

CHAMBERTTAN SOUZA DESIDÉRIO

**AVALIAÇÃO DO INFILTRADO TUMORAL EM CAMUNDONGOS
INDUZIDOS A TUMOR DE MAMA SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM
CÉLULAS DENDRÍTICAS E ATIVIDADE FÍSICA**

UBERABA -MG

2017

CHAMBERTTAN SOUZA DESIDÉRIO

**AVALIAÇÃO DO INFILTRADO TUMORAL EM CAMUNDONGOS
INDUZIDOS A TUMOR DE MAMA SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM
CÉLULAS DENDRÍTICAS E ATIVIDADE FÍSICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro como requisito para obtenção
do Título de Mestre em Ciências da Saúde.
Área de Concentração: Patologia Básica e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta.
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin

UBERABA -MG

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

D487a Desidério, Chamberttan Souza
Avaliação do infiltrado tumoral em camundongos induzidos a tumor de
mama submetidos à imunoterapia com células dendríticas e atividade física /
Chamberttan Souza Desidério. – 2017.
50 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

1. Neoplasias mamárias. 2. Imunoterapia. 3. Células dendríticas. 4. Exercício. 5. Antígenos de superfície. I. Murta, Eddie Fernando Candido. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.937

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar tenho que agradecer a Deus pelo dom da vida, por sempre estar presente em minha vida, me iluminando e guiando meus passos a cada dia. Dando forças para fazer as escolhas certas e enfrentar os maiores desafios.

Agradeço minha família pelo apoio incondicional e por me apoiarem e darem forças para continuar, em muitas vezes acreditando mais em mim do que eu mesmo, em especial aos mais próximos: minha mãe Márcia, minha madrinha Rosângela, minha avó Sebastiana, meu avô Carlos, meus irmãos e meu tio Daniel. Tenho que dedicar essa conquista também a duas pessoas que sempre foram grandes incentivadoras dos meus sonhos mais pela vontade divina, não estão me vendo aqui da terra, mais tenho certeza que lá do céu, minha avó Marta e meu pai Danimar devem estar orgulhosos dessa conquista.

Aos meus orientadores, que tem boa parte nessa conquista, pessoas integras tanto pessoalmente como profissionalmente, que eu tenho maior respeito e admiração. Ao Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta e Prof^a. Dr^a. Marcia Antoniazi Michelin que me deram a oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente.

A todos os amigos que tiveram presentes na minha vida, um pedaço dessa conquista é de vocês. Aos professores que passaram na minha e puderam contribuir com grandes aprendizados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores que tiveram participação na minha formação, tanto os mestres da graduação, tanto os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelos ensinamentos diários, críticas construtivas e por todas as experiências compartilhadas.

Agradeço a todos os amigos que passaram por minha vida durante a graduação e a pós-graduação, em especial ao meu G2 (Sussumu, Nati e Tau) que mesmo depois de formados ainda estão presentes na minha vida mesmo que de forma mais distante, as grandes companheiros da “rapeize”: Caião, Jonatas, Brunão, Rodrigo, Wesley, Zebs, Gotti, Rivo e Cleyson que estão presentes nas horas boas e ruins, a vocês meu muito obrigado.

Aos amigos queridos do Instituto de Pesquisa em Oncologia, que sempre compartilharam conhecimento, alegrias e aprendizados diários, em especial: Jéssica, Poly, Angela, Tau, Larissa, Andjara, Mara, Saulo, Eduardo, Cláudio, André. E também aos que já passaram e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, em especial: Alessandra, Thiago e Douglas.

Aos secretários do Curso de Pós-graduação, que sempre estiveram presentes quando preciso e que me dedicaram grande atenção: André e Tuania.

À Disciplina de Imunologia, a todos professores da Disciplina e em especial ao Fabiano e à Andréia, que foram sempre presentes nas atividades realizadas na Graduação e também à Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, em especial à Andréia.

Aos colegas de Pós-graduação e Graduação pelo convívio, aprendizado e inúmeras ajudas.

RESUMO

O infiltrado inflamatório tem uma importante participação na resposta imune contra diversas doenças, entre elas o câncer. Diante disso, o trabalho tem como objetivo, avaliar o infiltrado inflamatório de camundongos induzidos ao tumor de mama, tratados com a vacina de Células Dendríticas, atividade física e terapia combinada (atividade física + vacina de células dendríticas). Para realização do estudo, foram utilizados 70 camundongos BALB/c, sendo 60 fêmeas e 10 de ambos os gêneros para extração de medula e confecção da vacina de Células Dendríticas, as fêmeas foram divididas em 4 grupos com n=15: grupo tumor sem tratamento(T), grupo tumor submetido a prática de atividade física(TAF), grupo tumor tratado com vacina de células dendríticas(TDC) e grupo tumor atividade física mais vacinação com células dendríticas(TTC). O tumor dos animais foi extraído pós eutanásia para avaliação por imunofluorescência dos seguintes marcadores: linfócitos T auxiliares e citotóxicos(CD4 e CD8), MHC II(IA), moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD152) e moléculas de adesão (CD54 e CD102). Como resultados verificamos um volume tumoral final menor estatisticamente significativo dos grupos tratados quando comparados aos animais do grupo tumor sem tratamento, tendo apresentado valor de $p < 0.0030$ para o grupo TAF, $p < 0,0023$ para TDC e $p < 0,0182$ para TC. Na avaliação dos marcadores de superfície verificou-se diferenças significativas na expressão de MHC II no grupo tumor DC comparado ao grupo T com $p < 0,0255$. Verificamos alterações na expressão de CTLA-4, verificando uma diminuição estatisticamente significativa quando comparamos o grupo TDC com os grupos TAF e TTC, apresentando $p < 0,0178$. Em relação as moléculas de adesão ICAM-1 e ICAM-2, observamos um aumento significativo para ICAM-1 em todos os grupos submetidos a algum tipo de imunoterapia verificando-se $p < 0,0001$. A molécula de adesão ICAM-2 demonstrou um aumento significativo na sua expressão nos grupos que sofreram intervenção imunoterápica. Concluímos que os diferentes tipos de imunoterapia foram capazes de modular a resposta imune antitumoral, causando assim modificações no infiltrado que levaram a uma menor progressão tumoral.

Palavras Chaves: Neoplasias mamárias; Imunoterapia; Células dendríticas; Exercício; Antígenos de superfície.

ABSTRACT

The inflammatory infiltrate has an important participation in the immune response against several diseases, among them cancer. Therefore, the objective of this study was to evaluate the inflammatory infiltrate of mice induced to the breast tumor, treated with the Dendritic Cell vaccine, physical activity and combined therapy (physical activity + dendritic cell vaccine). For the study, 70 BALB / c mice were used, 60 females and 10 of both genera for spinal cord extraction and Dendritic cell vaccine preparation, females were divided into 4 groups with $n = 15$: untreated tumor group (TTC), tumor group undergoing physical activity (TAF), tumor group treated with dendritic cell vaccine (TDC) and tumor group physical activity plus dendritic cell vaccination (TTC). Tumor of the animals was extracted post euthanasia for (CD4 and CD8), MHC II (IA), costimulatory molecules (CD80, CD86 and CD152) and adhesion molecules (CD54 and CD102) were evaluated by immunofluorescence evaluation of the following markers: helper and cytotoxic T lymphocytes. As results we found a final lower tumor volume statistically significant of the treated groups when compared to the animals of the untreated tumor group, presenting $p < 0.0030$ for the TAF group, $p < 0.0023$ for TDC and $p < 0.0182$ for CT. In the evaluation of the surface markers there were significant differences in MHC II expression in the DC tumor group compared to the T group with $p < 0.0255$. We verified changes in CTLA-4 expression, showing a statistically significant decrease when comparing the BDC group with the TAF and TTC groups, presenting $p < 0.0178$. In relation to the ICAM-1 and ICAM-2 adhesion molecules, we observed a significant increase for ICAM-1 in all groups submitted to some type of immunotherapy, with $p < 0.0001$. The ICAM-2 adhesion molecule demonstrated a significant increase in its expression in the groups that underwent immunotherapeutic intervention. We conclude that the different types of immunotherapy were able to modulate the antitumor immune response causing modifications in the infiltrate that led to a lesser tumor progression.

Keywords: Breast neoplasms; Immunotherapy; Dendritic cells; Exercise; Surface antigens.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do software com exemplo da quantificação da imunofluorescência.....30
- Figura 2.** Representação do volume tumoral mensurado por meio da formula $V=a.b^2/2$ onde a é o maior diâmetro e b menor diâmetro.31
- Figura 3.** Grafico de avaliação das moléculas de superfície para células T: CD4 PE CY 5.0 e CD8 APC, presente em tumores analisados por Imunofluorescência.....32
- Figura 4.** Grafico de avaliação da molécula de superfície para MHC de classe II, representado pelo marcador de superfície IA PE,, presente em tumores analisados por Imunofluorescência.....33
- Figura 5.** Grafico de avaliação dos marcadores de superfície para moléculas co-estimulatórias: CD80 FITC (B7-1) e CD86 APC (B7-2), presente em tumores analisados por Imunofluorescência.....34
- Figura 6.** Grafico de avaliação do marcador de superfície para o ligante de moléculas co-estimulatórias: CD 152 PE (CTLA-4), presente em tumores analisados por Imunofluorescência.....35
- Figura 7.** Grafico de avaliação do marcador de superfície para moléculas de adesão:CD54 PE (ICAM-1) e CD102 FITC (ICAM-2), presente em tumores analisados por Imunofluorescência.....36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

δ Delta

γ Gama

μ Micro

η nano

% Percentage

°C Degree Celsius

4T1 linhagem de células tumorais selecionadas de 4T0.4 tumor de mama

APC Aloficocianine

BSA Albumin from bovine

CD Cluster differentiation

DCs Células Dendríticas

CG Grupo Controle

CHP/MHC Major of histocompatibility complex

CO₂ Dióxido de Carbono

CTLA-4 Cytotoxic T lymphocyte antigen 4

DCs Células Dendríticas

FITC Fluorescein isothiocyanate

FoxP3 Forkhead box P3

g Grama

GM-CSF Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago

HER-2 fator de crescimento epidermal humano

IFN- γ Interferon gama

Ig Immunoglobulina

IL- Interleucina

ICAM-1 molécula de adesão intercelular 1

ICAM-2 molécula de adesão intercelular 2

IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium

kg Kilograma

LPS Lipopolissacarídeo

M Molar

M-CSF Fator estimulador de colônia de macrófago

MFI Média de Intensidade de fluorescência

MHC Molécula de histocompatibilidade principal

min minuto

mg Miligrama

ml Mililitro

mm³ milímetro cúbico

NK Natural killer

nm Nanômetro

p probability

PBS Phosphate buffered saline

PE Phycoerythrin

PeCy Ficoeritrina Cianina

PFA Paraformaldeído

pg picograma

FBS soro fetal de bovino

TCR Receptor de Célula T

TGF- β fator transformador do crescimento beta

Th T auxiliar ou helper

TIL Linfócito infiltrante de tumor

TLR Receptor de Toll Like

TNF- α Fator de necrose tumoral alpha

Treg célulaT regulatória

Sumário

1.1-Epidemiologia e o Câncer de Mama	11
1.2-Modelo experimental em camundongos utilizando linhagem celular 4T1	13
1.3-Resposta imune a tumores e perfis de resposta imune	15
1.4-Atividade física e sistema imune	18
1.5-Atividade Física e resposta antitumoral	20
1.6-Papel das células dendríticas na resposta antitumoral.....	22
1.7- Caracterização do infiltrado celular tumoral.....	24
2-JUSTIFICATIVA	25
3.OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos gerais.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4-MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1-Animais e grupos experimentais	27
4.2-Obtenção de células dendríticas da medula óssea do fêmur e tíbia de camundongos	28
4.3-Indução dos tumores, protocolo de treinamento e vacinas de células dendríticas	28
4.4- Verificação do tamanho tumoral e Imunofluorescência	29
4.5-Analise Estatística.....	30
5-RESULTADOS.....	31
5.1-Analise do Crescimento tumoral induzido pelas células 4T1.....	31
5.2- Analise de moléculas de superfície no tumor através de imunofluorescência.....	32
6-DISCUSSÃO.....	37
7-CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS.....	48

1 **1-INTRODUÇÃO**

2 **1.1-Epidemiologia e o Câncer de Mama**

3 O câncer de mama se mostra como um dos tipos que apresentam maior
4 complexidade e maior incidência nas mulheres brasileiras. A epidemiologia confirma
5 essa incidência visto que somente no Brasil, em 2016, eram esperados 57.960 casos novos
6 de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Sem
7 considerar os números dos tumores de pele que são do tipo não melanoma, o tumor de
8 mama se mostra o tipo mais frequente e que mais acomete mulheres em quase todas as
9 regiões brasileiras exceto na região norte, onde é considerado o segundo mais frequente.
10 (INCA,2016).

