

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeito de baixas concentrações de agentes antineoplásicos
sobre linfócitos humanos de sangue periférico**

Aluna: Fabiana Albani Zambuzi

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, como parte
das exigências para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu – SP

2012

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

Zambuzi, Fabiana Albani.

Efeito das baixas concentrações de agentes antineoplásicos sobre linfócitos humanos de sangue periférico / Fabiana Albani Zambuzi. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ramon Kaneno

Capes: 21102007

1. Intestinos – Câncer – Quimioterapia. 2. Imunoterapia. 3. Linfócitos. 4. Células T. 5. Células cancerosas – Proliferação.

Palavras-chave: AZA; 5-FU; Linfócitos; Imunoterapia; Quimioterapia metronômica.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu chegar até aqui e conquistar mais esta etapa. Aos meus pais, João e Adenilse, por todo amor, dedicação e apoio durante todos estes anos. À minha irmã, Isabela, pelo companheirismo e pela experiência trocada. Ao namorado, Rogério, pelo carinho, pelo apoio e compreensão. Aos amigos antigos pela presença apesar de toda distância e aos novos amigos pela companhia, pelos momentos de risada e descontração. Às companheiras de laboratório, Cecília, Victoria, Carolina Gorgulho, Juliana, Marcela e Carolina Araujo, pelo auxílio nos experimentos, pelos almoços e momentos de diversão. À República TPM pela família, pela amizade e por todos os momentos compartilhados, em especial à Daniele, Maria Vitória e Thais pelas noites de estudo, pelos trabalhos e principalmente pela convivência diária. Ao orientador, Ramon Kaneno, por todo conhecimento transmitido, pelo aprendizado e pela oportunidade oferecida. A FAPESP pelo auxílio e financiamento do projeto (Processo 2011/20307-8).

“Tenho a impressão de ser uma criança brincando a beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma pedra mais lisa
ou uma concha mais bonita que as outras,
enquanto o imenso oceano de verdade
continua misterioso a frente dos meus olhos.”

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

1. RESUMO	6
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUÇÃO.....	8
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	13
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
5.1. Determinação das concentrações efetiva mínima e não tóxica dos agentes antineoplásicos (ação sobre células tumorais).....	14
5.2. Ensaio de citotoxicidade sobre linfócitos	14
5.3. Ensaio de Apoptose (Anexina V)	15
5.4. Ensaio de Linfoproliferação.....	16
5.5. Reação Mista de Linfócitos (MLR)	16
5.6. Quantificação de citocinas	17
5.7. Análises Estatísticas.....	18
6. RESULTADOS	18
6.1. Determinação das concentrações efetiva mínima e não-tóxica de AZA e 5-FU	18
6.2. Ensaio de citotoxicidade sobre linfócitos	20
6.3. Ensaio de Apoptose	21
6.4. Ensaio de Linfoproliferação.....	23
6.5. Reação Mista de Linfócitos	24
6.6. Quantificação de Citocinas	25
7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXO	35

1.RESUMO

Estudos prévios do grupo mostraram que baixas concentrações (não tóxicas) de agentes antineoplásicos modulam positivamente as células dendríticas, favorecendo sua maturação *in vitro* e melhorando sua função de apresentação de antígenos. Os efeitos sobre células de câncer colorretal (HCT-116) também foram investigados e observou-se aumento da imunogenicidade e suscetibilidade às células T. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito causado pela administração de 5-fluorouracil (5-FU) e azacitidina (AZA), nas concentrações efetiva mínima e não tóxica sobre linfócitos de doadores saudáveis. Neste estudo, analisamos o efeito citotóxico das drogas nestas concentrações assim como a habilidade proliferativa dos linfócitos. A produção *in vitro* de IL-10 e IFN- γ também foi avaliada. Observamos que baixas concentrações dos agentes quimioterápicos não são tóxicos para os linfócitos. Entretanto, as concentrações efetivas mínimas (5-FU: $0,410\pm 0,088$ e AZA: $0,757\pm 0,233$; $p < 0,05$) reduziram o número de células. A atividade proliferativa de linfócitos alogênicos na reação mista de linfócitos (MLR) não foi afetada pelo tratamento. A produção de citocinas também não foi afetada pela administração das drogas. Em conclusão, baixas concentrações de 5-FU e AZA não apresentaram efeitos deletérios sobre linfócitos humanos de sangue periférico e parecem ser seguras para administração em associação com vacinas de DC.

