



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Efeito imunomodulador de baixas concentrações de antineoplásicos

Juliana Cristina Longo Frederico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU- SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Efeito imunomodulador de baixas concentrações de antineoplásicos

Juliana Cristina Longo Frederico

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Coorientadora: Dra. Graziela Gorete Romagnoli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU- SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Frederico, Juliana Cristina Longo.

Efeito imunomodulador de baixas concentrações de antineoplásicos /
Juliana Cristina Longo Frederico. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu

Orientador: Ramon Kaneno

Coorientador: Graziela Gorete Romagnoli

Capes: 40105008

1. Agentes antineoplásicos. 2. Intestino grosso – Câncer.
3. Quimioterapia. 4. Proteínas de choque térmico.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Células dendríticas; Imunomodulação;
Proteínas de choque térmico; Quimioterapia.

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, e no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)- processo 2009/18331-8, e bolsa de estudos- processo 2011/05258-0.



Dedicatória

*À minha amada vó, Thereza Bonfanti Longo, por sua imensurável luta pela vida, nos
mostrando que os momentos mais importantes são aqueles mais simples.
A senhora será meu eterno anjo-da-guarda!*



Agradecimientos

Agradecimentos

A Deus, por me dar serenidade e renovar minhas energias nos momentos em que precisei.

Ao professor Ramon Kaneno, meu orientador, pelo acolhimento, dedicação, conselhos e por transmitir seus conhecimentos de uma forma tão especial.

À minha coorientadora, Graziela Romagnoli, que, desde o primeiro momento, empenhou-se imensamente para que meu trabalho fosse desenvolvido da melhor maneira possível, uma pessoa com quem pude contar em todas as ocasiões. Obrigada por tudo, Grá! Inclusive pelas várias horas de análises de citometria!

Ao meu noivo, Rodrigo, meu melhor amigo e confidente, obrigada por todo amor, carinho, companheirismo e atenção. Sempre ao meu lado em todas as decisões, não medindo esforços para me fazer feliz. Não consigo imaginar minha vida sem você!

Aos meus pais, Elaine e Júnior, e à minha irmã, Tatiana, por toda a contribuição à minha formação pessoal e intelectual. Vocês sempre foram e serão meus exemplos de determinação, integridade e amor!

Aos meus avós, Lourival e Daisy, meus xodós, sempre muito carinhosos, com pequenos gestos me ensinam a cada dia a ser uma pessoa melhor. Foi maravilhoso ter almoçado praticamente todos os dias, durante esses dois anos, ao lado de vocês!

Às outras pessoas de minha família, em especial à minha prima, Isabela, e à minha tia, Célia, e aos meus sogros, dona Claudete e seu Fernando, e cunhados, que sempre torceram muito por mim.

À minha sobrinha linda, Nicole, pela compreensão em muitos momentos em que tive que estudar em vez de brincar com ela.

Às minhas amigas do laboratório, Victoria Galvão, Carolina Gorgulho, Marcela Camargo, Fabiana Zambuzi, Carolina Araujo e Cecilia Pessoa, pelas horas de trabalho divididas, por todas as ajudas, pelos ótimos momentos de descontração dentro e fora do laboratório e por compartilharem meus momentos de “explosão”, tanto de alegria, quanto de tristeza.

Às minhas amigas, Ingrid Weel e Mariana Romão, pelas inúmeras ajudas, experiências trocadas e pelo ombro amigo em diversos momentos.

Ao Reginaldo Keller, amigo que me socorreu em muitos momentos de dúvida, apreensão, tornando as coisas sempre mais simples, além de ter me auxiliado em alguns momentos dos experimentos.

Às minhas amigas, Bianca Picado e Nathália Kozonoi, pela amizade verdadeira que nasceu na infância e perdura até hoje.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial à Aline Missio, ao Luiz dos Santos, ao Rafael Capra e à Larissa Ragozo, por toda a atenção e o auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Aos integrantes dos laboratórios dos professores Sílvio de Oliveira, Angela Soares, Maria Terezinha Peraçoli, Alexandrina Sartori, João Pessoa e Maurício Sforcin, os quais disponibilizaram o espaço de seus laboratórios para que eu realizasse alguns experimentos, e, em especial, à Daniela Rodrigues, à Tatiana Pinelli e ao Bruno Conti por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À professora Angela Soares, pelo empréstimo dos anticorpos para análise por citometria de fluxo.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia, professora Márcia Guimarães, obrigada por coordenar com excelência e zelo o programa.

À Vânia Soler, secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, sempre muito atenciosa e prestativa.

Ao doutor Michael R. Shurin, da Universidade de Pittsburgh- PA, EUA, por ter gentilmente cedido as células de câncer colorretal humano.

Aos doadores de sangue que, prontamente, aceitaram participar desse estudo.

À Gislene de Oliveira pelo valioso auxílio na obtenção e preparação das amostras de sangue dos doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Botucatu.

À Márjorie Golim e às outras pessoas do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu, por disponibilizarem o citômetro de fluxo e me ajudarem a utilizá-lo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (2009/18331-8) e pela concessão de bolsa de estudos (2011/05258-0).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos (135663/2011-3).

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, façamos:

Da interrupção, um novo caminho...

Da queda, um passo de dança...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

(Fernando Pessoa)

Lista de abreviaturas

5-FU: 5-fluorouracil

CEM: concentração efetiva mínima

CNT: concentração não-tóxica

CRC: câncer colorretal

CTL: linfócitos T citotóxicos

DCs: células dendríticas

DMT: dose máxima tolerável

D.O.: densidade óptica

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HMGB1: *high-mobility-group box 1*

HSPs: proteínas de choque térmico

IL: interleucina

MFI: intensidade mediana de fluorescência

MHC I: complexo principal de histocompatibilidade de classe I

MHC II: complexo principal de histocompatibilidade de classe II

MTT: *thiazolyl blue tetrazolium bromide*

PAC: paclitaxel

PBMC: células mononucleares de sangue periférico

TLRs: receptores *Toll-like*

Sumário

Chapter I- Review.....	11
Abstract.....	13
Introduction	14
Conclusion.....	22
Acknowledgements and Conflict of interest	22
References	23
Capítulo II- Artigo Científico.....	29
Resumo	31
Introdução.....	33
Delineamento Experimental	37
Materiais e Métodos	38
Resultados.....	42
Discussão.....	46
Agradecimentos e Conflito de Interesse.....	52
Referências Bibliográficas.....	53
Anexos.....	

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

Redigido de acordo com as normas da revista “Critical Reviews in Oncology/ Hematology”.

**Immunomodulatory role of heat shock proteins
induced by antineoplastic agents**

Juliana C L Frederico^{1,2}, Ramon Kaneno^{1*}

¹Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Botucatu, UNESP-
Univ Estadual Paulista; ²Department of Pathology, School of Medicine of Botucatu, UNESP-
Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

***Corresponding author:** Dept. Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences of
Botucatu, UNESP Univ Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr s/n
cx postal 510. 18618-970- Botucatu, SP, Brazil.

Phone: +55 14 38800432; Fax: 55 14 38153744; e-mail: rskaneno@yahoo.com.br

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the main causes of death worldwide and its conventional treatment is based on surgery, cytotoxic chemotherapy and radiotherapy, or a combination of these therapeutic modalities. The main chemotherapeutic agents for fighting CRC are metrotexate, 5-aza-2-deoxycytidine, taxans and 5-fluorouracil. Usually, their administration is based on maximum tolerable doses, but it has been shown that low concentrations of most of these drugs upregulate the immune system, both enhancing the immune responsiveness and increasing the immunogenicity of tumor cells. These features are associated with translational changes of a couple of genes, among them, there is an increased expression of heat-shock proteins (HSPs). Although the expression of HSPs may represent an adaptive response of tumor cells to the drug-induced damages, there is evidence that some of these proteins are fundamental for antigen processing and presentation by antigen-presenting cells. Then, in the present review we aimed to show that increased expression of HSPs by drug-treated tumor cells may be favorable for the development of an effective immune response, and that this phenomenon should enhance the combinatory schedules of chemotherapy and immunotherapy.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third main cause of death worldwide [1] and about 142,820 new cases and 50,830 deaths are expected in 2013 in the United States [2]. In Brazil, as well as in other western developing countries, this disease reaches the third position among the most frequent cancer with 30,000 cases in 2012, following prostate and lung cancer in men, and breast and cervix in women [3].

CRC can be classified as familial or sporadic disease. About 15-25% of the patients develop the inherited familial form whereas the majority presents with the sporadic form (75-85%) [4]. Therefore, besides the genetic predisposition for CRC many other risk factors contribute for the development of this disease. Indeed familial history of CRC is strongly influenced by the occurrence of bowel inflammatory diseases, smoking, low physical activity, high body mass index, high red meat intake, low intake of vegetable and fruits [5] and high alcohol intake [6].

The conventional treatment for CRC is based on three modalities of therapy: surgery, cytotoxic chemotherapy and radiotherapy [7]. The surgical resection of the primary tumor is effective for several types of cancer, however immune suppression induced by pre and post-surgery stress is a commonly observed clinical complication [8-10]. Chemotherapy and/or radiotherapy are usually complementary to surgery aiming to eliminate residual tumor cells. However, they frequently promote deep myelosuppression that can affect the normal functions of the immune system, impairing both the innate and adaptive immunity [11].

The main chemotherapeutic agents for CRC are metotrexate and 5-aza-2-deoxycytidine (anti-metabolites), paclitaxel (PAC) and docetaxel (anti-microtubules taxans), 5-fluorouracil (fluoropyrimidine), doxorubicin (topoisomerase inhibitor), and cisplatin (platinum agent) [12-14]. PAC is one of the main antitumor drugs developed in the last two decades and its

efficacy has been confirmed for the treatment of breast, ovarian and gastric cancer [15]. Its antitumor effects are attributed to the suppression of microtubules dynamics and consequent impairment of the cell division process [16].

For metastatic diseases and non-operable tumors, the maintenance of cytotoxic chemotherapy is the main therapeutic option [17]. Usually, the therapeutic schedule consists in the administration of the maximum tolerable dose (MTD) of a cytotoxic agent, aiming the elimination of the highest number of tumor cells [18]. Although this strategy is largely used, the variety and intensity of collateral effects due to the drug toxicity, as well as the rising of drug resistant tumor cell variants, must be considered for this kind of treatment. Among the most commonly observed side effects we can cite gastrointestinal disorders, liver disorders, reduction of leukocytes number, thrombocytopenia, increased risk of infection and bleeding, arthralgia, damage to cardiovascular and nervous system and hair loss [19-22]. The deep myelosuppression and the extreme collateral effects in some patients require the drug administration being followed by three to four-week intervals, allowing the normalization of neutrophils, lymphocytes, macrophages and dendritic cells (DCs). However, during this recovering period drug-resistant tumor cells take advantage of the host immune suppression and low levels of cytotoxic agents to adapt and grow, enhancing the chances of cancer relapse [23].