11 Essa alta complexidade se explica devido a existência de diferentes fatores de
12 risco que estão relacionados com o desenvolvimento da doença, dentre eles: idade
13 avançada, características reprodutivas, história familiar e pessoal, hábitos de vida e
14 influências ambientais e fatores de risco genéticos. As características reprodutivas de
15 risco se dão porque a doença é estrogênio-dependente, e compreende a menarca precoce,
16 a menopausa tardia, a primeira gestação após os 30 anos e a esterilidade feminina
17 (ARAÚJO DA SILVA I; DA; RIUL, 2011). Além desses fatores relacionados a biologia
18 da mulher, existem outros que estão relacionados ao hábito de vida, genético hereditários
19 e ao envelhecimento (CHAIMOWICZ, 2011). A ação desses diferentes fatores são
20 capazes de induzir a formação de células neoplásicas (neoplasias), através de
21 transformações que prejudicam a integridade funcional do ciclo celular, causando
22 alterações moleculares e fenotípicas (KARINA et al., 2008; LOEB; HARRIS, 2009) .
23 Essas neoplasias podem ser classificadas quanto a malignidade em maligna e benigna,
24 quando classificadas como malignas, vêm sendo consideradas como um grande problema
25 crônico de extrema importância para a saúde pública devido a diversos aspectos como
26 prevalência, incidência alta e mortalidade, fazendo com que a área da oncologia se torne
27 uma das mais promissoras no presente e no futuro (HERR, 2013).

28 Em virtude do exposto, o papel dos dados epidemiológicos são de extrema
29 importância para a decisão sobre os diferentes tipos de tratamento do câncer, através
30 desses dados é possível obter informações utilizadas para a tomada de decisões sobre o
31 tratamento. Visto que a maior parte dos tipos de cânceres exigem múltiplas etapas para
32 seu desenvolvimento, etapas essas que podem ocorrer ao longo de muitos anos, podendo

1 assim ser evitados pela eliminação da exposição a fatores considerados determinantes.
2 Dessa forma, se detectar o potencial de malignidade antes das células se tornarem
3 malignas, ou seja, na fase inicial da doença, se tem uma condição favorável ao tratamento
4 e conseqüentemente a cura (INCA,2016).

5

6

1.2-Modelo experimental em camundongos utilizando linhagem celular 4T1

Nos últimos anos o modelo em pesquisa animal vem sendo amplamente utilizado, e é visto na literatura que o uso de ratos e camundongos são grandes, nos estudos que se referem aos mecanismos envolvidos na carcinogênese do tumor mamário e na verificação da efetividade de atividades preventivas, utilização de fármacos e formas alternativas de imunoterapia. Algumas características encontradas em estudos anteriores reforçam a utilização desses animais como um modelo valido na pesquisa oncológica: a glândula mamária e a carcinogênese desenvolvida nela, pois existem muitas semelhanças entre as glândulas mamárias animais e os carcinomas formados nelas, com o que ocorre em humanos tanto no campo histológico quanto no campo do desenvolvimento tumoral (RUSSO et al.,1990).

A utilização da linhagem celular tumoral 4T1, que se trata de uma linhagem de células de tumor transplantável, altamente tumorigênicas e invasivas, originalmente isoladas da subpopulação 410.4, derivada de metástase espontânea de tumor mamário em camundongos BALB/c (DEXTER et al., 1978; HEPPNER et al., 1978). Apresenta resistência à 6-tioguanina, esse tipo de tumor, ao contrário da maior parte dos modelos de tumor, pode, espontaneamente, originar metástase do tumor primário na glândula mamária, invadindo múltiplos locais distantes, incluindo nódulos linfáticos, sangue, fígado, pulmão, cérebro e osso. (HEPPNER et al., 2000). Essa resistência à 6-tioguanina também ajuda na quantificação exata de células metastáticas, mesmo quando elas são encontradas em níveis sub-microscópicas em órgãos distantes (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG,2001).

A linhagem 4T1 apresenta um crescimento progressivo do tumor e mesmo após a retirada do tumor primário, ocorre uma doença letal uniforme (MORECKI; YACOVLEV; SLAVIN, 1998; PULASKI et al., 2000). O tumor 4T1 tem várias características que o tornam um modelo animal experimental adequado para o câncer de mama humano. Suas células tumorais são facilmente transplantadas para a glândula mamária, de modo que o tumor primário cresce no local anatomicamente correto. Em segundo lugar, tal como no câncer de mama humano, a metástase da linhagem 4T1 desenvolve-se espontaneamente a partir do tumor primário. Além disso, a difusão progressiva de metástases para os nódulos linfáticos de drenagem e de outros órgãos é

1 muito semelhante ao do câncer de mama humano (PULASKI; OSTRAND-
2 ROSENBERG,2001).

3 Essas células são muito utilizadas em estudos para avaliar o efeito de terapias
4 antitumorais, fármacos (drogas antitumorais) e demais recursos terapêuticos contra o
5 tumor de mama, uma vez que permitem a identificação e a avaliação de eventos celulares
6 e moleculares existentes na interação célula-fármaco ou célula-célula no caso de
7 imunoterapias celulares, o que é da maior relevância clínica para humanos (PULASKI;
8 OSTRAND-ROSENBERG,2001).

9

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1.3-Resposta imune a tumores e perfis de resposta imune

O sistema imune consiste de duas linhas de defesa atuando de forma coordenada e integrada: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A resposta imune inata se caracteriza como a primeira linha de defesa e consiste de vários mecanismos celulares e humorais formados antes mesmo do nascimento. Apesar de possuir ação inespecífica, é capaz de atuar diretamente contra agentes infecciosos e é importante por induzir a segunda linha de defesa do organismo humano, a resposta imune adaptativa, também composta por mecanismos celulares e humorais, porém, de forma específica para cada tipo de antígeno, uma vez que a partir do seu desencadeamento se forma a memória imunológica, ou seja, ocorre a formação de células de memória produtoras de anticorpos específicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Essa resposta imune está relacionada também ao combate ao tumor.

O início dos estudos relacionados à resposta imune a tumores tem referências no final século XIX e início do século XX, a pesquisadora Macfarlane Burnet afirmava que uma das funções do sistema imunológico era o de reconhecer e destruir clones de células transformadas antes que essas se transformassem em tumores. Assim, o sistema imune apresentaria extrema importância no controle do crescimento tumoral por possuir inúmeros mecanismos e componentes na tentativa de uma defesa eficaz contra estas células multadas. A participação do sistema imune contra inúmeros tipos de tumores, ainda hoje, continua sendo um importante foco de pesquisas dos imunologistas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Grandes avanços ocorreram quando se chegou ao conceito conhecido como vigilância tumoral (“*immunosurveillance*”), consolidado em meados do século passado, que defende que o sistema imune é capaz de reconhecer e eliminar tumores em desenvolvimento, podendo assim evitar o surgimento de tumores clinicamente aparentes, mesmo na ausência de intervenção terapêutica (FUDEMBERG et al., 1980). Inúmeras pesquisas em animais evidenciaram que a produção de Interferon gama (IFN- γ) pelo sistema imune os protegia quanto ao desenvolvimento de tumores espontâneos ou induzidos. De forma contrária, a administração de antígenos específicos que causavam redução da produção endógena de IFN- γ provocava uma aceleração no crescimento e no desenvolvimento de tumores do tipo fibrossarcomas transplantados (CHAMMAS, 2010; SCHAROVSKY et al., 2006; SHANKARAN et al., 2001) . No sistema imune, as células mais importantes

1 na vigilância tumoral são os linfócitos T, que fazem parte da resposta imune adaptativa.
2 Quando ocorre reconhecimento de um antígeno em uma célula tumoral através do
3 receptor de células T (TCR), são ativadas células T CD8, que podem matar o tumor
4 (IGNEY; KRAMMER, 2002) .

5 A resposta antitumoral ocorre, na maior parte das vezes, em consequência da
6 expressão de componentes de superfície nas células malignas que dão origem às
7 estruturas antigênicas. Podemos evidenciar a presença e participação desses antígenos em
8 estudos com camundongos, onde células tumorais foram injetadas via subcutânea em
9 camundongos singênicos (MHC compatível) e formaram nódulos que cresceram por
10 alguns dias e, depois, regrediram. Após a injeção de células tumorais idênticas em
11 camundongos, elas não produziram nem nódulos nem cresceram. Os camundongos que
12 rejeitavam o tumor geraram uma resposta imunológica para ele. Foi demonstrado que
13 antígenos de transplante específicos de tumor (TSTAs), conhecidos como antígenos
14 tumorais, estão presentes em muitos tumores em diferentes espécies animais (COICO;
15 SUNSHINE,2010).

16 Ainda falando sobre a resposta antitumoral, devemos diferenciar o desempenho
17 de cada tipo de resposta dos subconjuntos de células TCD4+, T auxiliar ou T helper (Th)
18 que diferem nas citocinas que produzem, e em suas funções efetoras. Estes são atualmente
19 constituídos de: Th1, Th2, Th3 (atualmente T regulatório - Treg ou supressor) e Th17
20 (ZHU; PAUL, 2009) .

21 Desta forma, a resposta de padrão Th1 pode mediar respostas imunes contra
22 patógenos intracelulares (COFFMAN, 1989);PAUL; SEDER, 1994). Nos seres humanos,
23 desempenha um papel particularmente importante na resistência a infecções por
24 micobactérias e parasitas. As células Th1 são também responsáveis pela indução de
25 algumas doenças autoimunes. As principais citocinas produzidas são: IFN- γ , IL-2 e TNF-
26 α (ZHU; PAUL, 2009).

27 Já a resposta de padrão Th2 realiza a defesa contra parasitas extracelulares,
28 incluindo helmintos(COFFMAN, 1989; PAUL; SEDER, 1994; ZHU; PAUL, 2009;
29 ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Além disso, estas células são importantes na
30 indução e na persistência da asma e de outras doenças alérgicas. As células de padrão Th2
31 secretam as seguintes citocinas: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25, sendo que a IL-4
32 e IL-5 são as citocinas que definem o perfil de células Th2(ZHU; PAUL, 2009; IGNEY;

1 KRAMMER, 2002; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). É pertinente ressaltar que a
2 via de ativação das células T CD4 ocorre via MHC de classe II e a via de ativação das
3 células T CD8 ocorre pelo MHC de classe I.

4 O terceiro perfil presente na resposta imune antitumoral é o perfil Treg (células T
5 reguladoras). São células que constituem 5 a 10% do total populacional de células T
6 CD4+ em camundongos e em seres humanos e, estão principalmente envolvidas na
7 repressão de doenças autoimunes (AKBAR et al., 2003; WANG et al., 2004, 2006; WEI;
8 MORRIS; KONG, 2004; YAMAGUCHI; SAKAGUCHI, 2006; ZHU; PAUL, 2009).
9 Estas são caracterizadas pela expressão da proteína transmembrana CD25 que é a cadeia
10 do receptor da IL-2; do CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) e do FOXP3
11 (forkhead transcription factor). A funcionalidade das células do perfil Treg vem
12 incorporado uma visão inovadora na explicação de algumas enfermidades imunológicas,
13 passando, assim, a questionar o paradigma de diferenciação de perfis de resposta imune
14 Th1/Th2 e, como consequência, sua avaliação é considerada muito promissora como
15 opção terapêutica (DAMOISEAUX, 2006). Porém, células neoplásicas procuram formas
16 de escape do sistema imune e, uma das formas adotadas, seria, então, desviar a resposta
17 imune do perfil Th1 - IFN- γ e TNF- α (bom prognóstico, resposta antitumoral) para
18 resposta Th2 - IL-4 e IL-6 (na qual ocorre um pior prognóstico). O padrão Th1 funciona
19 pelo estímulo da imunidade celular ativando macrófagos e células dendríticas e, também,
20 recrutando células TCD8+ citotóxicas e células NK. Por outro lado, a resposta imune com
21 padrão Th2 inibe a imunidade mediada por células e favorece a resposta imune humoral
22 (GIUNTOLI et al., 2009).

23

24

25

1 **1.4-Atividade física e sistema imune**

2 A elevação na incidência de doenças cardiovasculares, de diabetes tipo 2, de
3 obesidade, de desordens musculoesqueléticas, de certos tipos de cânceres e de algumas
4 desordens neurológicas vem ocorrendo principalmente nas últimas décadas, com o
5 processo de urbanização e mudanças no hábito de vida da população mundial. O ganho
6 de novos hábitos menos saudáveis e mais sedentários tornam a população cada vez menos
7 ativa fisicamente, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento.
8 .Por isso, a qualidade e a expectativa de vida dessas populações diminuem
9 gradativamente(HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008) .

10 A prática de atividade física, tanto agudamente quanto em sua cronicidade, causa
11 mudanças em diversos componentes do sistema imune. Atividade física moderada faz
12 com que ocorra um estímulo em parâmetros relacionados à imunidade celular e, assim,
13 causa diminuição no risco de infecção. A prática de atividade física em alta intensidade,
14 por sua vez, irá causar um decréscimo destes mesmos parâmetros, aumentando, assim, o
15 risco de doenças infecciosas (LEANDRO et al., 2007; PEDERSEN; HOFFMAN-
16 GOETZ, 2000). Ocorre uma concordância em estudos anteriores que a atividade aeróbica
17 de alta intensidade desencadeia uma resposta pró-inflamatória, enquanto que a atividade
18 física de leve a moderada associados a períodos de duração médios ou longos gera uma
19 resposta anti-inflamatória (MOLDOVEANU; SHEPHARD; SHEK, 2001; PETERSEN;
20 PEDERSEN, 2005; ZIEKER et al., 2005) .

