell receptors. *Annual Review of Immunology* (1998) 16, 359–93.

Lanier, L. NK cell recognition. *Annual Review of Immunology* (2005) 23, 225–74.

Lasic, D.; Martin, F.; Gabizon, A.; Huang, S.; Papahadjopoulos, D. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochimica et Biophysica Acta* (1991) 1070, 187–92.

Lattime, E.; Gerson, S. *Gene therapy of cancer: translational approaches from preclinical studies to clinical implementation*, 2^a ed, Academic Press, 2002.

Lenschow, D.; Walunas, T.; Bluestone, J. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual Review of Immunology* (1996) 14, 233–58.

Li, M.; Wan, Y.; Sanjabi, S.; Robertson, A; Flavell, R. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology* (2006) 24, 99–146.

Lieber, C. Mechanism of ethanol induced hepatic injury. *Pharmacologycol Therapy* (1990) 46, 1-41.

Liyanage, U.; Moore, T.; Joo, H.; Tanaka, Y.; Herrmann, V.; Doherty, G.; Drebin, J.; Strasberg, S.; Eberlein, T.; Goedegebuure, P.; Linehan, D. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of Immunology* (2002) 169, 2756-61.

Liu, Q.; Huang, J.; Liu, H.; Wan, P.; Ye, X.; Xu, Y. Analyses of domains and domain fusions in human proto-oncogenes. *BMC Bioinformatics* (2009) 10, 1-16.

Llopiz, D.; Dotor, J.; Casares, N.; Bezunartea, J.; Diaz-Valdes, N.; Ruiz, M.; Aranda, F.; Berraondo, P.; Prieto, J.; Lasarte, J.; Borrás-Cuesta, F.; Sarobe, P. Peptide inhibitors of transforming growth factor- β enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *International Journal of Cancer* (2009) 125, 2614-23.

Llovet, J.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J.; Oliveira, A.; Santoro, A.; Raoul, J.; Forner, A.; Schwartz, M.; Porta, C.; Zeuzem, S.; Bolondi, L.; Greten, T.; Galle, P.; Seitz, J.;

Borbath, I.; Haussinger, D.; Giannaris, T.; Shan, M.; Moscovici, M.; Voliotis, D.; Bruix, J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine* (2008) 359, 378-90.

Loeb, L.; Harris, C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Resolutions* (2008) 68, 6863-72.

Lu, Y. Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy — a review. *Stem cells and development* (2004) 13, 133–45.

Mapara, M.; Sykes, M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of Clinical Oncology* (2004) 22, 1136-51.

Marrero, J.; Fontana, R.; Barrat, A.; Askari, F.; Conjeevaram, H.; Su, G.; Lok, A. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an american cohort. *Hepatology* (2005) 41, 707-16.

Massing, U.; Fuxius, S. Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness. *Drug Resistance Updates* (2000) 3, 171–7.

Mazzafero, V.; Regalia, E.; Doci, R.; Andeola, S.; Pulvirenti, A.; Bozzeti, F.; Montalito, F.; Ammatuna, M.; Morabito, A.; Gennari, L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *The New England Journal of Medicine* (1996) 334, 693-9.

Mazzolini, G.; Qian, C.; Navaiza, I.; Barajas, M.; Borrás-Cuesta, F.; Xie, X.; Duarte, M.; Melero, I.; Prieto, J. Adenoviral gene transfer of interleukin 12 into tumors synergizes with adoptive T cell therapy both at the induction and effector level. *Human Gene Therapy* (2000) 11, 113-25.

Melief, C.; Offringa, R.; Toes, R.; Kastt, M. Peptide-based cancer vaccines. *Current Opinion in Immunology* (1996) 8, 651-7.

Ministério da Saúde. Programa Nacional de Hepatites Virais: Avaliação da Assistência às Hepatites Virais no Brasil. Brasília (2002) 1-61

Mocellin, S., Marincola, F.; Young, H. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *Journal of Leukocyte Biology* (2005) 78, 1043-51.

Mogi, T.; Ohtake, N.; Yoshida, M.; Chimura, R.; Kamaga, Y.; Ando, S.; Tsukamoto, T.; Nakajima, T.; Uenodan, H.; Otsuka, M.; Matsuda, Y.; Ohshima, K.; Makino, K. Sustained release of 17 β -estradiol from poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vitro and in vivo. *Colloid Surface B.* (2000) 17, 153–65.