2. Immunomodulation with low concentrations of chemotherapeutic agents

Some patients do not resist the collateral effects associated with the administration of MTD of antitumor drugs. These people can be submitted to an alternative schedule called metronomic chemotherapy, based on the administration of a much lower concentration of antineoplastic agents (10-33% of MTD), in a more frequent schedule in order to keep the

serum levels of the drug and reduce the collateral effects. Moreover, such low doses are able to inhibit angiogenesis at the tumor site, as well as preserve the activity of immunocompetent cells [7, 24, 25].

How metronomic chemotherapy works is not completely understood, but one of the main targets are the endothelial cells, which take part in the tumor neoangiogenesis. These cells are more sensitive to the cytotoxic activity of antineoplastic drugs than tumor cells themselves. Therefore, low dose can be enough to impair angiogenesis, and inhibit the tumor growth [7].

Shurin et al. [26] have observed that contrasting with MTD, low nontoxic levels of chemotherapeutics such as PAC, doxorubicin, mitomicin C and methotrexate up regulate the antigen presenting function of murine DCs *in vitro*. The authors observed that drug-treated DCs showed increased ability to present ovalbumin epitopes for anti-OVA T hybridoma, and that such a phenomenon is associated with the upregulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I antigen processing machinery (proteasomes LMP7 and 10, calmodulin 2, MB1, tapasin, TAP and calnexin). In addition, this upregulatory effect was shown to be dependent on the increased production of interleukin-12 (IL-12) [26]. This group has also observed that human monocyte-derived DCs are up regulated by the exposure to nontoxic concentrations of selected antitumor agents such as PAC, azacytidine, vinblastin and doxorubicin, enhancing their maturation and antigen-presenting function [13].

Other authors have demonstrated that administration of low dose cyclophosphamide in tumor-bearing mice enhances DCs activity. In such a condition this agent seems to promote the preferential elimination or suppression of regulatory T cells, which facilitates the development of an efficient immune response [27]. Then, as recently reviewed by Nars & Kaneno [28], low density therapy enhances the maintenance or even the upregulation of the

immune response. It points for the feasibility of the combinatory approaches using antineoplastic agents and immunotherapy with DCs.

DCs are the main professional antigen presenting cells [29], that evolve from bone marrow myeloid precursor [30], and can be found in most tissues [31]. Immature DCs show high ability of antigen intake and processing and, are efficiently driven by chemotactic signals to lymphoid organs. In such sites, mature DCs efficiently present antigens for T lymphocytes. In fact, DCs have the singular ability to present antigens for naïve T cells, being fundamental for triggering the immune response [32]. Reduced antigen processing capacity, increased expression of MHC, increased expression of costimulatory and adhesion molecules, expression of cytokine receptors, and reorganization of the cytoskeleton are the main features of DCs maturation [33]. This maturation step is crucial for an efficient induction of T cell response; otherwise the immune response can be negatively modulated. In fact, DCs can be found in the tumor site, but there is only a low frequency of mature cells, mainly in metastatic tumors [34], with prevalence of immature or tolerogenic DCs [35].

DCs constitutively have both class I and class II MHC molecules. Tumor antigens endocytosized by these cells are regularly processed by the endocytic route for presentation of peptides in association with MHC II molecules. However, DCs have the unique ability of associating exogenous antigens peptides to MHC I molecules through cross priming or cross-presentation [36-38].

The central role of DCs on antigen presentation and induction of antitumor immunity supported the proposals of DCs-based therapeutic antitumor vaccines, aiming to stimulate the proliferation of a large number of specific CD8⁺ effector cells, as well as break the immunosuppressive status at the tumor microenvironment [39, 40]. Although this kind of

therapy shows promising results, clinical results indicate the necessity of optimized approaches in order to increase its success [41].

Concerning to this, the antigen choice and antigen loading method are two fundamental variables to be considered for the *in vitro* generation of therapeutic DCs vaccines. Then, the approaches include the use of tumor cell lysates [42, 43], tumor antigen peptides [44, 45], heat-shock proteins (HSPs) [46], nucleic acids [47-49], and the generation of DC:tumor hybridomas [50, 51].

DCs migration and maturation can be influenced by the activation of *Toll-like* receptors (TLRs) [52, 53]. These receptors are among the main pattern recognition receptors (PRR) and are able to recognize common microorganism components, and activate and induce cytokine production by DCs, thus establishing a bridge between the innate and adaptive immune responses [54, 55]. For tumors, DCs TLRs are able to link to “danger signals” (alarmins), such as HSPs [56], the *high mobility-group box 1* (HMGB1) [57] and calreticulin [58].

Usually the administration of high concentrations of chemotherapeutic agents induce tumor cell apoptosis or necrosis and the resulting dead cells are considered non-immunogenic or weakly immunogenic [58], hindering the development of a specific antitumor immune response. An inefficient antitumor responsiveness facilitates the survival of drug-resistant populations of tumor cells, which may be one of the explanations for the absence of spontaneous specific immune response in patients submitted to conventional MTD therapeutic schedule. Although almost all patients included in immunotherapeutic protocols have been submitted to chemotherapy, just recently the association of these two modalities of treatment has been systematically studied, showing that the previous or concomitant administration of low dose chemotherapy does not interfere with the efficiency of immunotherapy [59-62].

Oxaliplatin [63] and antraciclin [64] are able to induce immunogenic death of tumor cells, which is featured by the pre-apoptotic expression of calreticulin [58] and pos-apoptotic expression of HMGB1 [58]. Calreticulin is one of the components of the antigen processing machinery that is usually found at the endoplasmic reticulum vesicles. However, treatment with such drugs induces its transportation to the cytoplasmic membrane and expression on cell surface [58], working as an important danger signal to be recognized by DCs and for activation of the immune system. On its turn, HMGB1 is a nuclear component associated with non histone chromatin [57], which can interact with several receptors on DCs surface, including TLR4 [63].

3. Effects of chemotherapeutic agents on the expression of heat-shock proteins (HSPs)

DNA microarray analysis of HCT-116 colon cancer cells showed that the treatment with nontoxic concentration of PAC induces transcriptional changes of a wide variety of genes [45]. Among them, three groups of genes stand out due to their importance for triggering specific immune responses: a) components of antigen processing machinery by the cytosolic route (calnexin, proteasomes, TAP, calmodulin); b) HSPs, and c) tumor-associated proteins (colon cancer, breast cancer, prostate cancer and Wilm's tumor antigens).

A relevant change was the increased transcription of HSP40 and HSP70 mRNA. HSPs can be divided into seven families according to their molecular weight: HSP10, small HSPs (15-30 kDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 and HSP100 [65]. These proteins can be found in almost all cell compartments, including cytosol, mitochondria, nuclei, nucleoli, endoplasmic reticulum, and internal and external plasmatic membranes as well [66].

These proteins are induced by thermal stress and other kinds of cell aggression, being involved in the protein repair through unfolding and aggregation processes [67]. Then, HSPs

expression can represent a mechanism for cell adaptation and resistance to drug-induced aggression. Such an expression is commonly referred as a mechanism for resistance of all cells against changes in the microenvironment, such as temperature rising, nutritional deficiencies, oxidative stress, and cell exposure to ionizing radiation [65].

HSPs share two functional domains, the first is an adenine binding domain that binds and hydrolyzes ATP and the other is a peptide binding domain that binds to protein hydrophobic residues. ATP binding promotes a critical conformational change that results in the release of the substrate-linked protein. Folding of *de novo* synthesized protein involves their interaction with one or more chaperones, and this association is enhanced by hydrophobic interactions with wide specificity HSPs [68].

HSP90 is a chaperone required for the stabilization of pos-translational and transducing signals for a number of proteins synthesized for cell growth and survival [69]. In fact, an antiapoptotic role of HSP90 was suggested by Elstrand et al. [70], who have shown the cytoplasmic expression of this protein in 97% of ovarian cancer samples. Immunohistochemical analysis showed higher frequency of positivity in those patients previously submitted to conventional chemotherapy with platinum salts and PAC [71]. Other authors reported that inhibition of HSP90 upregulates the expression of mutated epidermal growth factor receptors (EGFR) [72], and Akt kinase [73], making the cells more susceptible to the toxic activity of taxols.

On the other hand, HSPs expression can be associated with the stimulation of the immune system and such an ability was shown for HSP70 [74], HSP90 [75], HSP170 and HSP110 [76]. In a murine model, it was observed that HSPs are able to generate prophylactic antitumor immune response [77], since they perform an important role in macrophages and

lymphocytes activation, and DCs maturation [78], providing a link between the innate and adaptive immunity [79].

The immune response is not directed to HSPs *per se*, but rather to the bound peptides [80, 81], and there is a variety of receptors for HSPs [82]. For instance, interaction of TLR4 with target cell HSPs promotes its endocytosis and processing through the endocytic route and consequent peptide presentation through MHC II molecules [79]. Cytosol HSPs, such as HSP70 and HSP90, and endoplasmic reticulum gp96, bind to endogenous antigen peptides and are transported to cell surface MHC I for presentation to CD8⁺ T cells [83-85]. In addition, HSP90 inhibitor geldanamycin impairs the antigen presentation function of APCs through the interference on MHC II. This aspect deserves to be discussed, since HSPs help the expression of MHC I-associated peptides [86], driving the cross presentation of peptides which are processed through the endocytic route [87]. On the other hand, the presentation of endogenous peptides via MHC II has also been shown by some authors [88-90]. Therefore, there is evidence that HSPs-complexed peptides enhance both the exogenous and endogenous peptide presentation via MHC II [91, 92]. In fact, Rajagopal et al. [93] have observed that the association of exogenous antigens to MHC II molecules is highly dependent on HSP 90, while Houlihan et al. [94] have observed that this phenomenon can happen both with exogenous and endogenous peptides. These authors have also observed that induction of thermal stress interferes with peptide presentation but does not affect the MHC II density on the cell membrane.

Another important role of HSPs is their ability to induce cytokine secretion, thus driving the features of the immune response. They stimulate the secretion of TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), by macrophages and DCs [82, 95], IFN- γ by T cells [96, 97] and chemokines by macrophages [98, 99]. HSPs also

stimulate cell proliferation, cell migration, and cytolytic function of natural killer (NK) cells [100, 101].

4. Conclusion

In summary, we believe that chemotherapeutic schedules should be rationalized in order to take advantage of the immunomodulatory properties of antineoplastic agents. Therefore, combination of chemotherapy with different immunotherapeutic approaches could represent a favorable strategy for fighting cancer, mainly those based on DC vaccines.

Acknowledgements

We thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the grants 2009/18331-8 (regular research grant) and 2011/05258-0 (scholarship), and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the grant 135663/2011-3 (scholarship).