21 A realização de atividade física intensa causa no sistema imune do indivíduo
22 neutrofilia, linfopenia e monócitos (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000). Além
23 disso, a alta intensidade da atividade física pode induzir a inibição de vários aspectos do
24 sistema de defesa do organismo, dentre elas a atividade das células NK, a resposta
25 proliferativa dos linfócitos e a produção de anticorpos pelos plasmócitos (PEDERSEN;
26 HOFFMAN-GOETZ, 2000; PEDERSEN et al., 1988; PERES; OTTON; CURI, 2005).
27 Com estas alterações, ocorre um comprometimento da defesa do organismo contra
28 agentes infecciosos e oncogênicos, como também em processos alérgicos e
29 autoimunidade (ATANACKOVIC et al., 2004; LUCAS DA NOBREGA, 2005). Esses
30 estudos dão suporte para apoiar que ocorre uma imunossupressão induzida pelo estresse
31 (nesse caso físico), pois visto que linfócitos e macrófagos atuam diretamente contra a
32 carcinogênese e também a autoimunidade. Porém, observamos um efeito contrário
33 quando trabalhamos com uma carga moderada de exercícios físicos. Desta forma,

1 segundo Woods e colaboradores (2000), há um aumento da função fagocítica de
2 macrófagos de camundongos após 12 semanas de natação, sendo este treinamento de
3 intensidade moderada. Além disso, Pedersen e colaboradores (1993), observaram uma
4 menor incidência de infecções graças ao aumento da função imunológica de ciclistas
5 avaliados durante treinamento moderado e constante durante 4 anos. Assim sendo, a
6 atividade física moderada vem sendo considerada ideal de acordo com diversos estudos,
7 por possuir a capacidade de estar vinculada ao aumento da função de leucócitos, além de
8 auxiliar a quimiotaxia, a degranulação, a fagocitose e a atividade oxidativa dos neutrófilos
9 em períodos logo após o exercício físico (BACURAU et al., 2000; GLEESON; PYNE,
10 2000; NIEMAN, 2000).

11

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1.5-Atividade Física e resposta antitumoral

O número de estudos que inferem que a atividade física está relacionada com uma resposta imune antitumoral ainda é pequeno. O que podemos afirmar e que se sabe bem que o sistema imune está relacionado com a regulação da suscetibilidade ao câncer. Como abordado anteriormente, e que a atividade física é capaz de estimular positivamente o sistema imune, assim sendo, é coerente afirmar que, possivelmente, a atividade física tenha a função de reduzir o risco de câncer e regular positivamente a resposta imune antitumoral.

Estudos nos quais mulheres com estágio inicial de câncer de mama foram submetidas a atividade física aeróbica moderada antes e após tratamento do câncer evidenciaram melhorias na capacidade aeróbica, na força muscular e na função física dessas pacientes, além de melhora a qualidade de vida, e reduzirem a depressão e a ansiedade (SPECK et al., 2010). Evidências demonstram que a prática de atividade física regular em intensidade moderada reduz o risco de ocorrer o desenvolvimento do câncer de mama na pós-menopausa e melhora a sobrevida da paciente em caso do diagnóstico de câncer de mama(FRIEDENREICH; NEILSON; LYNCH, 2010) .

Recentemente, ocorreu um interesse enorme no papel que a atividade física exerce na atenuação de evolução de doenças crônicas que possuem um componente imunológico ou inflamatório, também como prevenção e redução do risco de recorrência do câncer de mama(NIEMAN et al., 1995). Entretanto, a maioria dos estudos recentes sobre tumor e atividade física tem enfatizado o número de leucócitos, a proliferação de linfócitos, a atividade de células NK, a síntese e a concentração de imunoglobulinas. Mas poucos estudos têm realizado uma abordagem integrada, ou seja, associando dados obtidos com alterações metabólicas e hormonais gerais que ocorrem no organismo portador de neoplasia (WOODS; DAVIS, 1994).

Em trabalhos experimentais do nosso grupo de estudo (Instituto de Pesquisa em Oncologia-IPON), a carcinogênese química através da injeção de DMBA em fêmeas de camundongos da linhagem BALB/C com indução do tumor e depois foram submetidas a prática de atividade física (natação). Os animais que realizaram atividade física mostraram uma melhoria na resposta imune contra o tumor de mama, uma vez que ocorreu a redução dos tumores e um volume tumoral final menor, quando comparados

1 aos animais que tiveram a indução do tumor e não realizaram atividade física(ABDALLA
2 et al., 2014). Ainda, em outro estudo experimental prévio, observou-se que animais
3 treinados apresentaram níveis de citocinas de padrão de resposta Th1 aumentados se
4 comparados a animais com tumor de mama e não treinados, que apresentaram um
5 predomínio de citocinas do padrão de resposta imune Th2(ABDALLA; MURTA;
6 MICHELIN, 2013).

7 Realizando uma análise bibliográfica, encontramos a influência positiva da
8 atividade física no sistema imune quando trabalhada em uma carga adequada. Entretanto,
9 para se inferir da capacidade de estimulação da resposta imune antitumoral pela atividade
10 física, é necessário um maior número de estudos associando práticas integrativas, ou seja,
11 deve-se verificando a forma em que a atividade física participa na modulação dos
12 diferentes aspectos imunológicos no organismo portador de tumores malignos.

13

1

2 **1.6-Papel das células dendríticas na resposta antitumoral**

3 As células dendríticas foram descobertas pelo patologista alemão Paul
4 Langerhans, em 1968, enquanto realizava um estudo sobre a anatomia da epiderme e
5 constatou a presença de uma rede de células irregulares com longas extensões
6 membranares, semelhantes a dendritos das células do sistema nervoso (células de
7 Langerhans, LCs) (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2007).

8

9 DC's apresentam em sua morfologia prolongamentos citoplasmáticos estrelados
10 com uma capacidade enorme de expressão de moléculas apresentadoras de antígeno como
11 CD1 e CHP de classe I e II e moléculas co-estimuladoras CD40, CD80/B7.1 e
12 CD86/B7.6(BANCHEREAU; PALUCKA, 2005). Essas moléculas possuem uma
13 capacidade de incorporação de material extracelular, e, através da cadeia linfática, as
14 células migram para diversas regiões, como baço e linfonodos e sofrem mudanças
15 fenotípicas através da apresentação cruzada de antígenos para os linfócitos CD8+ e
16 CD4+. Por isso, elas são consideradas as melhores APC's (ARDAVÍN, 2003;
17 BANCHEREAU; PALUCKA, 2005; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; PALUCKA;
18 BANCHEREAU, 2012).

19 Sabendo-se deste princípio, experimentos *in vitro* e em vivo com camundongos
20 C57BL/6 e BALB/C de 6 a 8 semanas tratados com DC's, demonstraram que ocorre
21 participação das DC's na resposta imune antitumoral, já que os animais tratados tiveram
22 uma regressão de metástase pulmonar induzida(FIELDS; SHIMIZU; MULÉ, 1998).

23 As DC's têm sido usadas recentemente como vetores na construção de vacinas
24 que, não somente induzem proteção contra patógenos, mas também aumentam a
25 imunidade em doenças diversas, como câncer(MELIEF, 2008), AIDS(CONNOLLY et
26 al., 2008), autoimunidade e alergia(BELKAID; OLDENHOVE, 2008). O aumento da
27 eficácia dessas imunoterapias está relacionado com a compreensão de alguns mecanismos
28 inerentes relacionados ao equilíbrio entre imunidade e tolerância e as características
29 exigidas pelas DCs para uma resposta efetiva. Com o objetivo de aumentar a eficácia das
30 DCs, estão sendo desenvolvidas estratégias que incluem a sua modificação genética, de
31 modo a aumentar a expressão de reguladores positivos imunogênicos e a inibir
32 reguladores negativos (TURNIS; ROONEY, 2010).

1

2

3

4

5

6

A maior parte dos estudos se encontram em fases avançadas de pesquisa clínica. Porém, por se tratar de uma metodologia complexa e que deve ser melhorada, o desenvolvimento de DC's geneticamente modificadas torna-se uma forma de tratamento muito útil e que, se desenvolvida de maneira adequada, torna-se aplicável em uma grande gama de doenças como as citadas anteriormente.

7

8

9

10

11

12

Na literatura não existem estudos relacionando a prática de atividade física com a imunoterapia com vacina de DC's, porém é de extrema importância a compreensão dos mecanismos e efeitos da atividade física como forma de potencializar o sistema imune num esquema de terapia conjunta com as vacinas de DC's, objetivos do estudo realizado por nós.

1.7- Caracterização do infiltrado celular tumoral

Visto a participação de diferentes células na resposta antitumoral, cada vez mais é demonstrada a importância da análise do infiltrado tumoral que ocorre em inflamações e em alguns casos de tumores com por exemplo tumores de mama (KURODA et al., 2005; MACCHETTI et al., 2006). No campo da imunologia tumoral várias pesquisas demonstram a importância do infiltrado celular nos tumores (HARABUCHI et al., 1990; HARABUCHI; YAMANAKA; KATAURA, 1985; SLOOTWEG; KOOLE; HORDIJK, 1994).

É bastante conhecido na literatura que o processo inflamatório é crucial e crítico para a progressão de tumores e conseqüentemente seu potencial maligno, por estar diretamente ligado com a resposta inflamatória induzida por linfócitos infiltrados no tumor e outras células inflamatórias no sítio de crescimento tumoral. O microambiente tumoral tem uma função fundamental na progressão do crescimento e sobrevivência das células tumorais, atuando por meio de mecanismos diretos e indiretos, que incluem interações entre células tumorais e proteínas e moléculas componentes da matriz extracelular que são dependentes da localização do tumor e do seu crescimento. Já indiretamente, os tumores são resistentes a certos tipos de drogas através da produção autócrina ou parácrina de citocinas, fatores de crescimento e hormônios (GASSMAN; ENNS; HAIER, 2004).

Neste contexto caracterizar e evidenciar a participação direta das células linfocíticas e também de moléculas de adesão e outras presentes no infiltrado tumoral é de grande importância para se entender inúmeros mecanismos, acreditando que alterações no número ou na função destas células poderiam potencialmente influenciar na progressão de um tumor.

1

2-JUSTIFICATIVA

3

4 O desenvolvimento de um modelo experimental baseado em tumores de mama,
5 tendo em vista a imunoterapia com células dendríticas e a utilização da atividade física
6 moderada como nova forma de prevenir e até mesmo combater o tumor, sendo
7 considerado um grande avanço para se compreender novas formas de imunoterapia em
8 modelos experimentais utilizando a linhagem 4T1.

9 Sendo assim o presente trabalho procurou elucidar as mudanças no perfil de
10 resposta imune através da avaliação do infiltrado tumoral de animais tratados com vacinas
11 de células dendríticas, prática de atividade física e terapia combinada (vacina+atividade
12 física).

13

1 **3.OBJETIVOS**

2 **3.1 Objetivos gerais**

3 Avaliar o infiltrado celular tumoral em camundongos induzidos ao tumor de mama com
4 linhagem celular 4T1 submetidos a imunoterapia com células dendríticas ou atividade
5 física e terapia combinada (imunoterapia com células dendríticas + atividade física
6 moderada).

7 **3.2 Objetivos específicos**

8 Avaliar, por meio da técnica de imunofluorescência, o infiltrado tumoral pela
9 análise de marcadores de superfície de:

- 10 • Células T: CD4 PE CY 5.0 e CD8 APC;
- 11 • Moléculas do complexo de histocompatibilidade: IA PE;
- 12 • Moléculas co-estimulatórias e co-inibitórias: CD80 FITC(B7-1), CD86
13 APC(B7-2) e CD152 PE (CTLA-4) e:
- 14 • Moléculas de adesão CD54 PE(ICAM-1) e CD102 FITC(ICAM-2).

15

16

17

4-MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-Animais e grupos experimentais

Para a realização do estudo experimental foram utilizados 75 camundongos da linhagem Balb/c, mantidos no biotério do Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON/UFTM. Os animais foram separados em grupos e após passado o período experimental, os animais foram eutanasiados através da administração via intraperitoneal de uma superdose dos fármacos Ketamina (75 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob o número de registro 327.

Destes 75 camundongos BALB/c, 60 serão divididos em 4 grupos experimentais:

- Grupo I: Tumor [animais com inoculação de 4T1];
- Grupo II: Tumor/DCs (animais com inoculação de 4T1 e tratados com imunoterapia com DCs, segundo protocolo);
- Grupo III: Tumor/AF (animais com 4T1 e submetidos à atividade física segundo protocolo);
- Grupo IV: Tumor/AF/DCs (animais com inoculação de 4T1 e submetidos à atividade física mais imunoterapia com DCs, segundo protocolo).