Morgan, T.; Mandayam, S.; Jamal, M. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* (2004) 127, 87-96.

Nagata, T.; Koide, Y. Induction of specific CD8⁺ T cells against intracellular bacteria by CD8⁺ T-cell-oriented immunization approaches. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2010) 2010, 1-11.

National Cancer Institute. Chemotherapy and you: support for people with cancer, 2007 (disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/coping/chemotherapy-and-you> - acessado 19/10/2010)

Negrini, S.; Gorgoulis, V.; Halazonetis, T. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010) 11, 220-28.

Niwa, R.; Hatanaka, S.; Shoji-Hosaka, E.; Sakurada, M.; Kobayashi, Y.; Uehara, A.; Yokoi, H.; Nakamura, K.; Shitara, S. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of FcRIIIa functional polymorphism. *Clinical Cancer Research* (2004) 10, 6248–55.

Nobs, L.; Buchegger, F.; Gurny, R.; Allemann, E. Surface modification of poly(lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods. *International Journal of Pharmaceutics* (2003) 250, 327-37.

Nobs, L.; Buchegger, F.; Gurny, R.; Allemann, E. Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2004) 93, 1980–92.

Outwater, E. Imaging of the liver for hepatocellular cancer. *Cancer Control. Journal of the Moffitt Cancer Center* (2010) 17, 72-82.

Palena, C.; Schlom, J. Vaccines against human carcinomas: strategies to improve antitumor immune responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2010) 2010, 1-12.

Pamer, E.; Cresswell, P. Mechanisms of MHC class I - restricted antigen processing. *Annual Review of Immunology* (1998) 16, 323–58.

Pang, R.; Poon, R. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology* (2007) 72, 30-44.

Panyam, J.; Zhou, W.; Prabha, S.; Sahoo, S.; Labhasetvar, V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-coglycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *The FASEB Journal* (2002) 16, 1217-26.

Pardoll, D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annual Review of Immunology* (2003) 21, 807–39.

Park, J.; Fong, P.; Lu, J.; Russell, K.; Booth, C.; Saltzman, M.; Fahmy, T. PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2009) 5, 410–18.

Pawelec, G. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunology and Immunotherapy* (2004) 53, 262–74.

Pinto Reis, C.; Neufeld, R.; Ribeiro, A.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2006) 2, 8–21.

Poirier, M. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nature Reviews Cancer* (2004) 4, 630-7.

Rabinovich, G.; Gabrilovich, D.; Sotomayor, E. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology* (2007) 25, 267–96.

Raza, S.; Clifford, G.; Franceschi, S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *British Journal of Cancer* (2007) 96, 1127-34.

Rossi, S.; Di Stasi, M.; Buscarini, E.; Quaretti, P.; Garbagnati, F.; Squassante, L. Percutaneous RF interstitial thermal ablation in the treatment of hepatic cancer. *American Journal of Roentgenology* (1996) 167, 759-68

Rothkamm, K.; Löbrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2003) 100, 5057–62.

Rubin, H. Selective clonal expansion and microenvironmental permissiveness in tobacco carcinogenesis. *Oncogene* (2002) 21, 7392 – 7411.

Rudin, C.; Thompson, C. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annual Review of Medicine* (1997) 48, 267–81.

Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Itoh, M.; Kuniyasu, Y.; Nomura, T.; Toda, M.; Takahashi, T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews* (2001) 182, 18–32.

Saxena, V.; Sadoqi, M.; Shao, J. Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release. *International Journal of Pharmaceutics* (2004) 278, 293–301.

Schotsaert, M.; Ibañez, L.; Fiers, W.; Saelens, X. Controlling influenza by cytotoxic T-cells: calling for help from destroyers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2010) 2010, 1-13.

Seong, J. Challenge and hope in radiotherapy of hepatocellular carcinoma. *Yonsei Medical Journal* (2009) 50, 601-12.