Conflict of interest statement

Authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 63(1):11-30.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva MdS. Estimativa 2012, Incidência de câncer no Brasil. 2012. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>.
4. MacFarlane AJ, Stover PJ. Convergence of genetic, nutritional and inflammatory factors in gastrointestinal cancers. *Nutr Rev*. 2007;65(12 Pt 2):S157-66.
5. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 2013. doi:10.1007/s10552-013-0201-5.
6. Jafri SH, Mills G. Lifestyle modification in colorectal cancer patients: an integrative oncology approach. *Future Oncol*. 2013;9(2):207-18. doi:10.2217/fon.12.184.
7. Shurin GV, Amina N, Shurin MR. Cancer Therapy and Dendritic Cell Immunomodulation. In: Shurin MRS, R.D., editor. *Dendritic Cells in Cancer*. New York: Springer; 2009. p. 201-16.
8. Utoh J, Yamamoto T, Utsunomiya T, Kambara T, Goto H, Miyauchi Y. Effect of surgery on neutrophil functions, superoxide and leukotriene production. *The British journal of surgery*. 1988;75(7):682-5.
9. Duignan JP, Collins PB, Johnson AH, Bouchier-Hayes D. The association of impaired neutrophil chemotaxis with postoperative surgical sepsis. *The British journal of surgery*. 1986;73(3):238-40.
10. Ogata M, Okamoto K, Kohriyama K, Kawasaki T, Itoh H, Shigematsu A. Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery. *Critical care medicine*. 2000;28(9):3166-70.
11. Shurin MR, Naiditch H, Gutkin DW, Umansky V, Shurin GV. ChemImmunoModulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(12):1792-803.
12. Valentini AM, Armentano R, Pirrelli M, Caruso ML. Chemotherapeutic agents for colorectal cancer with a defective mismatch repair system: the state of the art. *Cancer Treat Rev*. 2006;32(8):607-18. doi:10.1016/j.ctrv.2006.08.001.
13. Kaneno R, Shurin GV, Tourkova IL, Shurin MR. Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Transl Med*. 2009;7:58.
14. Half E, Arber N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(2):211-9.
15. Kang GH, Kim GS, Lee HR, Yuh YJ, Kim SR. A phase II trial of paclitaxel, 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin in patients with metastatic or recurrent gastric cancer. *Cancer Res Treat*. 2008;40(3):106-10. doi:10.4143/crt.2008.40.3.106.
16. Sevko A, Michels T, Vrohligs M, Umansky L, Beckhove P, Kato M et al. Antitumor effect of Paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *J Immunol*. 2013;190(5):2464-71. doi:10.4049/jimmunol.1202781.
17. Prenen H, Vecchione L, Van Cutsem E. Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Target Oncol*. 2013. doi:10.1007/s11523-013-0281-x.
18. Skipper HE, Schabel FM, Jr., Wilcox WS. Experimental Evaluation of Potential Anticancer Agents. Xiii. on the Criteria and Kinetics Associated with "Curability" of Experimental Leukemia. *Cancer chemotherapy reports*. 1964;35:1-111.
19. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med*. 1999;340(24):1888-99.

20. Andre T, de Gramont A, Study Group of Clinical Research in Radiotherapies Oncology OMRG. An overview of adjuvant systemic chemotherapy for colon cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2004;4 Suppl 1:S22-8.
21. McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(1):10-6.
22. Vento S, Cainelli F, Temesgen Z. Lung infections after cancer chemotherapy. *The lancet oncology*. 2008;9(10):982-92.
23. Hahnfeldt P, Folkman J, Hlatky L. Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis. *Journal of theoretical biology*. 2003;220(4):545-54.
24. Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*. 2000;105(8):R15-24.
25. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer research*. 2000;60(7):1878-86.
26. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol*. 2009;183(1):137-44.
27. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*. 2005;105(7):2862-8.
28. Nars MS, Kaneno R. Immunomodulatory effects of low dose chemotherapy and perspectives of its combination with immunotherapy. *International journal of cancer*. 2013;132(11):2471-8.
29. Shurin MR. Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother*. 1996;43(3):158-64.
30. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology*. 1991;9:271-96.
31. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
32. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*. 2002;82(1):97-130. doi:10.1152/physrev.00023.2001.
33. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:975-1028. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538.
34. Schwaab T, Weiss JE, Schned AR, Barth Jr RJ. Dendritic Cell Infiltration in Colon Cancer. *J Immunother* (1991). 2001;24(2):130-7.
35. Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer*. 2013;4(1):36-44.
36. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:1-22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
37. Tittarelli A, Gonzalez FE, Pereda C, Mora G, Munoz L, Saffie C et al. Toll-like receptor 4 gene polymorphism influences dendritic cell in vitro function and clinical outcomes in vaccinated melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(11):2067-77. doi:10.1007/s00262-012-1268-7.
38. Arina A, Tirapu I, Alfaro C, Rodriguez-Calvillo M, Mazzolini G, Inoges S et al. Clinical implications of antigen transfer mechanisms from malignant to dendritic cells. exploiting cross-priming. *Experimental hematology*. 2002;30(12):1355-64.
39. Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother*. 2008;31(9):793-805. doi:10.1097/CJI.0b013e31818403bc.

40. Grabbe S, Beissert S, Schwarz T, Granstein RD. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today*. 1995;16(3):117-21.
41. Berzofsky JA, Ahlers JD, Janik J, Morris J, Oh S, Terabe M et al. Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. *J Clin Invest*. 2004;114(4):450-62. doi:10.1172/JCI22674.
42. Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *International journal of cancer*. 1997;70(6):706-15.
43. Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(16):9482-7.
44. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT et al. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med*. 1996;183(1):87-97.
45. Kaneno R, Shurin GV, Kaneno FM, Naiditch H, Luo J, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34(2):97-106.
46. Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science (New York, NY)*. 1997;278(5335):117-20.
47. Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer research*. 2000;60(4):1028-34.
48. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(2):465-72.
49. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyerly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *International journal of cancer*. 1999;82(1):121-4.
50. das Neves FJ, Mattos IE, Koifman RJ. [Colon and rectal cancer mortality in Brazilian capitals, 1980-1997]. *Arq Gastroenterol*. 2005;42(1):63-70.
51. Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(12):1111-8.
52. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:11-8. doi:10.1007/0-387-24180-9_2.
53. Nembrini C, Abel B, Kopf M, Marsland BJ. Strong TCR signaling, TLR ligands, and cytokine redundancies ensure robust development of type 1 effector T cells. *J Immunol*. 2006;176(12):7180-8.
54. Zheng R, Cohen PA, Paustian CA, Johnson TD, Lee WT, Shu S et al. Paired Toll-like receptor agonists enhance vaccine therapy through induction of interleukin-12. *Cancer research*. 2008;68(11):4045-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6669.
55. Koido S, Hara E, Homma S, Mitsunaga M, Takahara A, Nagasaki E et al. Synergistic induction of antigen-specific CTL by fusions of TLR-stimulated dendritic cells and heat-stressed tumor cells. *J Immunol*. 2007;179(7):4874-83.
56. Theriault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, Calderwood SK. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett*. 2005;579(9):1951-60. doi:10.1016/j.febslet.2005.02.046.
57. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13(9):1050-9.
58. Zitvogel L, Kroemer G. Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. *J Clin Invest*. 2009;119(8):2127-30.

59. Liu JY, Wu Y, Zhang XS, Yang JL, Li HL, Mao YQ et al. Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(10):1597-604.
60. Taieb J, Chaput N, Scharz N, Roux S, Novault S, Menard C et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J Immunol.* 2006;176(5):2722-9.
61. Moschella F, Proietti E, Capone I, Belardelli F. Combination strategies for enhancing the efficacy of immunotherapy in cancer patients. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010;1194:169-78.
62. Garcia AA, Hirte H, Fleming G, Yang D, Tsao-Wei DD, Roman L et al. Phase II clinical trial of bevacizumab and low-dose metronomic oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer: a trial of the California, Chicago, and Princess Margaret Hospital phase II consortia. *J Clin Oncol.* 2008;26(1):76-82.
63. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene.* 2010;29(4):482-91. doi:10.1038/onc.2009.356.
64. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Andre F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest.* 2008;118(6):1991-2001.
65. Ghayour-Mobarhan M, Rahsepar AA, Tavallaie S, Rahsepar S, Ferns GA. The potential role of heat shock proteins in cardiovascular disease: evidence from in vitro and in vivo studies. *Adv Clin Chem.* 2009;48:27-72.
66. Sarto C, P.A. Binz, and P. Mocarelli, Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis*, 2000. 21(6): p. 1218-26.
67. Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature.* 1994;372(6505):475-8.
68. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science (New York, NY.* 2002;295(5561):1852-8.
69. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature reviews.* 2005;5(10):761-72.
70. Elstrand MB, Stavnes HT, Trope CG, Davidson B. Heat shock protein 90 is a putative therapeutic target in patients with recurrent advanced-stage ovarian carcinoma with serous effusions. *Human pathology.* 2012;43(4):529-35.
71. Sain N, Krishnan B, Ormerod MG, De Rienzo A, Liu WM, Kaye SB et al. Potentiation of paclitaxel activity by the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated AKT. *Molecular cancer therapeutics.* 2006;5(5):1197-208.
72. Sawai A, Chandarlapaty S, Greulich H, Gonen M, Ye Q, Arteaga CL et al. Inhibition of Hsp90 down-regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel. *Cancer research.* 2008;68(2):589-96.
73. Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer research.* 2003;63(9):2139-44.
74. Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *The Journal of experimental medicine.* 1993;178(4):1391-6.
75. Basu S, Srivastava PK. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *The Journal of experimental medicine.* 1999;189(5):797-802.
76. Wang XY, Kazim L, Repasky EA, Subjeck JR. Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol.* 2001;166(1):490-7.
77. Toomey D, Conroy H, Jarnicki AG, Higgins SC, Sutton C, Mills KH. Therapeutic vaccination with dendritic cells pulsed with tumor-derived Hsp70 and a COX-2 inhibitor induces protective immunity against B16 melanoma. *Vaccine.* 2008;26(27-28):3540-9. doi:10.1016/j.vaccine.2008.04.005.

78. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *Journal of leukocyte biology*. 2009;85(6):905-10. doi:10.1189/jlb.0109005.
79. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):185-94. doi:10.1038/nri749.
80. Nieland TJ, Tan MC, Monne-van Muijen M, Koning F, Kruisbeek AM, van Bleek GM. Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):6135-9.
81. Breloer M, Marti T, Fleischer B, von Bonin A. Isolation of processed, H-2Kb-binding ovalbumin-derived peptides associated with the stress proteins HSP70 and gp96. *European journal of immunology*. 1998;28(3):1016-21.
82. Binder RJ, Vatner R, Srivastava P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*. 2004;64(4):442-51. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00299.x.
83. Li Z, Menoret A, Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Current opinion in immunology*. 2002;14(1):45-51.
84. Ishii T, Usono H, Yamano T, Ohta H, Uenaka A, Ono T et al. Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *J Immunol*. 1999;162(3):1303-9.
85. Srivastava PK. New jobs for ancient chaperones. *Scientific American*. 2008;299(1):50-5.
86. Binder RJ, Blachere NE, Srivastava PK. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(20):17163-71.
87. Binder RJ, Srivastava PK. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nature immunology*. 2005;6(6):593-9.
88. Malnati MS, Marti M, LaVaute T, Jaraquemada D, Biddison W, DeMars R et al. Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature*. 1992;357(6380):702-4.
89. Lich JD, Elliott JF, Blum JS. Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(9):1513-24.
90. Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nature immunology*. 2005;6(3):287-94.
91. Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG, Adler AJ. Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J Immunol*. 2004;172(10):6087-92.
92. SenGupta D, Norris PJ, Suscovich TJ, Hassan-Zahraee M, Moffett HF, Trocha A et al. Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II. *J Immunol*. 2004;173(3):1987-93.
93. Rajagopal D, Bal V, Mayor S, George A, Rath S. A role for the Hsp90 molecular chaperone family in antigen presentation to T lymphocytes via major histocompatibility complex class II molecules. *European journal of immunology*. 2006;36(4):828-41.
94. Houlihan JL, Metzler JJ, Blum JS. HSP90alpha and HSP90beta isoforms selectively modulate MHC class II antigen presentation in B cells. *J Immunol*. 2009;182(12):7451-8.
95. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol*. 2000;12(11):1539-46.
96. Breloer M, et al., Heat shock proteins as "danger signals": eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells. *Eur J Immunol*, 2001. 31(7): p. 2051-9.