GRUPOS	Inoculação da linhagem 4T1 (2x10)	Tratamento Realizado	N=Número de Animais
I-Tumor	+	Sem Tratamento	15
II-Tumor+DC's	+	Vacinas de DC's	15
III-Tumor+AF	+	Atividade Física Moderada	15
IV-Tumor+AF+DC's	+	Vacina de DC's+ Atividade Física	15

20

21

4.2-Obtenção de células dendríticas da medula óssea do fêmur e tíbia de camundongos

Os 15 animais restantes que não foram utilizados nos grupos experimentais, foram eutanasiados com superdosagem de anestésicos, cloridrato de ketamina (90mg/kg) e xilazina (15mg/kg). As DCs foram obtidas segundo protocolos preconizados por Lutz et al. (1999), no qual a medula óssea foi extraída dos fêmures e tíbias de camundongos BALB/c com auxílio de uma seringa 13 x 4,5 mm com solução tampão PBS. Posteriormente as células extraídas foram cultivadas com IMDM completo, com concentração de células de 5×10^6 células/ml. Um volume de 2ml dessa suspensão de células foi adicionado em placas de cultura de 6 poços. Após dois dias da realização do plaqueamento das células nos poços, foram acrescentados, em cada poço, 2µl de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4). As culturas foram mantidas, em câmeras de CO₂ a 5% de umidade a 37°C, por mais 5 dias. Posteriormente, no 7º dia, as células receberam 4µl de fator de necrose tumoral (TNF-α), seguido de 4µl de antígeno tumoral. No 9º dia, as células foram lavadas e suspendidas novamente, com solução fisiológica 0,9%.

4.3-Indução dos tumores, protocolo de treinamento e vacinas de células dendríticas

Os animais submetidos à indução do tumor receberão doses de 4T1 na concentração de 2×10^5 células em 50 µL via subcutânea.

Animais dos grupos III e IV que foram submetidos a atividade física, que foi escolhida a natação, realizaram treinamento com duração de quatro semanas e frequência de cinco dias por semana. Após período de adaptação ao meio líquido, primeira semana (15 minutos), na segunda semana eles realizaram 30 minutos (15 dias), nas duas últimas semanas, os animais dos grupos treinados realizaram programa de natação constituído de 45 minutos de natação. Toda a atividade foi realizada em recipiente próprio com um nível de água onde os animais não pudessem encostar a cauda no fundo do recipiente. O isolamento de cada animal foi realizado utilizando pedaços de cano de PVC como “bacias”, com intuito que um animal não influenciasse no treinamento do outro, o que poderia ocasionar stress que consequentemente poderia influenciar na resposta imune. A temperatura da água foi mantida entre 30° a 35 °C e trocada diariamente.

1 Os animais dos grupos II e IV tratados com a vacina de células dendríticas,
2 receberam 3 doses da vacina (contendo células dendríticas) com volume 50 µl durante 3
3 semanas consecutivas, sendo a primeira semana após inoculação das células da linhagem
4 tumoral 4T1. A vacina possuía concentração de $5,0 \times 10^6$ células dendríticas por dose.
5 Compreendendo, assim, um período total de 4 semanas da inoculação e ao final do
6 tratamento com a vacinação.

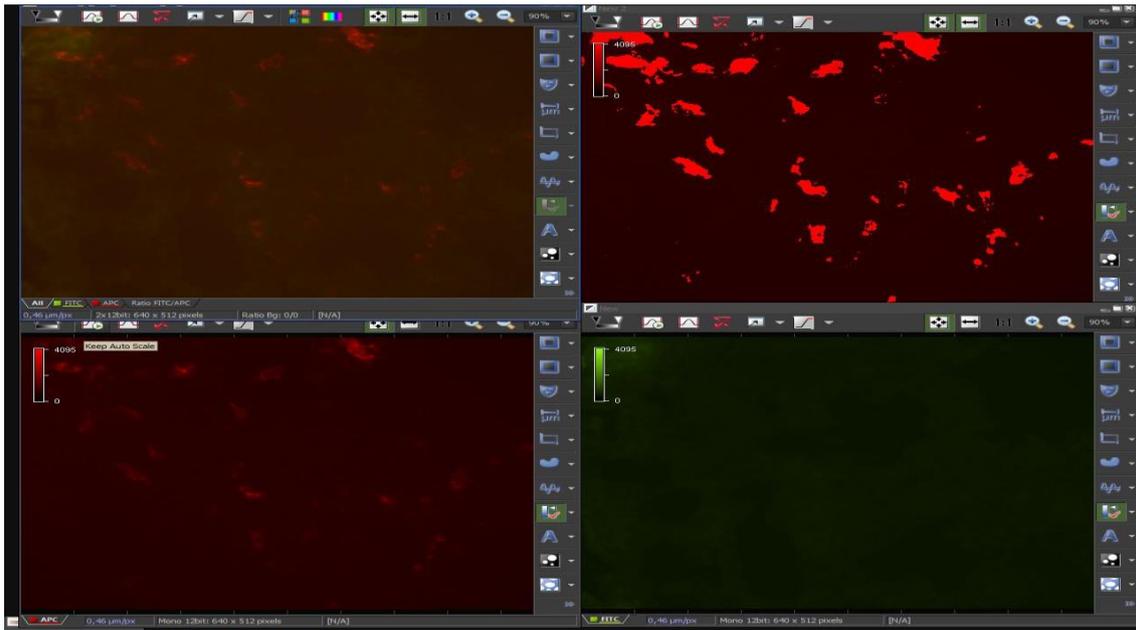
7 **4.4- Verificação do tamanho tumoral e Imunofluorescência**

8 A análise do tamanho tumoral foi realizada através da medição, com a análise em função
9 do tempo utilizando paquímetro universal analógico 150mm nos sentidos craniocaudal e
10 látero-lateral do tumor de mama, a partir do momento que o em que o tumor de mama se
11 tornou palpável e acompanhado a cada 4 dias até o dia anterior a eutanásia. O volume do
12 tumor foi obtido por meio da fórmula $v=a.b^2/2$ onde (v) representa volume em mm³, (a)
13 representa o diâmetro maior(craniocaudal) e (b) o diâmetro menor (latero-lateral).

14 O infiltrado tumoral foi descongelado, os tumores dissecados e recolocados em tissue
15 tek®, e cortados em cortes de 5µm pelo criostato Leica CM1950® e a seguir foram
16 fixados em lâminas. Para a coloração imunofluorescente as laminas foram preparadas
17 para marcação com anticorpos fluorescentes a fim de se encontrarem os antígenos em
18 análise, conforme objetivos do trabalho, o protocolo seguiu a sequência de 5 minutos
19 em temperatura ambiente retirado do freezer, 10 minutos em paraformaldeído (PFA) a
20 4%; 5 lavagens em PBS 1X; 120 minutos de bloqueio soro bovino fetal (BSA) 3%, em
21 câmara úmida aberta, o anticorpo foi colocado pós bloqueio na concentração adequada
22 de cada anticorpo diluído em PBS 1X e assim as laminas foram colocadas em câmara
23 úmida fechada para não queimar a fluorescência, por de duas a três horas de acordo com
24 o anticorpo, logo depois ocorrem mais 5 lavagens de 5 min utilizando PBS 1X para retirar
25 excesso de AC, a montagem das laminas é feita cobrindo-as com lamínulas e meio de
26 glicerol 2% e as armazena em suporte fechado, na geladeira convencional durante 24
27 horas para redução de fluorescência inespecífica a leitura.

28 As lâminas foram lidas no microscópio Nikon Eclipse, e quantificadas as médias de
29 intensidade de fluorescência (MIF) das marcações pelo uso do software do próprio

1 microscópio, o Nikon Analyses.



2
3 *Figura 1-Esquema do software com exemplo da quantificação da imunofluorescência*

4 **4.5 -Análise Estatística**

5 Para a análise estatística, foi elaborado, um banco de dados relacional no qual os dados
6 comuns aos grupos. As diversas informações das variáveis obtidas do banco de dados,
7 serão testadas para verificar a distribuição normal. Quando a distribuição for considerada
8 normal, serão utilizados testes paramétricos; na comparação entre 2 grupos, será utilizado
9 o teste “t de Student” e na comparação entre 3 ou mais grupos, será utilizada a análise de
10 variância. Os resultados serão expressos em média \pm desvio padrão. Os dados obtidos
11 foram analisados submetidos aos testes ANOVA one way e Teste T de Student. As
12 diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$. A análise
13 estatística e os gráficos foram realizados com o GraphPad Prism Versão 5.0 (GraphPad
14 Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

15

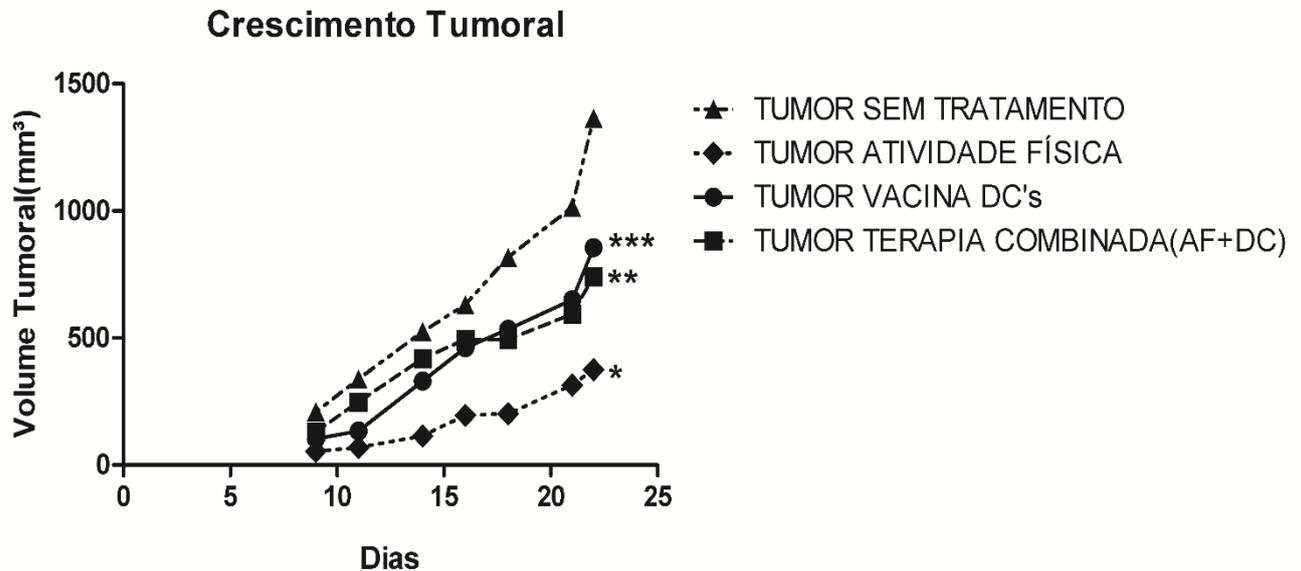
1 5- RESULTADOS

2

3 5.1- Análise do Crescimento tumoral induzido pelas células 4T1

4

5



6

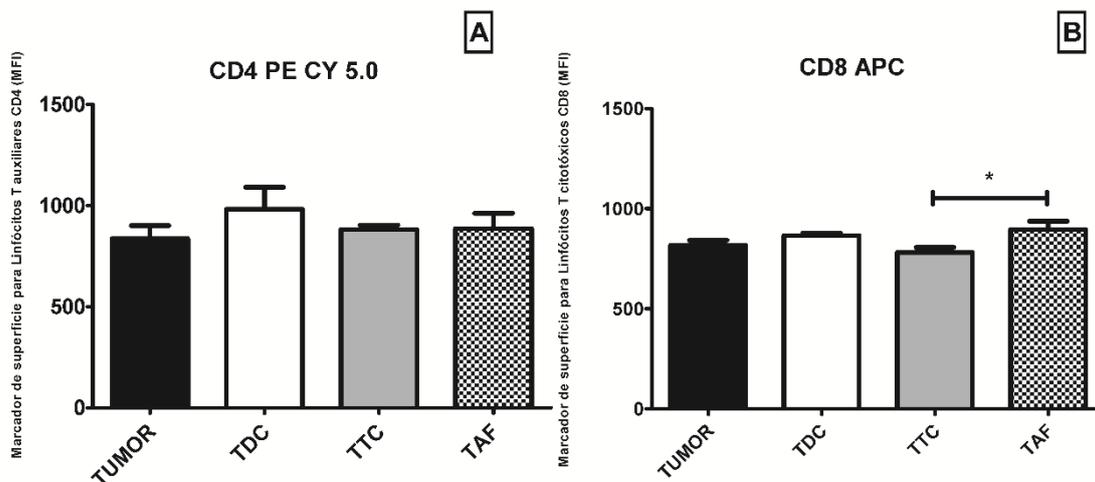
7 *Figura 2- Volume tumoral (mm³) mensurados semanalmente a partir do dia 8 até o dia*
 8 *da eutanásia.*

9 Representação do volume tumoral mensurado por meio da fórmula $V=a.b^2/2$ onde a é o
 10 maior diâmetro e b menor diâmetro. Os valores são expressos em média \pm SEM, foi utilizado o
 11 teste paramétrico Student's T-Test. Onde: \blacktriangle TUMOR SEM TRATAMENTO, \blacklozenge TUMOR
 12 ATIVIDADE FÍSICA \bullet TUMOR VACINA DC's e \blacksquare TUMOR TERAPIA COMBINADA. Sendo p
 13 considerado significativo $<0,05$ (5%), onde * $p<0,0030$, ** $p<0,0023$ e *** $p>0,0182$.