Serrati, S.; Margheri, F.; Pucci, M.; Cantelmo, A.; Cammarota, R.; Dotor, J.; Borrás-Cuesta, F.; Fibbi, G.; Albini, A.; Del Rosso, M. TGF β 1 antagonistic peptides inhibit TGF β 1-dependent angiogenesis. *Biochemical Pharmacology* (2009) 77, 813–25.

Shen, L.; Rock, K. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology* (2006) 18, 85–91.

Shevach, E. Certified professionals: CD4+ CD25+ suppressor T cells. *The Journal of Experimental Medicine* (2001) 193, F41-4.

Shih, W.; Chen, Y.; Shih, C.; Hon, M.; Wang, M. Structural and morphological studies on poly(3-hydroxybutyrate acid) (PHB)/chitosan drug releasing microspheres prepared by both single and double emulsion processes. *Journal of Alloys and Compounds* (2007) 434-435, 826-9.

Simmonds, P.; Primrose, J.; Colquitt, J.; Garden, O.; Poston, G.; Rees, M. Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *British Journal of Cancer* (2006) 94, 982-99.

Singal, A.; Marrero, J. Recent advances in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Current Opinion in Gastroenterology* (2010) 26, 189–95.

Sítio na web do INCA - Quimioterapia: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101 - acessado em 26/8/2010.

Sítio na web do *University of Southern California Comprehensive Liver Cancer Center*: <http://www.usclivercancer.org/hccsymptoms.html> - acessado em 12/07/2010.

Somia, N.; Verma, I. Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Reviews on Genetics* (2000) 1, 91–9.

Soppimatha, K.; Aminabhavia, T.; Kulkarnia, A.; Rudzinski, W. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* (2001) 70, 1–20.

Stevanovic, S. Identification of tumor associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nature Reviews on Cancer* (2002) 2, 1-7.

Sutmuller, R.; van Duivenvoorde, L.; van Elsas, A.; Schumacher, T.; Wildenberg, M.; Allison, J.; Toes, R.; Offringa, R.; Melief, C. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of Experimental Medicine* (2001) 194, 823–32.

Szabo, S.; Sullivan, B.; Peng, S.; Glimcher, L. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual Review of Immunology* (2003) 21, 713–58.

Tada, T.; Ohzeki, S.; Utsumi, K.; Takiushi, H.; Muramatsu, M.; Li, X.; Shimizu, J.; Fujiwara, H.; Hamaoka, T. Transforming growth factor beta induced inhibition of T cell function: susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *The Journal of Immunology* (1991) 146, 1077-82.

Tanaka, T. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis* (2009) 8, 1–19.

Timmerman, J.; Levy, R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annual Review of Medicine* (1999) 50, 507-29.

Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* (1995) 13, 251-76.

Turner, P.; Sylla, A.; Diallo, M.; Castegnaro, J.; Hall, A.; Wild, C. The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: a basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2002) 17, 441-8.

Villanueva, A.; Minguez, B.; Forner, A.; Reig, M.; Llovet, J. Hepatocellular carcinoma: novel molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy. *Annual Review of Medicine* (2010) 61, 317-28.

Vasir, J.; Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2007) 59, 718–28.

Volk, M.; Vijan, S.; Marrero, J. A novel model measuring the harm of transplanting hepatocellular carcinoma exceeding Milan criteria. *American Journal of Transplantation* (2008) 8, 839–46.

Weiner, L.; Surana, R.; Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* (2010) 10, 317-27.

Wu, Z.; Asokan, A.; Samulski, R. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular Therapy* (2006) 14, 316-27.

Xu, F.; Lu, W.; Wu, H.; Fan, L.; Gao, X.; Jiang, X. Brain delivery and systemic effect of cationic albumin conjugated PLGA nanoparticles. *Journal of Drug Targeting* (2009) 17, 423–34.

Yang, Y.; Chung, T.; Bai, X.; Chan, W. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science* (2000) 55, 2223–36.

Zetter, B. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual Review of Medicine* (1998) 49, 407-24.

Zhang, T.; Ding, X.; Wei, D.; Cheng, P.; Su, X.; Liu, H.; Wang, D.; Gao, H. Sorafenib improves the survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized trials. *Anti-Cancer Drugs* (2010) 21, 326-32.

Zhang, Z.; Lee, S.; Feng, S. Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* (2007) 28, 1889–99.