97. More SH, M. Breloer, and A. von Bonin, Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells. *Int Immunol*, 2001. 13(9): p. 1121-7.
98. Lehner T, Bergmeier LA, Wang Y, Tao L, Sing M, Spallek R et al. Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *European journal of immunology*. 2000;30(2):594-603.
99. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol*. 2002;168(6):2997-3003.
100. Gastpar R, et al., The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. *J Immunol*, 2004. 172(2): p. 972-80.
101. Multhoff G, et al., Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol*, 1999. 27(11): p. 1627-36.

CAPÍTULO II: ARTIGO CIENTÍFICO

Redigido de acordo com as normas da revista “Cancer Immunology, Immunotherapy”.

Efeito de baixas concentrações de paclitaxel sobre a imunogenicidade de células de câncer colorretal humano

Juliana Frederico^{1,2}, Graziela Romagnoli², Carolina Gorgulho^{1,2},

Márjorie Golim³, Ramon Kaneno²✉

¹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP- Univ Estadual Paulista; ² Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP- Univ Estadual Paulista; ³ Laboratório de Citometria de Fluxo, Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP- Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

✉ **Autor correspondente:** Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP- Univ Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior s/n, caixa postal 510, 18618-970 Botucatu, SP, Brasil.

Fone: 55 14 38800432; Fax: 55 14 38153744; e-mail: rskaneno@yahoo.com.br

Resumo

Estudos prévios têm demonstrado que baixas concentrações de agentes antineoplásicos como ciclofosfamida e paclitaxel (PAC) modulam positivamente a resposta imune, estimulando linfócitos T e células dendríticas (DCs). Além disso, são capazes de aumentar a imunogenicidade de células de câncer colorretal humano HCT-116, e de induzir a transcrição de genes de proteínas de choque térmico (HSPs). No presente trabalho, tivemos como objetivo avaliar a expressão das HSPs 40, 70 e 90 e comparar o efeito da concentração efetiva mínima (CEM) com a concentração não-tóxica (CNT) de PAC sobre a imunogenicidade das células HCT-116. Células HCT-116 foram tratadas com a CEM ou com a CNT de PAC. Lisados tumorais foram analisados quanto à expressão das HSPs e utilizados para sensibilizar DCs derivadas de monócitos de sangue periférico de indivíduos normais. As DCs foram avaliadas quanto ao seu fenótipo e foram co-cultivadas com linfócitos T alogênicos para a avaliação da capacidade de estimulação desses linfócitos. O tratamento das células tumorais com ambas as concentrações da droga induziu o aumento da expressão de HSP40, enquanto a produção de HSP70 e HSP90 foram aumentadas apenas pela CEM e pela CNT, respectivamente. Observou-se ligeiro, mas não significativo aumento da capacidade de indução da resposta alogênica. Houve também uma tendência ao aumento da expressão de CD40 nos grupos HCT, CEM e CNT. É possível que a expressão das HSPs contribua para o aumento de imunogenicidade induzido pelo PAC. A CEM é menos eficiente que a CNT em aumentar a imunogenicidade das células tumorais, mas não prejudica a capacidade das DCs de induzir a resposta alogênica nem seus marcadores fenotípicos de ativação.

Palavras-chave Câncer colorretal . Células dendríticas . Imunomodulação . Proteína de choque térmico . Quimioterapia

Abstract

Low concentrations of antineoplastic agents such as cyclophosphamide and paclitaxel (PAC) upregulates the immune system, stimulating both lymphocytes and dendritic cells (DCs). Furthermore, they increase the immunogenicity of human colorectal cancer cell line HCT-116, which was associated with transcriptional upregulation of heat shock proteins (HSPs) genes. In the present study, we aimed to evaluate the expression of HSPs 40, 70 and 90 and to compare the minimum effective concentration (MEC) of PAC with the non-toxic concentration (NTC), in terms of enhancing immunogenicity of HCT-116 cells. HCT-116 cells were treated with MEC or NTC of PAC. Tumor cell lysates were analyzed for the expression of HSPs and were used for the sensitization of peripheral blood monocyte-derived DCs from healthy donors. DCs were evaluated for their phenotypes and were co-cultivated with allogeneic T cells for evaluation of the stimulating capacity of these T cells. The treatment of tumor cells with both concentrations of the drug induced an increased expression of HSP40, while production of HSPs 70 and 90 were increased after treatment with MEC and NTC, respectively. We observed slight but not significant increase on the ability to induce allogeneic response. There was a tendency of upregulation of the CD40 marker in the HCT, MEC and NTC groups. It is possible that the expression of HSPs is responsible for the slight increase of immunogenicity induced by PAC. MEC was less efficient than NTC to increase the immunogenicity of tumor cells but did not impair the DCs ability to induce allogeneic response nor their phenotypic activation markers.

Keywords Chemotherapy . Colorectal cancer . Dendritic cells . Heat shock protein . Immunomodulation

Introdução

O câncer colorretal é o terceiro tipo mais frequente de tumor e a terceira causa de morte por câncer no mundo (1). No Brasil, esses tumores também ocupam a terceira posição entre os tipos mais frequentes, com 30 mil casos estimados no último ano, atrás dos cânceres de próstata e pulmão nos homens, e mama e colo do útero nas mulheres (2).

Seu tratamento convencional é baseado em três abordagens terapêuticas: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (3). Essa última usualmente consiste na administração da dose máxima tolerável (DMT) de uma droga citotóxica, com o objetivo de erradicar o maior número possível de células tumorais (4). Apesar de apresentar bons resultados em parcela considerável dos pacientes, esse esquema terapêutico pode desencadear reações adversas, como alterações gastrointestinais, alterações hepáticas, trombocitopenia, aumento do risco de infecção e hemorragia, artralgia, danos ao sistema cardiovascular e nervoso, queda de cabelo e profunda mielossupressão, o que pode interferir no funcionamento normal do sistema imune, com prejuízo à capacidade de resposta inata e específica (5-8).

Essa mielossupressão e os efeitos colaterais extremos exigem que a aplicação dos medicamentos seja seguida de um intervalo de três a quatro semanas para permitir a recuperação e a normalização dos parâmetros hematológicos do paciente. Esse período é necessário para a reconstituição dos níveis de linfócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs). Porém, células tumorais resistentes à droga aproveitam essa condição de supressão das células do sistema imune e ausência de medicação para se adaptar e promover sua expansão, favorecendo a recidiva da doença, bastante comum em câncer metastático (9).

A diminuição do número de DCs, após tratamento com quimioterápico em DMT, pode levar a um alto comprometimento do funcionamento do sistema imune adaptativo, uma vez que as DCs são as principais células apresentadoras profissionais de antígenos (10), com a

capacidade singular de apresentar antígenos a linfócitos T virgens, sendo, portanto, fundamentais no desencadeamento da resposta imune específica (11). Esse papel é favorecido pela expressão constitutiva de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e de classe II (MHC I e MHC II) e de moléculas co-estimuladoras. Antígenos tumorais são endocitados por essas células, sendo regularmente processados pela via endocítica para apresentação de peptídeos em associação com moléculas do MHC II. Entretanto, as DCs têm a habilidade singular de associar peptídeos de antígenos exógenos às moléculas de classe I, promovendo o fenômeno de *cross priming* ou *cross presentation* (12-14).

A importante capacidade apresentadora de antígenos das DCs sustentou o desenvolvimento de vacinas terapêuticas antitumorais baseadas nessas células, com o objetivo de estimular a proliferação de um grande número de células T CD8 efectoras e de romper o estado de imunossupressão estabelecido no microambiente tumoral (15, 16). Essa abordagem imunoterapêutica foi favorecida pela demonstração de que as DCs podem ser diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos de sangue periférico cultivados em meio suplementado com interleucina-4 (IL-4) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (17).

Como alternativa de tratamento quimioterápico dispensado aos pacientes que não resistem ao esquema da DMT, alguns centros empregam o esquema de quimioterapia metronômica, baseado na administração de doses bem mais baixas de agentes antineoplásicos (10-33% da DMT), porém mais frequentes, com o objetivo de manter seus níveis séricos efetivos e reduzir os efeitos colaterais. Além disso, essas doses mais baixas inibem a neoangiogênese no sítio tumoral e preservam a atividade das células do sistema imune (3, 18, 19). Estudos realizados com doses metronômicas de ciclofosfamida indicam que o principal alvo dessa modalidade de

tratamento são as células endoteliais de vasos neoformados, mais sensíveis à droga que células tumorais (3).

Trabalhando com concentrações ainda mais baixas (concentrações não-tóxicas: CNT), nosso grupo observou, previamente, que os antineoplásicos paclitaxel (PAC), doxorubicina, mitomicina C, metotrexato, azacitidina e vinblastina suprarregulam diretamente a habilidade das DCs murinas e humanas em apresentar antígenos a linfócitos T específicos em ensaios *in vitro* (17, 20). PAC é um taxol cujos efeitos antitumorais são atribuídos à supressão da dinâmica dos microtúbulos, resultando em defeitos na divisão celular (21).