14 Os animais que tiveram tumor induzido e não sofreram nenhum tipo de
 15 intervenção terapêutica (grupo T) apresentaram um volume tumoral maior quando
 16 comparado com os grupos TDC (tumor + vacina de DCs), TAF (tumor + atividade física)
 17 e TTC (tumor + terapia combinada), que mostraram um volume tumoral
 18 significativamente menor (Figura 2). A análise estatística, realizada através do teste T de
 19 Student, demonstrou que os tamanhos dos tumores dos animais dos grupos tratados foram
 20 significativamente menores quando comparados aos animais do grupo que não recebeu
 21 nenhuma terapia, TAF ($p=0,0030$), TDC ($p=0,0023$) e TTC ($p=0,0182$).

22

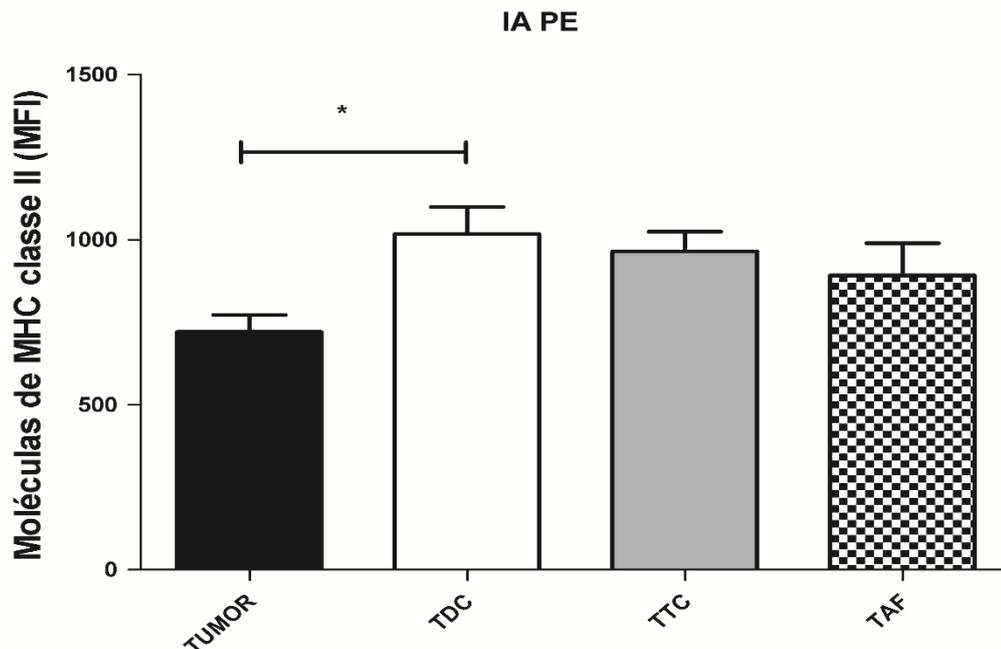
1 5.2 -Análise de moléculas de superfície no tumor através de imunofluorescência



2
3
4
5 *Figura 3-Molécula de superfície para células T: CD4 PE CY 5.0 e CD8 APC, presente*
6 *em tumores analisados por Imunofluorescência.*

7 Avaliação por imunofluorescência da média de intensidade de fluorescência (MFI) de
8 CD4 e CD8 em tumores obtidos de camundongos Balb/c com tumores de mama induzidos por
9 células 4T1 submetidos ou não à imunoterapia com células dendríticas, prática de atividade física
10 ou terapia combinada. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Os resultados
11 foram analisados utilizando 1-way ANOVA paramétrico com pós teste de Bonferroni. As
12 diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%). Onde $*p < 0,0235$.

13
14
15 Quando avaliado o perfil de linfócitos T, observamos na figura 3A que o marcador
16 específico para linfócitos T auxiliares, o CD4, apresentou valores maiores para os grupos
17 que foram submetidos a algum tipo de imunoterapia: TAF (MFI=886,5), TDC
18 (MFI=981,8), TTC (MFI=880,7) quando comparado ao grupo T (MFI=836,3), apesar de
19 não ter diferença estatística. Em relação ao marcador de linfócitos T citotóxicos avaliados
20 pelo marcador CD8 (figura 3B), verificamos um aumento não significativo na expressão
21 desse marcador nos grupos TDC (MFI=865,8) e TAF (MFI=895,2) em relação ao grupo
22 T (MFI=817,1); já o grupo TTC (MFI=781,1) apresentou uma diminuição quando
23 comparado aos outros grupos, apresentando uma diferença significativa quando
24 comparado ao grupo TAF.



1

2 *Figura 4-Molécula de superfície para MHC de classe II, representado pelo marcador de*
 3 *superfície IA PE,, presente em tumores analisados por Imunofluorescência.*

4 Avaliação por imunofluorescência da média de intensidade de fluorescência (MFI) da
 5 molécula de MHC de classe II representado pelo marcador IA PE em tumores obtidos de
 6 camundongos Balb/c com tumores de mama induzidos por células 4T1 submetidos ou não à
 7 imunoterapia com células dendríticas, prática de atividade física ou terapia combinada. Os
 8 resultados foram expressos em média e desvio padrão. Os resultados foram analisados
 9 utilizando 1-way ANOVA paramétrico com pós teste de Bonferroni. As diferenças observadas
 10 foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%). Onde $*p < 0,0255$

11

12 Quando analisada a expressão de MHC II, representada pela expressão do
 13 marcador de superfície IA PE, verificamos um aumento significativo na média de
 14 intensidade de fluorescência do grupo TDC (MFI=1074) em relação ao grupo T
 15 (MFI=720). Quando comparados ao grupo T, os grupos TAF (MFI=892,2) e TTC
 16 (MFI=964,9) também apresentaram aumento na expressão de MHC de classe II, porém
 17 não significativo (Figura 4).

18

19

20

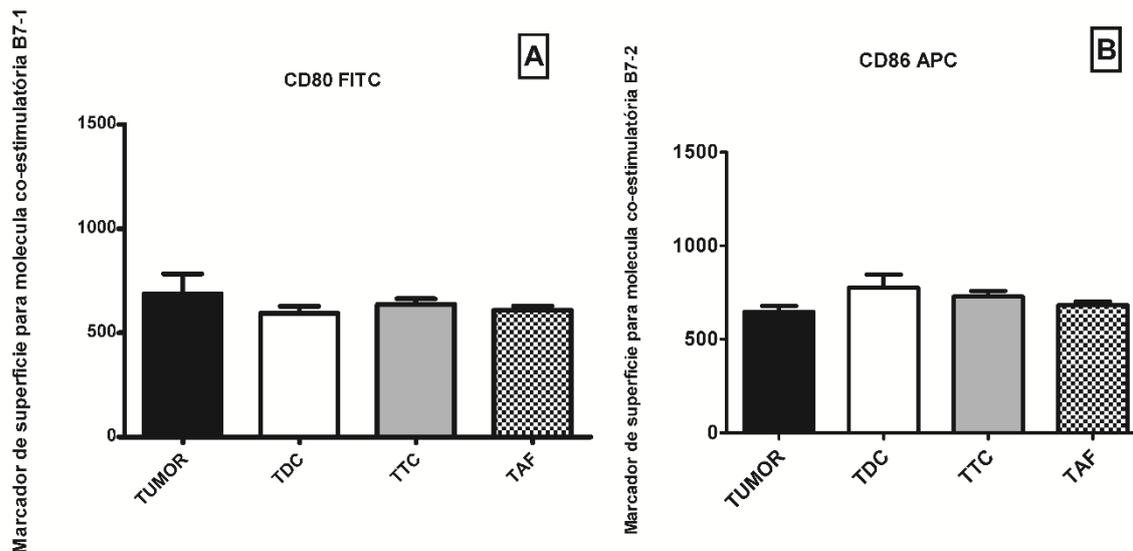
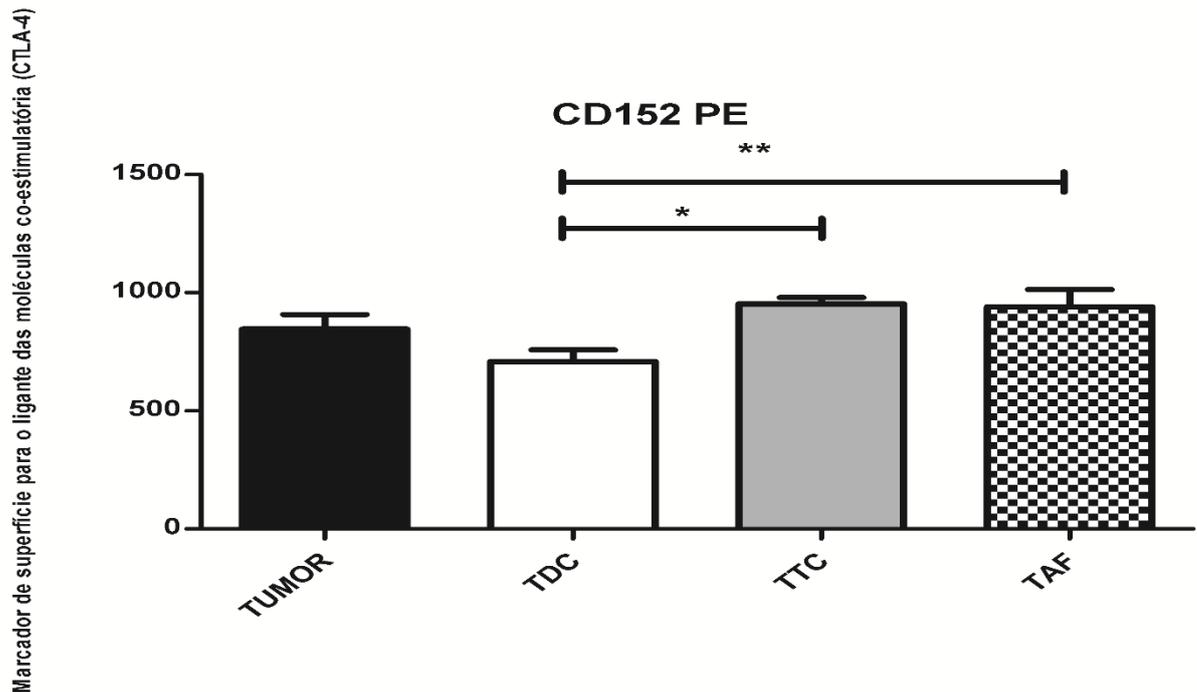


Figura 5-Marcador de superfície para moléculas co-estimulatórias: CD80 FITC (B7-1) e CD86 APC (B7-2), presente em tumores analisados por Imunofluorescência.

Avaliação por imunofluorescência da média de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) em tumores obtidos de camundongos Balb/c com tumores de mama induzidos por células 4T1 submetidos ou não à imunoterapia com células dendríticas, prática de atividade física ou terapia combinada. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando 1-way ANOVA paramétrico com pós teste de Bonferroni. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

Avaliando, no infiltrado tumoral, as moléculas co-estimulatórias que favorecem a ativação de linfócitos, verificamos a molécula co-estimulatória B7-1 (figura 5A), avaliada através da presença do CD80 FITC, apresentou uma diminuição da média de intensidade de fluorescência, nos grupos tratados com alguma forma de imunoterapia: TAF (MFI=609,8), TDC (MFI=594,1) e TTC (MFI=636,9), quando comparados ao grupo T (MFI=688,11). Para a molécula co-estimulatória, B7-2, avaliada através do marcador CD86 APC (figura 5B), observamos um aumento, mesmo que não significativo, em todas as formas de imunoterapia – TAF (MFI=681,6), TDC (MFI=776) e TTC (MFI=727,9) – quando comparadas ao grupo T (MFI=646).



1

2

Figura 6-Marcador de superfície para o ligante de moléculas co-estimulatórias:CD 152 PE (CTLA-4), presente em tumores analisados por Imunofluorescência.