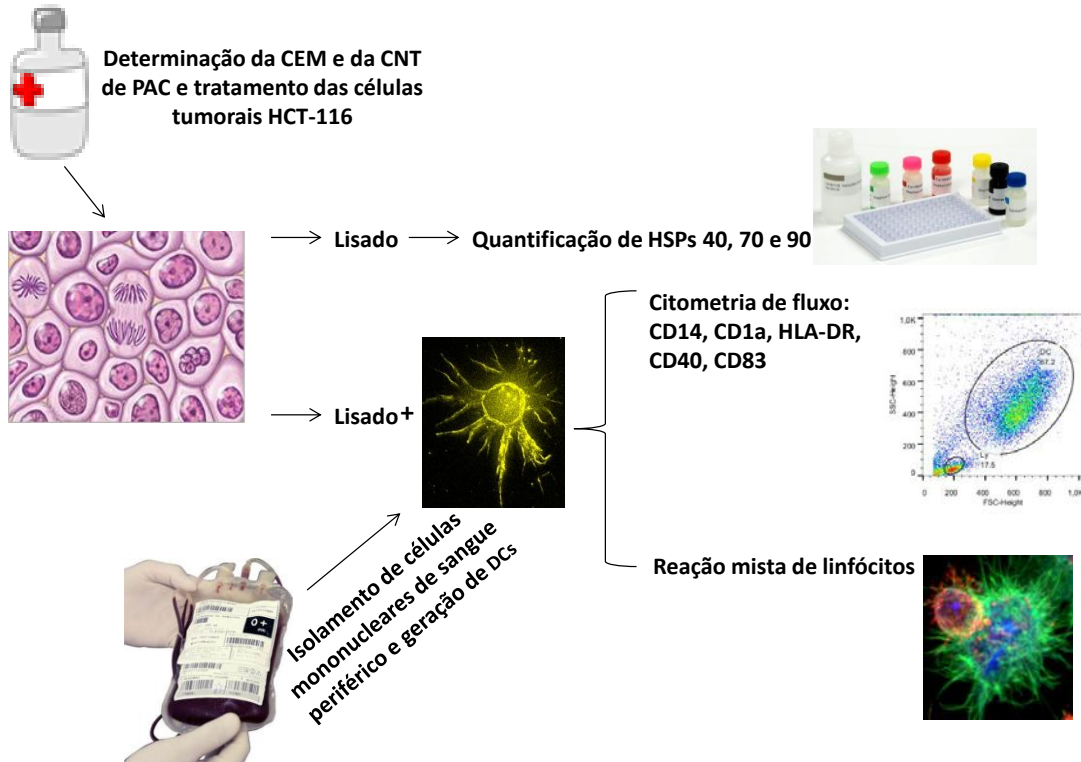
Os resultados do grupo indicaram que o tratamento *in vitro* de células de câncer colorretal humano HCT-116 com a CNT de PAC aumenta sua imunogenicidade e torna-as mais sensíveis à ação de linfócitos T citotóxicos (CTL) gerados *in vitro* (22). Esse aumento de imunogenicidade está associado à expressão de componentes da maquinaria de processamento de antígenos pela via citosólica. Além disso, a análise por *DNA microarray* evidenciou o aumento da transcrição de genes responsáveis pela expressão das proteínas de choque térmico HSP40 e HSP70 (22). Essas proteínas são induzíveis por estresse térmico ou outras formas de agressão, estando envolvidas na degradação e na autorreparação de proteínas danificadas (23). Em geral, as HSPs auxiliam a expressão de peptídeos associados às moléculas do MHC I (24). Por outro lado, essas proteínas são capazes de conduzir o *cross priming* para a apresentação de antígenos processados pela via endocítica (25), indicando que desempenham importante papel na ativação de macrófagos e linfócitos, e na ativação e maturação de DCs (26). Além disso, também tem sido evidenciada a ligação de peptídeos citoplasmáticos (endógenos) às MHC II (27-29), ampliando o papel apresentador dessas células.

Apesar de nossos achados sobre a ação quimioimunomoduladora de concentrações ultrabaixas de quimioterápicos selecionados, tais concentrações são muito mais baixas do que

aquelas clinicamente utilizadas na terapia metronômica em pacientes com câncer. Assim, consideramos que o uso de uma concentração efetiva mínima (CEM), capaz de interromper o crescimento tumoral, representaria uma condição mais próxima daquela usada na prática clínica. Desse modo, para dar mais subsídio imunológico à prática da terapia metronômica, bem como investigar alternativas para a otimização de vacinas terapêuticas de DCs, o presente estudo foi formulado para avaliar se: a) a concentração efetiva mínima (CEM) de paclitaxel (PAC) atua de modo similar à concentração não-tóxica (CNT) sobre a imunogenicidade das células tumorais, e b) as células tumorais tratadas com as diferentes concentrações da droga afetam igualmente a expressão das proteínas de choque térmico (HSPs).

Observamos que o tratamento das células tumorais com ambas as concentrações da droga induziu o aumento da expressão de HSP40, enquanto a produção de HSP70 e HSP90 foram aumentadas apenas pela CEM e pela CNT, respectivamente. Houve um ligeiro, mas não significativo aumento da capacidade de indução da resposta alogênica. Houve também uma tendência ao aumento da expressão de CD40 nos grupos HCT, CEM e CNT.

Delineamento Experimental



Materiais e Métodos

Determinação da concentração efetiva mínima (CEM) e da concentração não-tóxica (CNT) de paclitaxel (PAC) sobre células tumorais HCT-116

Células de câncer colorretal humano HCT-116 foram cultivadas em estufa, a 37°C, sob tensão de 5% de CO₂, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 mM de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não-essenciais, 25mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina e 40µg/ml de gentamicina (meio completo).

As células foram transferidas para uma placa de 96 *wells* de fundo plano (2 x 10⁴ células/ml) e, após 24 h de cultura, foram tratadas com concentrações crescentes de PAC, de 0,5 a 120nM (n= 4). Após 72 h, o efeito citotóxico foi avaliado pela marcação das células vivas com *thiazolyl blue tetrazolium bromide* (MTT) (17), a 1mg/ml, por 2 h. Em seguida, a placa foi centrifugada, a solução de MTT foi removida e dimetilsulfóxido (DMSO) foi aplicado para a solubilização dos cristais de formazan. Após 5 min, a placa foi lida através de espectrofotometria em leitor de ELISA a 540nm.

A densidade óptica (D.O.) das culturas de células tratadas com a droga foi comparada com o **controle de lise espontânea**, composto por células tumorais em cultura por 72 h (viabilidade de 100%), o **controle de lise máxima**, composto somente por meio de cultura (100% de lise) e o **controle basal**, representativo do número inicial de células tumorais, composto por células em cultura por 24 h. Estabeleceu-se como a **CEM** a menor concentração capaz de interromper o crescimento das células tumorais sem promover morte celular (ação citostática), similar ao controle basal, e como a **CNT** a concentração incapaz de interferir no crescimento das células em cultura (similar ao controle de lise espontânea).

Tratamento das células tumorais e preparação de lisados

Células tumorais foram ajustadas a $2,5 \times 10^5$ células/ml nos ensaios com a CEM. Nos ensaios com a CNT, as células foram ajustadas a 1×10^5 células/ml, visto que nessa concentração as células continuam se proliferando, de modo que em uma concentração maior as células atingiriam 100% de confluência em um tempo muito precoce, resultando em morte celular. As células foram cultivadas em garrafas apropriadas por 24 h. No dia seguinte, foram adicionadas as soluções de PAC, seguindo-se um período adicional de 48 h. As células foram, então, removidas e lisadas por descongelamento e congelamento rápido em cinco ciclos de exposição alternada a 37°C (banho-maria) e -80°C (N₂ líquido). Após esse procedimento, as células foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 min e o lisado foi recolhido, quantificado e congelado.

Análise de proteínas de choque térmico (HSPs) por ELISA

Placas de cultura de 96 wells foram sensibilizadas com 40 µg/ml de proteínas do pool de 5 amostras de lisados de células HCT-116 de cada grupo, pré-tratadas com a CEM de PAC, com a CNT ou não tratadas, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (triplicata). No dia seguinte, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com solução de leite em pó desnatado a 10%, diluído em tampão carbonato-bicarbonato. As placas foram incubadas por 2 h com os anticorpos primários IgG policlonais de carneiro anti-HSP 40, 70 e 90 (1:40). Após lavagem, a reação foi revelada com uso de anticorpo secundário de camundongo anti IgG de carneiro conjugado à peroxidase de raiz forte (mouse anti-goat IgG-HRP; 1:500), TMB, tampão citrato-acetato e H₂O₂. A reação foi interrompida com 50 µl de HCl 2M e, em seguida, a leitura foi realizada por espectrofotometria em leitor de ELISA a 450 nm, resultando em valores de D.O.

Geração de células dendríticas (DCs) humanas

DCs humanas foram geradas a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis, obtidas de *buffy coat* de bolsas de sangue de doadores voluntários do Banco de Sangue do Hemocentro de Botucatu, após esclarecimento sobre o projeto e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo).

Após separação em gradiente de Ficoll-Hypaque e lise das hemácias, as PBMC foram ressuspensas em meio de cultura AIM-V (Invitrogen) e distribuídas em placas de 6 *wells* (5×10^6 células/ml). Após 1 h e meia em estufa, a 37°C, sob tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes (linfócitos totais) foram removidas e criopreservadas. Os monócitos aderentes foram mantidos em cultura em meio completo com 80ng/ml de IL-4 humana recombinante (rhIL-4) e 80ng/ml de GM-CSF humano recombinante (rhGM-CSF) (PeproTech).

Sensibilização de DCs humanas

No quinto dia de cultura, as células frouxamente aderidas foram recolhidas, lavadas com meio completo, distribuídas em placas de 6 *wells* (10^6 células/*well*) e sensibilizadas com 100 µg de lisado por *well* (proporção tumor:DC aproximada de 5:1). As culturas foram divididas em quatro grupos: **DC** (DCs imaturas não sensibilizadas com lisado tumoral), **HCT** (DCs sensibilizadas com lisado de célula tumoral não tratada com a droga), **CEM** (DCs sensibilizadas com lisado de célula tumoral pré-tratada com a concentração efetiva mínima) e **CNT** (DCs sensibilizadas com lisado de célula tumoral pré-tratada com a concentração não tóxica).

Reação mista de linfócitos (MLR)

A atividade funcional das DCs foi avaliada através de sua habilidade em estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos de indivíduos normais. No sétimo dia de cultura, DCs sensibilizadas de diferentes doadores (n= 5) foram co-cultivadas com linfócitos T de um único doador em placas de 96 *wells*, estabelecendo-se as proporções DCs: linfócitos T de 1:1, 1:3, 1:10 e 1:30. A cultura foi mantida por quatro dias em estufa, a 37°C, sob tensão de 5% de CO₂, e a proliferação de linfócitos foi avaliada pela capacidade de internalização de MTT e biotransformação em cristais de formazan por leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA a 540 nm. Os resultados das culturas foram expressos como índices de proliferação, calculados através da fórmula: (D.O. experimental – D.O. linfócito)/ D.O. linfócito.

Análise fenotípica das DCs

Para a avaliação fenotípica, as DCs (2 x 10⁵ células/tubo) foram lavadas com Isoton (BD Biosciences) por 10 min a 1700rpm (n= 3). Foram, então, incubadas com os anticorpos monoclonais anti-CD14, CD1a, HLA-DR, CD40 e CD83 (BD Biosciences), conjugados com FITC ou PE, por 30 min, a 4°C e ao abrigo de luz. Após nova lavagem com Isoton, as células foram ressuspensas em 50 µL de fixador e 450 µL de Isoton, adquiridas por citômetro de fluxo FACSCalibur e Software CellQuest (BD Biosciences), e analisadas pelo Software FlowJo versão 10.0.5. (Three Stars Inc.). Os resultados estão mostrados com base na intensidade mediana de fluorescência (MFI).

Análise estatística

Os resultados da determinação das concentrações de PAC sobre células HCT-116 e da expressão de HSPs foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de

Tukey para comparações múltiplas. Os resultados do MLR e da citometria foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Foram consideradas significantes as diferenças cujas probabilidades de erro foram menores que 5% ($p < 0.05$).