3

4

Avaliação por imunofluorescência da média de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas do ligante CTLA-4, obtidos de camundongos Balb/c com tumores de mama induzidos por células 4T1 submetidos ou não à imunoterapia com células dendríticas, prática de atividade física ou terapia combinada. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando 1-way ANOVA paramétrico com pós teste de Bonferroni. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%). Sendo em * e ** $p < 0,0178$.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

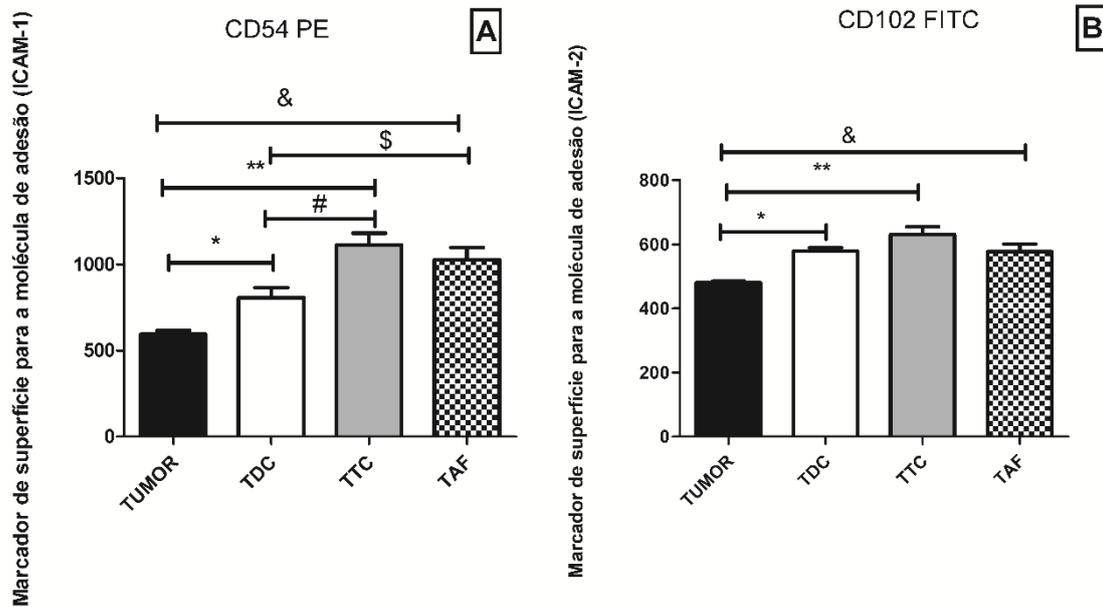
19

17

18

19

1



2

3

4

Figura 7-Marcador de superfície para moléculas de adesão:CD54 PE (ICAM-1) e CD102 FITC (ICAM-2), presente em tumores analisados por Imunofluorescência.

5 Avaliação por imunofluorescência da média de intensidade de fluorescência (MFI) de
 6 CD54 e CD102 em tumores obtidos de camundongos Balb/c com tumores de mama induzidos
 7 por células 4T1 submetidos ou não à imunoterapia com células dendríticas, prática de atividade
 8 física ou terapia combinada. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Os
 9 resultados foram analisados utilizando 1-way ANOVA paramétrico com pós teste de Bonferroni.
 10 As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%). Em CD54
 11 observamos *, **, #, \$ e & com $p < 0,0001$, e em CD102, temos *, ** e & com $p < 0,0001$.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

A avaliação da expressão da molécula de adesão ICAM-1, representada pelo
 marcador CD54 PE (figura 7A), demonstra que houve um aumento significativo das MFIs
 de todos os grupos que tiveram uma intervenção imunoterápica: TAF (MFI=1025), TDC
 (MFI=807.3), TTC (MFI=1111.6), quando comparado ao grupo T (MFI=594,3). Quando
 avaliada a expressão de ICAM-2 marcada por CD 102, observamos que todos os grupos
 que receberam uma das formas de imunoterapia tiveram um aumento significativo em
 relação a expressão observada no grupo tumor sem tratamento, visualizando as médias
 podemos observar esse aumento: TAF(MFI=577.1), TDC(MFI=578.2),
 TTC(MFI=630.6) quando comparado com o grupo tumor(MFI=480).

21

6 -DISCUSSÃO

1 **6 -DISCUSSÃO**
2 A utilização da atividade física e da vacina de células dendríticas como formas de
3 imunoterapia se fundamentam em diversos estudos que demonstram que as CDS possuem
4 capacidade de apresentar antígenos e estimular linfócitos Th1, linfócitos CTL e células
5 NK, já a atividade física em carga moderada gerou um aumento na função leucocitária,
6 além de auxiliar na quimiotaxia, na degranulação e na fagocitose em períodos pós
7 atividade física (KOIDO et al., 2010; NIEMAN, 2000; BACURAU et al., 2000;
8 GLEESON; PYNE, 2000) . A utilização das duas terapias em conjunto não possuiu dados
9 encontrados em literatura, sendo necessários mais estudos que verifiquem se ocorre a
10 potencialização do efeito da vacina através da atividade física ou se pode haver uma
11 inibição através de mediadores produzidos pela atividade física.

12 Diante da redução tumoral apresentada em todos os grupos submetidos à
13 imunoterapia, verificamos uma estimulação da resposta imune antitumoral. Os resultados
14 encontrados corroboram com trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa (Instituto
15 de Pesquisa em Oncologia-IPON), em que camundongos fêmeas com tumor de mama
16 submetidas à prática de atividade física (natação) apresentaram uma melhoria na resposta
17 imune contra o tumor de mama, uma vez que ocorreu a redução dos tumores e um volume
18 tumoral final menor (ABDALLA et al., 2014). Os dados encontrados em nossos estudos
19 vão de acordo com LANE e colaboradores que verificaram uma redução dos tamanhos
20 dos tumores em animais que praticaram atividade física e realizaram uma dieta
21 balanceada (LANE, HW;KEITH, RE;STRAHAN, S;WHITE, 1991), e corroboram com
22 estudos que demonstraram que ratos com tumor de colo submetidos à atividade física
23 moderada na esteira apresentaram redução significativa no número de adenocarcinomas
24 no cólon(THORLING; JACOBSEN; OVERVAD, 1994). A redução do volume tumoral
25 obtida com a vacina de DCs foi citada anteriormente em estudos que demonstraram que
26 a vacina pode induzir um perfil antitumoral TH1 e, conseqüentemente, causar tal redução
27 , freando a progressão tumoral(ALEIXO; MICHELIN; MURTA, 2013).

28 A análise do infiltrado tumoral realizada através de imunofluorescência
29 demonstrou que os animais submetidos a algum tipo de imunoterapia demonstraram um
30 aumento no número de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, mostrando a importância
31 deles na resposta imune antitumoral. Como verificado em estudos de Golszmid e
32 colaboradores, camundongos com tumor B16F10 que foram imunizados com células

1 dendríticas tiveram menor número de metástases e tumores menores; no mesmo estudo
2 observou a importância e a relação de dependência dos linfócitos entre si, já que quando
3 uma das populações era retirada, não ocorria a resposta imune antitumoral, mostrando a
4 importância dos linfócitos TCD4 na ativação dos TCD8(GOLDSZMID et al., 2003).

5 O aumento do número de linfócitos infiltrantes (TILS) no infiltrado tumoral está
6 associado como um marcador de bom prognóstico, independentemente do tipo
7 tumoral(DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010).Esse aumento no número de
8 linfócitos infiltrantes de forma isolada já é considerado como marcador de bom
9 prognóstico, porém necessita do aumento da expressão de MHC II e moléculas co-
10 estimulatórias, que são essenciais para a ativação desses linfócitos, já que é necessário
11 um primeiro sinal que é fornecido pela ligação do antígeno ao receptor, o que, no caso de
12 células T, ocorre através da ligação dos complexos peptídeos_MHC ao TCR e aos co-
13 receptores CD4 e CD8, levando ao segundo sinal, que é gerado por moléculas co-
14 estimulatórias; no caso das células T, as mais bem descritas são CD80 e CD86 e o ligante
15 CTLA-4(JABRANE-FERRAT et al., 2006; MEAZZA et al., 2003). O aumento de MHC
16 II e das moléculas co-estimulatórias se mostra de extrema importância para a ativação
17 destes linfócitos. A modulação positiva, que fez com que aumentasse a expressão de
18 MHC II nos nossos grupos experimentais que sofreram algum tipo de imunoterapia,
19 juntamente com um volume tumoral reduzido, vai de acordo com o que é descrito
20 anteriormente em estudos que demonstraram que, com a transfecção de genes de MHC II
21 em sarcomas de ratos, ocorre um aumento da rejeição primária e uma redução no número
22 de tumores e chance de metástase nesses animais(OSTRAND-ROSENBERG et al.,
23 1996).

24 Outros estudos demonstram que o aumento da expressão de MHC II já foi
25 demonstrado como um sinal de um bom prognóstico, pois quando sua expressão em
26 células tumorais de modelos de tumor de mama está aumentada, pode induzir imunidade
27 antitumoral mediada por Th1 e memória antitumoral(MORTARA et al.,
28 2006)(PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 1998). A menor expressão no grupo
29 tumor sem tratamento é verificada com resultados semelhantes, em estudos com humanos
30 que verificaram o papel do MHC II em tumores, verificando que pacientes com câncer de
31 pulmão e de mama, mostraram a expressão diminuída de MHC II e moléculas co-
32 estimulatórias CD80 e CD86 nas células dendríticas, o que indicou falha na ativação das
33 DCs(KAH-WAI, 2006).

1 O grupo tumor sem tratamento apresentou níveis menores de moléculas co-
2 estimulatórias em relação aos níveis apresentados aos grupos que apresentaram algum
3 tipo de imunoterapia. Esse comportamento foi verificado em estudos anteriores que
4 verificaram que a falta de imunogenicidade presente em vários tipos de tumor está
5 relacionada com uma possível relação da diminuição dessas moléculas(HASEBE et al.,
6 2000)(BELLA et al., 2003). Já os grupos tratados demonstraram uma maior expressão de
7 moléculas co-estimulatórias, porém estudos com a atividade física relacionada com as
8 moléculas co-estimulatórias não são encontrados. Já o potencial das células dendríticas
9 para aumentar os níveis de moléculas estimulatórias vai de acordo com o observado em
10 trabalhos que demonstraram que a intervenção com um tipo de vacinas de DCs
11 possibilitou uma recuperação da expressão dessas moléculas (BARBUTO et al., 2004;
12 NEVES et al., 2005).

13 Em relação ao CTLA4, verificamos uma redução no grupo tratado com DCs, o
14 que é considerado um bom prognóstico, pois a redução da expressão de CTLA-4, que é
15 receptor para as moléculas B7-1 e B7-2, está relacionada com a atividade inibitória sobre
16 o sistema imune(LEACH; KRUMMEL; ALLISON, 1996). Já que o CTLA4 é uma
17 molécula que é constitutivamente expressa em células Treg, e estas células são capazes
18 de induzir, nas células dendríticas, a expressão de metabólitos pró-apoptóticos através de
19 expressão de IDO (indolamina 2,3-dioxigenase), o que leva à supressão de células T
20 efectoras por mecanismos dependentes das interações entre CTLA-4 e CD80 e/ou
21 CD86(VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Ainda em relação ao CTLA-4,
22 trabalhos realizados por Zouain demonstraram que camundongos que foram acometidos
23 por desordens linfoproliferativas mostraram que o CTLA-4 regula de forma negativa a
24 resposta das células T, através de um sinal inibitório , e que uma terapia envolvendo o
25 bloqueio do CTLA-4 aumenta a ativação das células T (ZOUAIN et al., 2004). A
26 expressão de CTLA-4 em diferentes tipos de linhagens celulares derivadas de tumores
27 em glândula mamária, pulmão, cólon, rins, ovários, útero e bexiga de humanos, como
28 carcinoma, osteo/rabdomiossarcoma, neuroblastoma e melanoma, evidenciando grande
29 intensidade na marcação em osteossarcoma e carcinoma de glândulas mamárias, o que
30 demonstra que uma redução dessas moléculas pode estar associada à diferenciação de
31 linfócitos em um perfil não imunossupressor que ocorreria em presença aumentada de
32 CTLA-4(CONTARDI et al., 2005).

1 A participação das moléculas de adesão ICAM-1 é contraditória, pois, alguns
2 estudos mostram que a diminuição da expressão de ICAM-1 em diferentes células
3 tumorais de diversos tipos de tumor faz com que as células tumorais circulantes evitem
4 que se estabeleça uma ligação estável com compostos citolíticos e, dessa forma, possa
5 levar a evasão da possível destruição por linfócitos citotóxicos(JONJI et al., 1992). Em
6 contrapartida, vários estudos demonstram que a inibição de moléculas de adesão como
7 ICAM-1 previnem um comportamento metastático, já que essas moléculas estão
8 relacionadas à adesão das células tumorais às células endoteliais, o que facilita a invasão
9 e a metástase (STUPACK; CHERESH, 2003). Estando sua expressão reduzida
10 relacionada com a metástase e mau prognóstico em carcinomas adenoides(SHIRAI;
11 FURUKAWA; YOSHIZAKI, 2003). Nossos resultados vão de acordo com a literatura
12 que demonstra um bom prognóstico para o aumento da molécula de adesão ICAM-1, já
13 que todos os grupos tratados apresentaram uma maior expressão significativa de ICAM-
14 1, caracterizada pela presença do CD54, quando comparado ao grupo tumor sem
15 tratamento. Esses dados, associados a um aumento do número de linfócitos, explicam
16 uma menor progressão tumoral demonstrada pelos grupos tratados. Em contraste com
17 nossos resultados, trabalho demonstram que a o silenciamento de ICAM-1 pode inibir a
18 capacidade metastática da linhagem celular MCF-7 in vitro e diminuir significativamente
19 a invasão e a metástase demonstrando que ICAM-1 estaria relacionada com a progressão
20 tumoral e não com o combate as células tumorais(DI et al., 2016). Corroborando com
21 esse aumento de ICAM-1, verificamos um aumento significativo concomitante de ICAM-
22 2 em nossos experimentos, o que vai de acordo com os estudos que mostram que a ICAM-
23 2 inibe a motilidade de células de neuroblastoma e tem a capacidade de suprimir o
24 potencial metastático dessas células (YOON; MILLER; KREITZBURG, 2015). Estudos
25 demonstram que está bem estabelecido o papel de ICAM-1 na supressão do
26 desenvolvimento de tumor mamário de rato, evitando a metástase celular através de
27 interação com células T CD8+ em hospedeiros imunocompetentes (FARAJI et al.,
28 2012). A participação conjunta através da co-expressão de ICAM-2, verificado em
29 trabalhos que demonstram que essa expressão, desencadeia uma resposta imune
30 antitumoral e pode suprimir o crescimento tumoral(HIRAOKA et al., 2011).