Resultados

Determinação das concentrações de trabalho de PAC sobre células HCT-116

A análise dos resultados do ensaio de citotoxicidade foi baseada na incorporação de MTT e redução em cristais de formazan, representando a população de células vivas. Cada diluição foi comparada com os controles de lise espontânea (viabilidade de 100%), lise máxima (100% de lise) e basal (24 h de cultura). Observamos na Fig. 1 que a concentração de **3,5nM** foi a menor concentração capaz de interromper o crescimento das células tumorais sem promover morte celular (ação citostática), sendo definida como concentração efetiva mínima (**CEM**). Observou-se que a D.O. da cultura com essa concentração foi similar ao controle basal, que representa a quantidade de células equivalente à inicialmente colocada nos alvéolos de cultura, diferindo do controle de lise espontânea, em que as células puderam se multiplicar durante o período total de cultura (24 + 48h). A concentração de **0,5nM**, cuja D.O. foi similar ao controle de lise espontânea, mostrou-se incapaz de interferir no crescimento das células em cultura e foi definida como concentração não-tóxica (**CNT**).

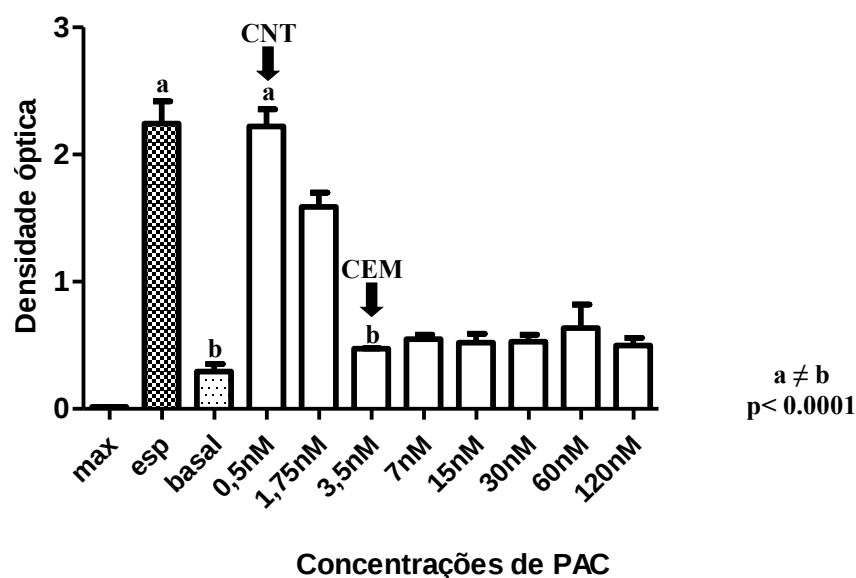


Fig. 1 Determinação da CEM e da CNT de PAC sobre células HCT-116. A monocamada de células tumorais foi submetida a tratamento durante 72 h com concentrações crescentes da droga, variando de 0,5 a 120nM. Após esse período, as células viáveis foram quantificadas por coloração pelo MTT. Ensaio representativo de 4 avaliações independentes. Dados expressos em D.O. (média $\pm$ erro padrão). **max:** controle de lise máxima; **esp:** controle de lise espontânea; **basal:** controle basal; **a $\neq$ b**; $p < 0.0001$; ANOVA, seguida do teste de Tukey.

Aumento da produção de HSPs por exposição ao PAC

Observamos que o tratamento das células HCT-116 com a CEM e com a CNT do fármaco promoveu aumento da concentração de HSPs 40, 70 e 90 nos lisados dessas células, quando comparados ao lisado de células tumorais não tratadas (HCT). O tratamento com ambas as concentrações de PAC induziu aumento da expressão de HSP40 (CEM: $0,444 \pm 0,074$; CNT: $0,412 \pm 0,058$ vs HCT: $0,225 \pm 0,035$; $p < 0,05$). A produção de HSP70 foi aumentada nas células expostas à CEM (CEM: $0,722 \pm 0,284$ vs HCT: $0,222 \pm 0,047$; $p < 0,05$), enquanto a

HSP90 foi elevada pela exposição à CNT (CNT: 0.526 ± 0.125 vs HCT: 0.273 ± 0.025 ; $p < 0,05$) (Fig. 2).

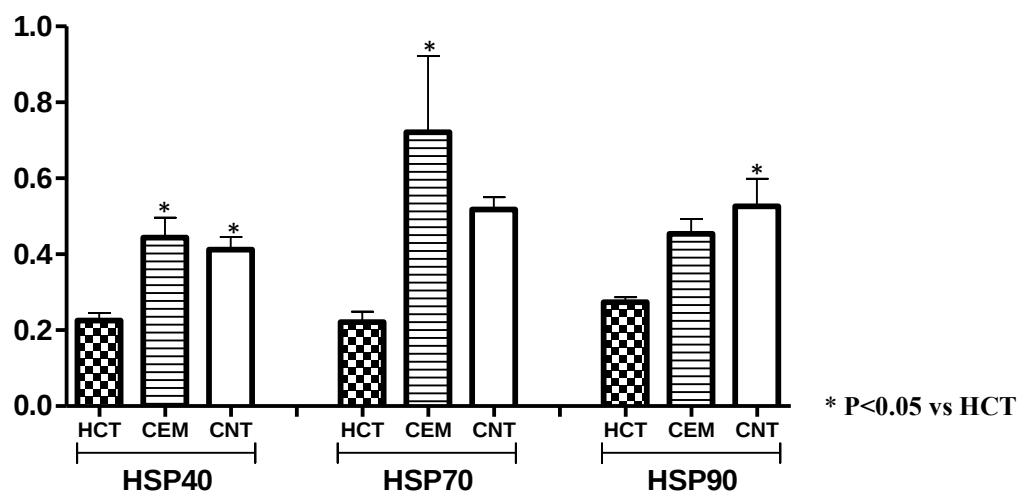


Fig. 2 Aumento da expressão de HSPs 40, 70 e 90 em lisados de células tumorais HCT-116 pré-tratadas com a CEM (3,5 nM) ou com a CNT (0,5 nM) de PAC. Os níveis de HSP40, 70 e 90 foram determinados pela técnica de ELISA. Análise, em triplicata, do pool de lisados celulares de cada grupo. Dados expressos em D.O. (média $\pm$ erro padrão); $p < 0.05$ vs HCT; ANOVA, seguida do teste de Tukey.

Efeito dos lisados tumorais sobre a indução de reatividade alogênica

A atividade funcional das DCs submetidas à sensibilização com diferentes lisados de células tumorais (**DC, HCT, CEM e CNT**) foi avaliada através da medida de sua habilidade em estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos de indivíduos normais. Na Fig. 3, pode ser observada ligeira elevação da mediana da atividade proliferativa dos linfócitos co-cultivados com as DCs sensibilizadas com lisados de células tumorais pré-tratadas com a droga. Entretanto, não se observou elevação estatisticamente significativa da capacidade de

indução da resposta alôgênica, indicando que o efeito da exposição das células às diferentes concentrações da droga foi irrelevante.

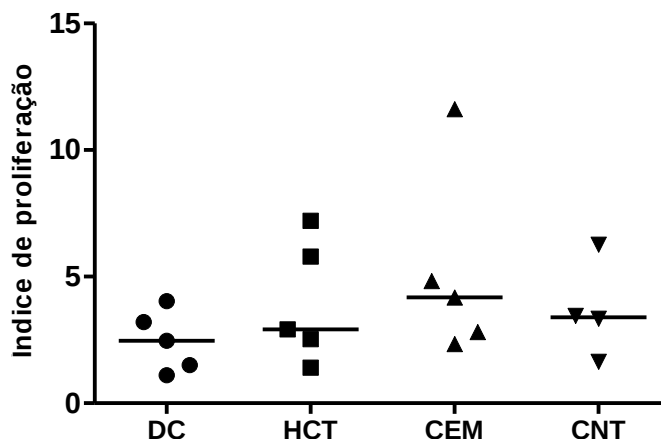


Fig. 3 Efeito dos lisados tumorais sobre a indução de reatividade alôgênica. DCs sensibilizadas com antígenos solúveis de células HCT-116 pré-tratadas com CEM ou com CNT de PAC foram co-cultivadas com linfócitos totais alôgênicos por 96 h. Solução de MTT foi adicionada para coloração das células viáveis e, em seguida, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540nm. Ensaio representativo de 5 experimentos em triplicata. Dados expressos em índice de proliferação, sendo a linha transversal indicativa da mediana de cada grupo. Foi utilizada a proporção de 1:1 entre DCs e linfócitos T; teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

Fenotipagem de DCs sensibilizadas com lisados de células tumorais pré-tratadas com PAC

Como pode ser observado na Fig. 4, a sensibilização das DCs com lisados de células tumorais pré-tratadas com baixas concentrações de PAC não promoveu alterações significantes em seus perfis fenotípicos, exceto pela tendência ao aumento na densidade de CD40 nos grupos HCT, CEM e CNT, sendo mais evidente no grupo CNT (Fig. 4D; MFI: intensidade mediana de fluorescência). Em relação aos marcadores CD14, CD1a, HLA-DR e

CD83 não houve diferença significativa entre os grupos (Fig. 4A, B, C e E). A expressão de CD14 foi baixa, conforme o esperado.

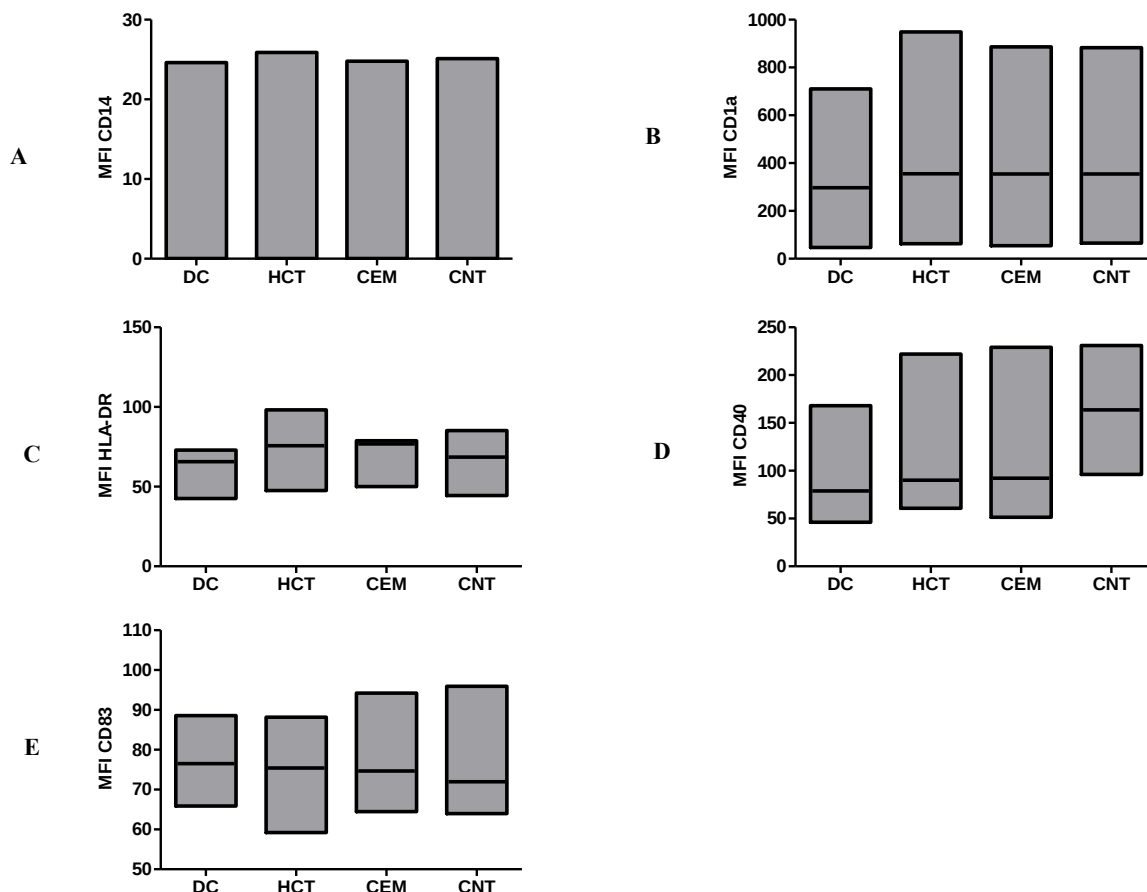


Fig. 4 Avaliação fenotípica (CD14, CD1a, HLA-DR, CD40 e CD83) de DCs sensibilizadas com lisado de células tumorais tratadas com a CEM ou com a CNT de PAC. Resultados de 3 avaliações independentes. Dados expressos em intensidade mediana de fluorescência (MFI), sendo a linha transversal indicativa da mediana de cada grupo; teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

Discussão

A quimioimunomodulação é um fenômeno observado com o uso de baixas doses de vários agentes antineoplásicos, como a ciclofosfamida (30), a antraciclina (31) (32) e o PAC (22).

Formulado com o propósito de avaliar a expressão das HSPs em células tumorais tratadas com baixas concentrações de PAC, o presente estudo mostra que o tratamento com ambas as concentrações da droga induziu o aumento da expressão de HSP40, enquanto a produção de HSP70 e HSP90 foram aumentadas apenas pela CEM e pela CNT, respectivamente. Esses resultados indicam que as alterações transcricionais dos genes de HSPs, observadas em estudo prévio, por *DNA microarray* (22), se traduzem no aumento da expressão dessas proteínas.

Nosso passo seguinte foi verificar se a concentração citostática (CEM) de PAC era capaz de promover o aumento da capacidade apresentadora de antígenos das DCs. Nossos resultados indicam que lisados de células tratadas com a CEM ou com a CNT da droga mostram ligeira tendência a melhorar a ativação da resposta imune alogênica, com pequena vantagem para a CNT.

Uma das explicações para o aumento da capacidade apresentadora de antígenos das DCs sensibilizadas com lisado de células tumorais pré-tratadas com droga em baixas concentrações poderia ser o aumento da expressão de HSPs nessas células, proteínas que desempenham importante papel na ativação de macrófagos e linfócitos, e na ativação e maturação de DCs (26). O principal papel das HSPs é sua ação antiapoptótica nas células sob estresse térmico ou químico (33). Entretanto, essas proteínas também auxiliam a expressão de peptídeos associados às moléculas do MHC I (24), conduzindo o *cross priming* para a apresentação de antígenos processados pela via endocítica (25). Além disso, observou-se que a HSP90 participa da associação de peptídeos citoplasmáticos e exógenos às moléculas do MHC II (34). Em nosso estudo, observamos associação entre a expressão de HSP 70 e 90 tanto com o pequeno aumento de atividade das DCs, quanto com a expressão de CD40, nos grupos CEM e CNT.

Em um estudo paralelo, observamos que a transfecção de DCs com RNA de células HT-29 tratadas com baixas concentrações de PAC ou 5- fluorouracil (5-FU) torna as DCs mais eficientes em induzir a geração de CTL (dados não publicados). Visto que as células HT-29 representam uma linhagem que não expressa moléculas de MHC I (22), o aumento da imunogenicidade das células tumorais pode não depender apenas do aumento de antígenos tumor-associados ou tumor-específicos. Assim, é possível que o aumento da expressão de “sinais de perigo” (alarminas), como HSPs (35), *high mobility-group box 1* (HMGB1) e calreticulina (36) representem um alvo alternativo para os CTL gerados *in vitro*.

Portanto, o aumento da expressão de HSPs, que poderia ser interpretado como uma tentativa de adaptação e resistência das células expostas à droga, pode também representar um fator favorável ao reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos pelas DCs sensibilizadas com os lisados. É possível que as HSPs, induzidas pela exposição à droga e presentes nos lisados, estejam carregando peptídeos tumorais, facilitando sua associação às moléculas de classe I e/ou de classe II das DCs sensibilizadas. Assim, um aspecto que deveremos continuar a investigar é o efeito da CEM sobre as próprias DCs, bem como o efeito da droga sobre outras linhagens tumorais e sobre a expressão de outras alarminas (HMGB1 e calreticulina) para o melhor entendimento da quimioimunomodulação.

Embora sem significância estatística, o resultado da ativação da resposta alogênica é coerente com achados prévios do grupo, demonstrando que a CNT de PAC aumenta a imunogenicidade de células HCT-116 (22). É importante notar que embora o lisado de células tratadas com a CEM não tenha suprarregulado a atividade das DCs, essa concentração não se mostrou prejudicial à sensibilização dessas células, indicando que não reduziu a imunogenicidade das células tumorais.

Entre as possíveis explicações para as diferenças entre os presentes resultados e aqueles previamente descritos pensamos, inicialmente, nas formulações da droga. Diferentemente do estudo anterior, em que se empregou o PAC purificado de *Taxus brevifolia* para uso não-clínico (Sigma-Aldrich), no presente estudo utilizamos o produto sintético em solução, comercialmente disponível para uso terapêutico. Essa escolha foi feita com o objetivo de trabalhar com o máximo de similaridade com as condições observadas na clínica, entretanto, não sabemos se essa formulação poderia, de alguma forma, interferir nos parâmetros analisados.

Um segundo e, talvez, mais importante fator é a utilização de métodos diferentes de detecção da proliferação celular. No presente estudo foi utilizado o método colorimétrico baseado na redução de MTT em formazan que, indiretamente, indica a atividade metabólica das células. Diferentemente, no estudo prévio do grupo, a atividade proliferativa das células foi analisada pela marcação com timidina triciada (^3H -timidina), composto radiomarcado que se incorpora ao DNA das células em replicação. Assim, embora este último seja considerado o método de referência para a avaliação da proliferação celular, o fato de exigir o uso de radioisótopos impossibilitou sua utilização em nossa instituição.

Finalmente, visto que trabalhamos com doadores de ambos os sexos, deve ser considerada a heterogeneidade de respostas devida a diferenças de bagagem genética, dimorfismo sexual (37) e níveis hormonais, que podem ter interferido na efetividade celular e na resposta ao estímulo. Sabe-se que as mulheres possuem mais resistência às infecções que os homens, devido, provavelmente, à superioridade das respostas imunes humoral e celular, que parecem estar diretamente relacionadas com os hormônios sexuais (38). De fato, já foi demonstrado que as DCs apresentam receptores para estrógeno e progesterona, os quais regulam a ativação

dessas células, aumentando a expressão de moléculas co-estimuladoras, como CD40, CD80, CD86, e também de MHC II (37).

Em relação à análise fenotípica das DCs, observamos uma tendência ao aumento na densidade de moléculas CD40 expressas por DCs sensibilizadas com a CNT. Esse parece ser um marcador de ativação mais sensível à quimiodulação visto que essa tendência já havia sido observada por nosso grupo (17). A interação CD40-CD40L induz as DCs a produzirem IL-12 e expressarem moléculas co-estimuladoras B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86), necessárias à ativação das células T CD8 efectoras (39). A IL-12, por sua vez, pode induzir a produção de IFN- γ por células T e estimular a proliferação de células T ativadas (40).

Os protocolos de preparação de vacinas de DCs podem variar desde o uso de lisados de células tumorais (41,42), peptídeos (22, 43), HSPs (44) e ácidos nucleicos (45-47), até a geração de hibridomas DC: tumor (48, 49). Em um estudo que está sendo paralelamente desenvolvido pelo grupo foi utilizado RNA total de células tumorais para a sensibilização das DCs, observando-se que sua transfecção com RNA de células tratadas com baixas concentrações de 5-FU apresenta aumento da capacidade de ativar a resposta alogênica e de estimular a geração de células T citotóxicas (dados não publicados). Esses resultados indicam que o 5-FU, principal agente antineoplásico utilizado no combate ao câncer de cólon, também potencializa a imunogenicidade de células tumorais e que baixas concentrações poderiam ser utilizadas em associação com a administração de vacinas de DCs. Assim, embora utilizando outro agente antineoplásico, a transfecção das DCs com ácido nucleico tumoral parece ser eficiente em induzir a expressão proteica das alterações gênicas promovidas pela exposição à droga.

A escolha, no presente trabalho, pela utilização de lisados das células tumorais para essa sensibilização deveu-se ao fato de que a) proteínas tumorais induzidas pelo tratamento seriam

mais provavelmente expressas pelas células tumorais do que nas DCs transfectadas com o RNA tumoral; b) o lisado não é suscetível à influência de nucleases, tornando-se um material mais estável para manipulação; c) os lisados representariam o repertório dos antígenos presentes nas células tumorais íntegras, similar à condição do paciente; d) sua preparação é mais rápida e de menor custo. Por outro lado, o lisado pode conter fatores imunossupressores, os quais poderiam interferir na plenitude da resposta imune.

De qualquer modo, nossos dados indicam que, mesmo em uma concentração um pouco mais elevada (CEM), o PAC não interfere negativamente na sensibilização das DCs, possivelmente por não induzir morte celular não-imunogênica, como poderia ocorrer com o uso da DMT (50). Assim, o tratamento não favoreceu o estabelecimento de tolerância aos antígenos tumorais. Essa visão é corroborada por nossa observação prévia de que o PAC suprarregula o papel apresentador de antígenos das DCs humanas (17) e murinas (20). Na mesma linha de investigação, mesmo trabalhando com concentrações superiores às utilizadas por nós (1 a 1000 uM), John et al. (51) observaram que DCs humanas de doadores normais expostas por 2 horas a 1-10uM de droga tiveram significativo aumento em sua capacidade de estimular a proliferação de linfócitos alogênicos.

Outros autores demonstraram que o PAC interfere na maturação das DCs murinas, aumentando a expressão de MHC II (52), apresentando ação similar ao LPS (53, 54), sendo capaz de ativar macrófagos e de induzir aumento na produção de IL-1 e TNF- α (55), NO (56) e IL-12 (57), que contribuiriam para melhorar a atividade antitumoral.

Em resumo, o presente estudo nos permitiu concluir que é possível que a expressão das proteínas de choque térmico contribua para o aumento de imunogenicidade induzido pelo paclitaxel. A concentração efetiva mínima desse agente antineoplásico é menos eficiente que sua concentração não citotóxica em aumentar a imunogenicidade das células tumorais, mas

não promove efeitos negativos sobre esse parâmetro, não prejudicando a capacidade das DCs de induzir a resposta alogênica nem seus marcadores fenotípicos de ativação.