31

32

33

34

7-CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos a importante participação do infiltrado tumoral na resposta imune antitumoral. Também conseguimos evidenciar a capacidade de modular o sistema imune apresentada pela vacina de células dendríticas e pela atividade física. Em relação ao uso da terapia combinada, os resultados levam à necessidade de novos estudos que consigam avaliar o momento que mediadores responsáveis pela estimulação do sistema imune são liberados após a prática da atividade física a fim de aliar a liberação desses mediadores com a estimulação apresentada pela vacina de células dendríticas para potencializar essa terapia. Essas terapias conseguiram mostrar capacidade de alterar o infiltrado tumoral, mudando o microambiente tumoral para um infiltrado com características que favorecem a resposta antitumoral. Entre as principais mudanças observadas, devemos destacar o aumento no número de linfócitos infiltrantes, o aumento da expressão de MHC II, o aumento das moléculas co-estimulatórias e o aumento da expressão de moléculas de adesão. Essas alterações nas células e moléculas presentes no infiltrado tumoral levaram a uma menor progressão tumoral, o que demonstra um possível aumento na resposta imune antitumoral nos grupos submetidos ao tratamento. Estudos posteriores são necessários para possíveis melhorias na resposta imune antitumoral que se viu sendo modulada pelos diferentes tipos de tratamento.

19

20

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1
2 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e*
3 *molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- 4 ABDALLA, D. R. et al. Innate immune response adaptation in mice subjected to
5 administration of DMBA and physical activity. ***Oncology Letters***, v. 7, n. 3, p. 886–890,
6 2014.
- 7 ABDALLA, D. R.; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. The influence of
8 physical activity on the profile of immune response cells and cytokine synthesis in mice
9 with experimental breast tumors induced by 7,12-dimethylbenzanthracene. ***European***
10 ***Journal of Cancer Prevention***, v. 22, n. 3, p. 251–258, 2013.
- 11 AKBAR, A. N. et al. The peripheral generation of CD4+ CD25+ regulatory T
12 cells. v. 109, n. 3, p. 319–325, 2003.
- 13 ALEIXO, A. A. R.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. Immunotherapy with
14 dendritic cells as a cancer treatment: perspectives and therapeutic potential. ***Recent***
15 ***patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery***, v. 7, n. 3, p. 226–32, set.
16 2013.
- 17 ARAÚJO DA SILVA I, P.; DA, S.; RIUL, S. Câncer de mama: fatores de risco e
18 detecção precoce. ***Revista Brasileira de Enfermagem***, v. 64, n. 6, p. 1016–21, 2011.
- 19 ARDAVÍN, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells.
20 ***Nature Reviews Immunology***, v. 3, n. 7, p. 582–591, 2003.
- 21 ATANACKOVIC, D. et al. Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3
22 protein in lung cancer patients. ***Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)***, v. 172,
23 n. 5, p. 3289–3296, 2004.
- 24 BACURAU, R. F. et al. Effect of a moderate intensity exercise training protocol
25 on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. ***Cell***
26 ***biochemistry and function***, v. 18, n. 4, p. 249–58, dez. 2000.
- 27 BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines
28 against cancer. ***Nature Reviews Immunology***, v. 5, n. 4, p. 296–306, 2005.
- 29 BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of
30 immunity. ***Nature***, v. 392, n. March, p. 245–252, 1998.
- 31 BARBUTO, J. A. M. et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for
32 metastatic cancer. ***Cancer Immunology, Immunotherapy***, v. 53, n. 12, p. 1111–1118,
33 2004.
- 34 BELKAID, Y.; OLDENHOVE, G. Tuning Microenvironments: Induction of
35 Regulatory T Cells by Dendritic Cells. ***Immunity***, v. 29, n. 3, p. 362–371, 2008.
- 36 BELLA, S. DELLA et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells
37 in patients with breast cancer. ***British Journal of Cancer***, v. 89, n. 8, p. 1463–1472,
38 2003.
- 39 CHAIMOWICZ, F.; CAMARGOS, M. C. S. Envelhecimento e saúde no
40 Brasil. **Freitas EV, Py L, Caçado FAX, Doll J, Gorzoni ML. Tratado de Geriatria**
41 **e Gerontologia**, v. 3, p. 74-96, 2011.

- 1 CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor
2 microenvironment. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.
- 3 COFFMAN, T. R. M. OSMANN AND R. L. THI AND TH2 CELLS : Different
4 Patterns of Lymphokine Functional Properties. **Ann. Rev. Immunol**, v. 7, p. 145–173,
5 1989.
- 6 COICO, R.; SUNSHINE, G. *Imunologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,
7 2010.
- 8 CONNOLLY, N. C. et al. Therapeutic immunization with human
9 immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces
10 immunogenicity in HIV-1-infected individuals. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.
11 15, n. 2, p. 284–292, 2008.
- 12 CONTARDI, E. et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can
13 trigger apoptosis upon ligand interaction. **International Journal of Cancer**, v. 117, n. 4,
14 p. 538–550, 2005.
- 15 DAMOISEAUX, J. Regulatory T cells: back to the future. **The Netherlands**
16 **journal of medicine**, v. 64, n. 1, p. 4–9, 2006.
- 17 DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between
18 lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. **Cancer and**
19 **Metastasis Reviews**, v. 29, n. 2, p. 309–316, 2010.
- 20 DEXTER, D. L. et al. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary
21 tumor. **Cancer Research**, v. 38, n. 10, p. 3174–3181, 1978.
- 22 DI, D. et al. Downregulation of human intercellular adhesion molecule-1
23 attenuates the metastatic ability in human breast cancer cell lines. **Oncology Reports**, v.
24 35, n. 3, p. 1541–1548, 2016.
- 25 FARAJI, F. et al. *Cadm1* Is a Metastasis Susceptibility Gene That Suppresses
26 Metastasis by Modifying Tumor Interaction with the Cell-Mediated Immunity. **PLoS**
27 **Genetics**, v. 8, n. 9, 2012.
- 28 FIELDS, R. C.; SHIMIZU, K.; MULÉ, J. J. Murine dendritic cells pulsed with
29 whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo.
30 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.
31 95, n. 16, p. 9482–7, 1998.
- 32 FRIEDENREICH, C. M.; NEILSON, H. K.; LYNCH, B. M. State of the
33 epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. **European Journal**
34 **of Cancer**, v. 46, n. 14, p. 2593–2604, 2010.
- 35 FUDENBERG, H. H. et al. *Imunologia básica e clínica*. **Imunologia básica e**
36 **clínica**, 1980.
- 37 GASSMAN, P.; ENNS, A.; HAIER, J. Role of tumor cell adhesion and migration
38 in organ-specific metastasis formation. **Onkologie**, v. 27, n. 6, p. 577–582, 2004.
- 39 GIUNTOLI, R. L. et al. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered
40 immune environment: Implications for antitumor immunity. **Anticancer Research**, v. 29,
41 n. 8, p. 2875–2884, 2009.

- 1 GLEESON, M.; PYNE, D. B. Special Feature: Exercise effects on mucosal
2 immunity. **Immunology and cell biology**, v. 78, n. 5, p. 536–544, 2000.
- 3 GOLDSZMID, R. S. et al. Dendritic Cells Charged with Apoptotic Tumor Cells
4 Induce Long-Lived Protective CD4+ and CD8+ T Cell Immunity against B16 Melanoma.
5 **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 11, p. 5940–5947, 2003.
- 6 HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 α in
7 inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463–469, 2008.
- 8 HARABUCHI, Y. et al. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients
9 with lethal midline granuloma. **The Lancet**, v. 335, n. 8682, p. 128–130, 1990.
- 10 HARABUCHI, Y.; YAMANAKA, N.; KATAURA, A. Identification of
11 lymphocyte subsets and natural killer cells in head and neck cancers. An
12 immunohistological study using monoclonal antibodies. **Archives of oto-rhino-**
13 **laryngology**, v. 242, n. 1, p. 89–97, 1985.
- 14 HASEBE, H. et al. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-
15 derived dendritic cells in cancer patients. **Biomed.Pharmacother.**, v. 54, n. 0753–3322
16 (Print), p. 291–298, 2000.
- 17 HEPPNER, G. H. et al. Heterogeneity in Drug Sensitivity Among Tumor-Cell
18 Sub-Populations of a Single Mammary-Tumor. **Cancer Research**, v. 38, n. 11, p. 3758–
19 3763, 1978.
- 20 HEPPNER, G.H.; MILLER, F.R.; SHEKHAR, P.M. (2000). Nontransgenic
21 models of breast cancer. **BreastCancer Res.** 2, 331–334.
22
- 23 HERR, Gerli Elenise et al. Avaliação de conhecimentos acerca da doença
24 oncológica e práticas de cuidado com a saúde. **Rev Bras Cancerol**, v. 59, n. 1, p. 33-41,
25 2013.
- 26 HIRAOKA, N. et al. CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-
27 tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic
28 carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 310–321, 2011.
- 29 IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance
30 and tumor counterattack. **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, n. 6, p. 907–920, 2002.
- 31 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA
32 SILVA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA;
33 2016. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>.
- 34 JABRANE-FERRAT, N. et al. Challenge with mammary tumor cells expressing
35 MHC class II and CD80 prevents the development of spontaneously arising tumors in
36 MMTV-neu transgenic mice. **Cancer gene therapy**, v. 13, n. 11, p. 1002–10, 2006.
- 37 JONJI, B. N. et al. From the *Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri,
38 Centro Daniela e Catullo Borgomainerio, 20157 Mihno; and tClinica Medica, Universitd
39 di Perugia, 06100 Perugia,. **Journal of expe**, v. 176, n. October, p. 1165–1174, 1992.
- 40 KAH-WAI, L. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity.
41 **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 2, p. 35, 2006.
- 42 KARINA, K. et al. Proteína p53 e o câncer: controvérsias e esperanças. **Estudos**,

- 1 **Goiânia**, v. 35, n. 1/2, p. 123–141, 2008.
- 2 KOIDO, S. et al. Regulation of tumor immunity by tumor/dendritic cell fusions.
3 **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2010, 2010.
- 4 KURODA, T. et al. Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional
5 cis Regulation of Nanog Gene Expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 6,
6 p. 2475–2485, 2005.
- 7 LANE, HW;KEITH, RE;STRAHAN, S;WHITE, M. The effect of diet, exercise
8 and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on food intake, body composition and carcass
9 energy levels in virgin female BALB/c mice. **J. Nutr.**, v. 121, p. 1876–1882, 1991.
- 10 LEACH, D. R.; KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. Enhancement of Antitumor
11 Immunity by CTLA-4 Blockade. **Science**, v. 271, n. 5256, p. 1734–1736, 22 mar. 1996.
- 12 LEANDRO, C. G. et al. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em
13 resposta ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n.
14 5, p. 343–348, 2007.
- 15 LOEB, L. A.; HARRIS, C. C. NIH Public Access. v. 68, n. 17, p. 6863–6872,
16 2009.
- 17 LUCAS DA NOBREGA, A. C. The Subacute Effects of Exercise: Concept,
18 Characteristics, and Clinical Implications. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 33,
19 n. 2, p. 84–87, 2005.
- 20 MACCHETTI, A. H. et al. Tumor-Infiltrating Cd4 + T Lymphocytes in Early
21 Breast Cancer Reflect Lymph Node Involvement. **Clinics**, v. 61, n. 3, p. 203–208, 2006.
- 22 MEAZZA, R. et al. Tumor rejection by gene transfer of the MHC class II
23 transactivator in murine mammary adenocarcinoma cells. **European Journal of**
24 **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1183–1192, 2003.
- 25 MELIEF, C. J. M. Cancer Immunotherapy by Dendritic Cells. **Immunity**, v. 29,
26 n. 3, p. 372–383, 2008.
- 27 MOLDOVEANU, A I.; SHEPHARD, R. J.; SHEK, P. N. The cytokine response
28 to physical activity and training. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 31, n. 2, p. 115–
29 144, 2001.
- 30 MORECKI, S.; YACOVLEV, L.; SLAVIN, S. Effect of indomethacin on
31 tumorigenicity and immunity induction in a murine model of mammary carcinoma.
32 **International Journal of Cancer**, v. 75, n. 6, p. 894–899, 1998.
- 33 MORTARA, L. et al. CIITA-induced MHC class II expression in mammary
34 adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor
35 rejection, and specific antitumor memory. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 11 I, p.
36 3435–3443, 2006.
- 37 NEVES, A. R. et al. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients
38 vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more
39 CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions.
40 **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 1, p. 61–66, 2005.
- 41 NIEMAN, D. C. et al. Moderate exercise training and natural killer cell cytotoxic
42 activity in breast cancer patients. **International Journal of Sports Medicine**, v. 16, n. 5,