Agradecimentos

Agradecemos ao doutor Michael R. Shurin, da Universidade de Pittsburgh- PA, EUA, por ter gentilmente cedido as células de câncer colorretal humano da linhagem HCT-116. À Gislene Mastranjo de Oliveira pelo valioso auxílio na obtenção e preparação das amostras de sangue dos doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Botucatu. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro processo 2009/18331-8 e pela concessão de bolsa de estudos, nível mestrado proc. 2011/05258-0. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos, nível mestrado proc. 135663/2011-3.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências Bibliográficas

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011;61(2):69-90.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva MdS. Estimativa 2012, Incidência de câncer no Brasil. 2012 [cited; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>
3. Shurin GV, Amina N, Shurin MR. Cancer Therapy and Dendritic Cell Immunomodulation. In: Shurin MRS, R.D., editor. *Dendritic Cells in Cancer*. New York: Springer; 2009. p. 201-16.
4. Skipper HE, Schabel FM, Jr., Wilcox WS. Experimental Evaluation of Potential Anticancer Agents. Xiii. on the Criteria and Kinetics Associated with "Curability" of Experimental Leukemia. *Cancer chemotherapy reports* 1964;35:1-111.
5. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1999;340(24):1888-99.
6. Andre T, de Gramont A, Study Group of Clinical Research in Radiotherapies Oncology OMRG. An overview of adjuvant systemic chemotherapy for colon cancer. *Clinical colorectal cancer* 2004;4 Suppl 1:S22-8.
7. McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Molecular cancer therapeutics* 2009;8(1):10-6.
8. Vento S, Cainelli F, Temesgen Z. Lung infections after cancer chemotherapy. *The lancet oncology* 2008;9(10):982-92.
9. Hahnfeldt P, Folkman J, Hlatky L. Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis. *Journal of theoretical biology* 2003;220(4):545-54.
10. Shurin MR. Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43(3):158-64.
11. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82(1):97-130.
12. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual review of immunology* 2012;30:1-22.
13. Tittarelli A, Gonzalez FE, Pereda C, *et al.* Toll-like receptor 4 gene polymorphism influences dendritic cell in vitro function and clinical outcomes in vaccinated melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61(11):2067-77.
14. Arina A, Tirapu I, Alfaro C, *et al.* Clinical implications of antigen transfer mechanisms from malignant to dendritic cells. exploiting cross-priming. *Experimental hematology* 2002;30(12):1355-64.
15. Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother* 2008;31(9):793-805.
16. Grabbe S, Beissert S, Schwarz T, Granstein RD. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today* 1995;16(3):117-21.
17. Kaneno R, Shurin GV, Tourkova IL, Shurin MR. Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Transl Med* 2009;7:58.
18. Klement G, Baruchel S, Rak J, *et al.* Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000;105(8):R15-24.
19. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, *et al.* Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer research* 2000;60(7):1878-86.

20. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol* 2009;183(1):137-44.
21. Sevko A, Michels T, Vrohligs M, *et al.* Antitumor effect of Paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *J Immunol* 2013;190(5):2464-71.
22. Kaneno R, Shurin GV, Kaneno FM, Naiditch H, Luo J, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)* 2011;34(2):97-106.
23. Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* 1994;372(6505):475-8.
24. Binder RJ, Blachere NE, Srivastava PK. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J Biol Chem* 2001;276(20):17163-71.
25. Binder RJ, Srivastava PK. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2005;6(6):593-9.
26. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* 2009;85(6):905-10.
27. Malnati MS, Marti M, LaVaute T, *et al.* Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 1992;357(6380):702-4.
28. Lich JD, Elliott JF, Blum JS. Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins. *J Exp Med* 2000;191(9):1513-24.
29. Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol* 2005;6(3):287-94.
30. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 2005;105(7):2862-8.
31. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13(9):1050-9.
32. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, *et al.* The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological reviews* 2007;220:47-59.
33. Elstrand MB, Stavnes HT, Trope CG, Davidson B. Heat shock protein 90 is a putative therapeutic target in patients with recurrent advanced-stage ovarian carcinoma with serous effusions. *Human pathology* 2012;43(4):529-35.
34. Houlihan JL, Metzler JJ, Blum JS. HSP90alpha and HSP90beta isoforms selectively modulate MHC class II antigen presentation in B cells. *J Immunol* 2009;182(12):7451-8.
35. Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 2002;23(3):130-5.
36. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 2010;29(4):482-91.
37. Hughes GC, Clark EA. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. *Autoimmunity* 2007;40(6):470-81.
38. Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *The American journal of pathology* 1985;121(3):531-51.
39. Mackey MF, Gunn JR, Ting PP, *et al.* Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154. *Cancer research* 1997;57(13):2569-74.
40. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cellular immunology* 1992;143(1):127-42.

41. Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *International journal of cancer* 1997;70(6):706-15.
42. Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(16):9482-7.
43. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, *et al.* Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996;183(1):87-97.
44. Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science (New York, NY)* 1997;278(5335):117-20.
45. Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lysterly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer research* 2000;60(4):1028-34.
46. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 1996;184(2):465-72.
47. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lysterly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *International journal of cancer* 1999;82(1):121-4.
48. das Neves FJ, Mattos IE, Koifman RJ. Colon and rectal cancer mortality in Brazilian capitals, 1980-1997. *Arq Gastroenterol* 2005;42(1):63-70.
49. Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R *et al.* Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(12):1111-8.
50. Zitvogel L, Kroemer G. Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. *J Clin Invest* 2009;119(8):2127-30.
51. John J, Ismail M, Riley C, *et al.* Differential effects of Paclitaxel on dendritic cell function. *BMC immunology* 2010;11:14.
52. Joo HG. Altered maturation of dendritic cells by taxol, an anticancer drug. *Journal of veterinary science* 2003;4(3):229-34.
53. Ding AH, Porteu F, Sanchez E, Nathan CF. Shared actions of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release. *Science (New York, NY)* 1990;248(4953):370-2.
54. Manthey CL, Brandes ME, Perera PY, Vogel SN. Taxol increases steady-state levels of lipopolysaccharide-inducible genes and protein-tyrosine phosphorylation in murine macrophages. *J Immunol* 1992;149(7):2459-65.
55. Bogdan C, Ding A. Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in macrophages. *Journal of leukocyte biology* 1992;52(1):119-21.
56. Mullins DW, Burger CJ, Elgert KD. Tumor growth modulates macrophage nitric oxide production following paclitaxel administration. *International journal of immunopharmacology* 1998;20(10):537-51.
57. Mullins DW, Burger CJ, Elgert KD. Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol* 1999;162(11):6811-8.



Anexos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de julho de 2013

OF. 103/2013-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Ramon Kaneno
Departamento de Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biociência de Botucatu

Prezado Dr. Ramon,

Informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3437-2010) "Quimioimunomodulação com agentes antineoplásticos e geração de vacinas de células dendríticas contra o câncer colorretal", a ser conduzido por Vossa Senhoria, aprovado por este CEP em 01/03/10 conta com os sub-projetos abaixo com seus respectivos executores.

Sub-Projeto I: "Efeitos de doses efetivas mínimas de paclitaxel e 5-aza-2-dioxicitidina sobre a função das células dendríticas humanas e imunogenicidade das células de câncer colorretal".

Pesquisador anterior: Mariana de Souza Nars

Pesquisador atual: Juliana Cristina Longo Frederico

Novo título: "Efeito imunomodulador de baixas concentrações de antineoplásticos"

Objetivo Acadêmico: Dissertação de Mestrado

Sub-Projeto II: "Efeitos de doses efetivas mínima e doses não-tóxicas de 5-fluorouracil e leucovorina sobre a atividade de células dendríticas humanas e imunogenicidade de células de câncer colorretal", que será conduzido por Denise da Silva Reis (Iniciação Científica), orientada por Vossa Senhoria.

Sub-Projeto III: "Geração de vacinas antitumorais de células dendríticas humanas sensibilizadas com RNA de células tumorais pré-tratadas com agentes antineoplásticos".

Pesquisador anterior: Marianna Bertelega Magalhães

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 18.618-970

Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

kleber@fmb.unesp.br

e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Pesquisador atual: Carolina de Almeida Araújo

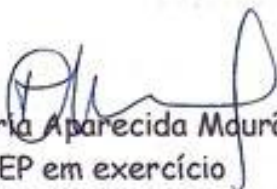
Novo título: "Baixas doses de 5-fluorouracil aumentam a atividade antitumoral de células dendríticas transfectados com RNA de células de câncer colorretal"

Objetivo acadêmico: Tese de Doutorado

Quanto ao sub-projeto 5 "Efeito protetor in vivo de vacinas de células dendríticas sensibilizadas com MRNA de células MC-38 pré-tratadas com agentes antineoplásicos em doses efetivas mínimas", que será tese de doutorado de Marcela Rodrigues de Camargo, foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu, portanto essa comunicação deverá ser feita à comissão ora citada.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução dos projetos, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades" (mãe e sub-projetos).

Atenciosamente,



Profª. Titular Maria Aparecida Mourão Brasil
Coordenador do CEP em exercício

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG
nº _____, telefone (opcional): _____, residente
à _____

_____, **sou**
doador voluntário de sangue ao Hemocentro de Botucatu, FMB, UNESP e fui
informado(a) sobre a realização da pesquisa “Quimioimunomodulação com agentes
antineoplásicos e geração de vacinas de células dendríticas contra o câncer colorretal”.
Entendi que os pesquisadores querem testar o efeito de algumas drogas antitumorais
sobre células de defesa do organismo, com o objetivo de desenvolver um tipo de vacina
para melhorar a resposta imunológica contra o câncer de cólon e reto. Entendi também
que para o desenvolvimento desse estudo é necessário usar as células brancas
(leucócitos), uma parte do sangue que pode ser removida, sem prejuízo para o receptor
da transfusão.

Consentindo em participar, estou ciente de que apenas as células brancas do meu
sangue serão usadas para a realização de culturas celulares e que tanto as hemácias
(células vermelhas) quanto o plasma, que contém plaquetas e outros componentes
importantes para o Banco de Sangue, serão preservados. Compreendi que essa pesquisa
não me trará nenhum risco, que não haverá necessidade de alterar a quantidade de
sangue a ser doado e que haverá sigilo em relação aos resultados obtidos. Embora eu
não vá ser diretamente beneficiado pelos resultados, os mesmos poderão fornecer
informações importantes para o desenvolvimento das vacinas antitumorais,
beneficiando outras pessoas no futuro.

O trabalho será desenvolvido pelo **Prof. Dr. Ramon Kaneno**, do Departamento de
Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, e pela aluna **Juliana**
Cristina Longo Frederico, CPF: 357161948-00.

Assim considero-me esclarecido(a) e concordo em colaborar com o desenvolvimento do projeto, permitindo o uso dos meus leucócitos. Afirmo não ter sido pressionado(a) física ou psicologicamente para colaborar com a pesquisa ou assinar o presente termo, estando ciente de que os responsáveis por este trabalho estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas ou dúvidas no Departamento de Microbiologia e Imunologia. O não consentimento da minha parte não interferirá na qualidade do atendimento de minha saúde em qualquer setor do HC-FMB/UNESP.

Botucatu, _____ de _____ de _____.

Doador

Prof. Dr. Ramon Kaneno

Depto. Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências de Botucatu

UNESP

Colaboradora