- 1 p. 334–337, 1995.
- 2 NIEMAN, D. C. Is infection risk linked to exercise workload? **Medicine and**
3 **science in sports and exercise**, v. 32, n. 7 Suppl, p. S406-11, jul. 2000.
- 4 OSTRAND-ROSENBERG, S. et al. Expression of {MHC} Class {II} and {B7-
5 1} and {B7-2} costimulatory molecules accompanies tumor rejection and reduces the
6 metastatic potential of tumor cells. **Tissue Antigens**, v. 47, n. 5, p. 414–421, 1996.
- 7 PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells.
8 **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 265–277, 2012.
- 9 PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, v. 76,
10 n. 2, p. 241–251, 1994.
- 11 PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system:
12 regulation, integration, and adaptation. **Physiological reviews**, v. 80, n. 3, p. 1055–1081,
13 2000.
- 14 PEDERSEN, N. L. et al. Neuroticism, extraversion, and related traits in adult
15 twins reared apart and reared together. **Journal of personality and social psychology**,
16 v. 55, n. 6, p. 950–957, 1988.
- 17 PERES, C. M.; OTTON, R.; CURI, R. Modulation of lymphocyte proliferation
18 by macrophages and macrophages loaded with arachidonic acid. **Cell Biochemistry and**
19 **Function**, v. 23, n. 6, p. 373–381, 2005.
- 20 PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of
21 exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1154–1162, 2005.
- 22 PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Reduction of established
23 spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major
24 histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. **Cancer**
25 **research**, v. 58, n. 7, p. 1486–93, 1 abr. 1998.
- 26 PULASKI, B. A.; TERMAN, D. S.; KHAN, S.; MULLER, E.; OSTRAND-
27 ROSENBERG, S. (2000) **Cancer Res.** 60, 2710–2715.
- 28 PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model.
29 **CurrProtocImmunol**, v. 20, n. 2, 2001.
30
- 31 RUSSO, J.; GUSTERSON, B.A.; ROGERS, A.E. et al. Comparative study of
32 human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 1990; 62:244–278.
33
- 34 SCHAROVSKY, O. G. et al. From immune surveillance to tumor-immune
35 escape : the story of an enemy with multiple strategies of resistance and counterattack.
36 **Inmunología**, v. 25, n. 1, p. 101–114, 2006.
- 37 SHANKARAN, V. et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour
38 development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1107–1111,
39 2001.
- 40 SHIRAI, A.; FURUKAWA, M.; YOSHIZAKI, T. Expression of intercellular
41 adhesion molecule (ICAM)-1 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **The**

- 1 **Laryngoscope**, v. 113, n. 11, p. 1955–1960, 2003.
- 2 SLOOTWEG, P. J.; KOOLE, R.; HORDIJK, G. J. The presence of p53 protein in
3 relation to Ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell
4 carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. **European Journal of Cancer. Part B: Oral**
5 **Oncology**, v. 30, n. 2, p. 138–141, 1994.
- 6 SPECK, R. M. et al. An update of controlled physical activity trials in cancer
7 survivors : a systematic review and meta-analysis. p. 87–100, 2010.
- 8 STUPACK, D. G.; CHERESH, D. A. Apoptotic cues from the extracellular
9 matrix: regulators of angiogenesis. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 9022–9029, 2003.
- 10 THORLING, E.; JACOBSEN, N.; OVERVAD, K. The effect of treadmill
11 exercise on Azoxymethane-induced intestinal neoplasia in the male fischer rat on two
12 different High-fat diets. **Nutrition and Cancer**, v. 22, n. 1, p. 31–41, 1994.
- 13 TURNIS, M. E.; ROONEY, C. M. Enhancement of dendritic cells as vaccines for
14 cancer. **Immunotherapy**, v. 2, n. 6, p. 847–862, 2010.
- 15 VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T
16 cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523–532, 2008.
- 17 WANG, H. Y. et al. Tumor-Specific Human CD4+ Regulatory T Cells and Their
18 Ligands: Implications for Immunotherapy. **Immunity**, v. 20, n. 1, p. 107–118, 2004.
- 19 WANG, Z. et al. Role of IFN- γ in induction of Foxp3 and conversion of
20 CD4 + CD25 $^+$ T cells to CD4 + Tregs. **The Journal of Clinical Investigation**, v.
21 116, n. 9, p. 2434–2441, 2006.
- 22 WEI, W. Z.; MORRIS, G. P.; KONG, Y. C. Anti-tumor immunity and
23 autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. **Cancer Immunol Immunother.**, v.
24 53, n. 2, p. 73–8. Epub 2003 Nov 11., 2004.
- 25 WOODS, Jeffrey A.; DAVIS, J. Mark. Exercise, monocyte/macrophage function,
26 and cancer. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 26, n. 2, p. 147-156, 1994.
- 27 YAMAGUCHI, T.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in immune surveillance
28 and treatment of cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. 2, p. 115–123, 2006.
- 29 YOON, K. J.; MILLER, A. L.; KREITZBURG, K. M. The role of ICAM-2 in
30 neuroblastoma. **Oncoscience**, v. 2, n. 11, p. 915, 2015.
- 31 ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells : fates , functions , and faults ASH 50th
32 anniversary review CD4 T cells : fates , functions , and faults. **Immunobiology**, v. 112,
33 n. 5, p. 1557–1569, 2009.
- 34 ZIEKER, D. et al. cDNA microarray analysis reveals novel candidate genes
35 expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise. **Physiological**
36 **Genomics**, v. 23, n. 3, p. 287–294, 2005.
- 37 ZOUAIN, C. S. et al. Schistosoma mansoni PIII antigen modulates in vitro
38 granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans.
39 **Immunology Letters**, v. 91, n. 2–3, p. 113–118, 2004.

ANEXOS-PROTOCOLO CEUA



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Influência da atividade física e imunoterapia com células dendríticas em modelos experimentais de tumor de mama induzidos com 4t1.
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Márcia Antoniazi Michelin
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 02/09/2014
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 327

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

Objetivo Geral:

Investigar a influência da atividade física e/ou imunoterapia com células dendríticas sobre a resposta imunológica decorrente do desenvolvimento do câncer.

Objetivos Específicos:

- Analisar a influência da atividade física e/ou imunoterapia com células dendríticas na resposta do sistema imune contra tumores, através da avaliação de células imunes (CD 3+ CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, CD56+, CD11c+ e CD11b+);
- Analisar as alterações na síntese de citocinas [IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-2R (CD25+)].
- Verificar a influência da prática de atividade física e/ou imunoterapia com células dendríticas no processo de angiogênese pela densidade microvascular (CD31+, CD105+ e Ki67)
- Identificar o padrão de metilação dos genes: Tbox 21, IL-12, NOS2, NOS3, TGF- β , miRNA29a, miRNA29b e miRNA155 dos camundongos da linhagem balb/c com tumores de mama e dos grupos controles.
- Fazer o sequenciamento das regiões metiladas dos genes envolvidos na resposta antitumoral;
- Medir a expressão dos genes envolvidos com a resposta antitumoral dos camundongos da linhagem balb/c com tumores de mama e do grupo controle.

2. JUSTIFICATIVA

Diante de evidências que o uso isolado da atividade física e imunoterapia trazem resultados expressivos de que essas terapias podem estimular uma resposta imune do tipo TH1, ou seja, antitumoral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais serão procedentes do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Minas Gerais – UFMG e mantidos no biotério do Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON. Serão utilizados 105 camundongos adultos da linhagem Balb/c, (sendo que 20 serão destinados a matrizes, 70 para os grupos experimentais e 15 camundongos serão utilizados exclusivamente para extração de medula óssea para a produção da vacina de células dendríticas).

Os grupos experimentais serão divididos da seguinte forma;

Rua Madre Maria José, nº122 – Unidade Administrativa Temporária II - Bairro Abadia CEP: 38025-100
Uberaba - MG - Telefone: (034) 3318 5764 - E-mail: ceua@pesqpp.ufim.edu.br



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Influência da atividade física e imunoterapia com células dendríticas em modelos experimentais de tumor de mama induzidos com 4T1.
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Márcia Antoniazzi Michelin
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 02/09/2014
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 327

- Grupo I Controle (n=10): animais sem inoculação da linhagem tumoral 4T1.
- Grupo II –Treinado(n=10): animais sem tumor submetidos ao protocolo de treinamento conforme descrito no resumo dos procedimentos (vide item 13).
- Grupo III Controle Tratado com Vacina de células dendríticas (n=10) animais sem inoculação da linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados com células dendríticas.
- Grupo IV Tumor (n=10) :animais com inoculação de linhagem tumoral 4T1.
- Grupo V Tumor tratado com Vacina de células dendríticas (n=10): animais com inoculação da linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados com células dendríticas.
- Grupo VI Tumor Treinado(n=10):animais com tumor induzido com a linhagem 4T1 e submetidos ao protocolo de treinamento conforme protocolo descrito.
- Grupo VII Tumor Treinado e Vacinado(n=10): animais com inoculação da linhagem 4T1 e submetidos a atividade física mais vacinas de DC's.

Os animais serão separados entre os que serão utilizados para a retirada de células dendríticas e produção de vacinas e os que farão parte dos grupos experimentais. Os animais dos grupos IV,V,VI e VII serão inoculados com a linhagem tumoral 4T1. Os animais serão inoculados com dose única da linhagem tumoral 4T1 com volume de 50 µl com concentração de $2,0 \times 10^5$ células por animal na região do último par de mamas. A confirmação do desenvolvimento se dará por palpação e inspeção no local das mamas. Posteriormente, os animais do grupo VI serão submetidos ao protocolo de treinamento, que consiste em sessões de natação durante quatro semanas, cinco vezes por semana. Os animais são colocados em baias individuais, cheias de água limpa em temperatura controlada ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Água será trocada todos os dias e não haverá adição de peso aos animais. Todo e qualquer sinal de incapacidade física e/ou risco de afogamento os animais são retirados do ambiente aquático. Posteriormente a todo o período experimental, os animais serão eutanasiados com superdosagem anestésica (Ketamina = 90 mg/kg e Xilazina = 15 mg/kg) e os tecidos alvos removidos e condicionados adequadamente para posteriores estudos. Durante o experimento, os animais serão acondicionados em grupos de 5 animais, em gaiolas de 305x198x133mm com maravalha estéril, em temperatura de $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, iluminação com ciclos de luz (claro/escuro) de 12/12 h, sendo o ar da sala recirculado em tempo integral. A ração e água para os animais serão à vontade.

4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE PARA O USO DE ANIMAIS

Considerando que a experimentação animal será o primeiro passo para utilização e descoberta de novos métodos diagnósticos e terapêuticos. Fazendo a utilização de animais poderemos investigar, nos mais variados setores da resposta imunológica as interações entre o sistema imune e a resposta Tumoral e isoladamente a efetividade das vacinas de células dendríticas sobre os perfis de resposta imune, a efetividade da utilização da atividade física sobre os perfis de resposta imune e qual será a efetividade da terapia

Rua Madre Maria José, nº122 – Unidade Administrativa Temporária II - Bairro Abadia CEP: 38025-100
Uberaba - MG - Telefone: (034) 3318 5764 - E-mail: ceua@pesqps.uftm.edu.br



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Influência da atividade física e imunoterapia com células dendríticas em modelos experimentais de tumor de mama induzidos com 4T1.
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Márcia Antoniazi Michelin
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NA CEUA UFTM: 02/09/2014
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 327

combinada nestes perfis. Tais interações, cuja investigação em seres humanos não se faz possível pelo comportamento invasivo dos procedimentos.

5. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO

Os desconfortos dos animais nas manobras de administração da droga 4T1, bem como durante o tratamento serão amenizados retirando-os do experimento seguido de eutanásia. Pois uma vez apresentado desconforto ou risco não submeteremos o animal aos mesmos procedimentos respeitando o mesmo. A eutanásia dos animais, se caso necessária, está prevista no cálculo amostral. Para evitar e ou minimizar tais sofrimentos durante o procedimento, toda a equipe será devidamente treinada para a realização do procedimento de indução de tumor e vacinação com células dendríticas.

6. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA

As pessoas envolvidas neste projeto serão treinadas para todos os procedimentos que envolva riscos e serão utilizados em todos os procedimentos EPI's (luvas de procedimento, jalecos, máscaras). Para a administração da droga será ainda utilizados jaleco e toca descartável.

7. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Este protocolo obedece aos princípios éticos para experimentação animal.

PARECER DA CEUA: Aprovado em 19/09/2014.

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).


Prof.ª Dr.ª Rosângela Soares Chrigger
Coordenadora da CEUA