Palavras-chave: antineoplásicos, linfócitos, quimioterapia metronômica

2. ABSTRACT

Our previous studies have shown that low concentrations (noncytotoxic) of antineoplastic agents modulate positively the dendritic cells, favoring their *in vitro* maturation and improving their antigen presenting function. The effects on colorectal cancer cells (HCT-116) were also investigated and we have observed an increased immunogenicity and susceptibility to cytotoxic T cells. Thereby, this study aimed to investigate the effect of 5-fluorouracil (5-FU) and azacitidine (AZA), in minimum effective and noncytotoxic concentrations on lymphocytes of healthy donors. In this study we have analyzed the cytotoxic effect of drugs at these concentrations as well as the proliferative ability of lymphocytes. *In vitro* production of IL-10 and IFN- γ has been also evaluated. We have observed that low concentrations of those chemotherapeutic agents are not cytotoxic for lymphocytes. However, the minimum effective concentrations (5-FU: $0,410 \pm 0,088$ e AZA: $0,757 \pm 0,233$; $p < 0,05$) have reduced the cell number. Proliferative activity of allogeneic lymphocytes in a mixed reaction (MLR) was not affected by the treatment. The cytokine production was not affected by the treatments, either. In conclusion, low concentrations of 5-FU and AZA has no deleterious effects on human peripheral blood lymphocytes and seems to be safe for combinatory administration with DC vaccines.

Keywords: antineoplastic, lymphocytes, metronomic chemotherapy

3. INTRODUÇÃO

O tratamento convencional do câncer baseia-se em três importantes modalidades: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia citotóxica, mas os conhecimentos obtidos, principalmente nos últimos 10 anos, expandiram grandemente as possibilidades terapêuticas com o uso da imunoterapia e terapias moleculares, combinadas ou não com outras modalidades de tratamento.

A ressecção cirúrgica de um tumor primário é um tratamento efetivo para a grande maioria dos tipos de câncer, incluindo o câncer colorretal. No entanto, a imunossupressão produzida pelo estresse pré- e pós-traumático é uma complicação clínica que tem sido observada (Shakhar & Bem-Eliyahu, 2003; Page, 2005; Goldfarb & Ben-Eliyahu, 2006; Brancato & Miner, 2008). Uma das principais consequências dessa imunossupressão pode ser a facilitação do aparecimento de doenças metastáticas, para as quais a quimioterapia citotóxica neoadjuvante ou adjuvante (administradas pré e pós cirurgia respectivamente) corresponde à opção escolhida para mais da metade das pessoas diagnosticadas com câncer (Andre e Gramont, 2004).

O tratamento convencional com agentes antineoplásicos baseia-se na administração da máxima dose tolerada pelo paciente (MTD), objetivando a eliminação do maior número possível de células tumorais (Mihich, 1967, 2000 a, b). Entretanto, a dosagem limite da maioria das drogas mostra efeitos mielossupressores, acarretando neutropenia e linfopenia, reduzindo a atividade e o número de células efectoras do sistema imunológico (Half et al, 2009). A leucopenia geralmente ocorre entre o nono e 14º dias após a primeira administração, sendo os linfócitos uma das principais populações de células depletadas pela utilização da quimioterapia convencional, observando-se também anemia e trombocitopenia em alguns casos (Shurin et al, 2012).

As células dendríticas também se mostram sensíveis a altas doses de quimioterápicos. Algumas drogas podem interferir na apresentação de antígenos (Nakashima et al, 2005), reduzir a mobilização celular (Ferrari et al, 2003) e a expressão de marcadores de superfície, como CD80 e CD86 (Jiga et al, 2004), importantes para estimulação da resposta imune antitumoral, permitindo dessa maneira que haja escape de células resistentes à ação das drogas e crescimento do tumor.

Hepatotoxicidade, nefropatia, perda de cabelo, mudanças nas unhas, dermatites, aumento da pigmentação e atrofia da pele, além de manifestações neurológicas e mielopatia também estão relacionados entre os efeitos colaterais causados pela administração das doses máximas toleráveis dos medicamentos (Hardman et al; 1996). Assim, embora amplamente utilizada, a quimioterapia é acompanhada de toxicidade para tecidos normais e uma expectativa de cura limitada no caso de alguns tipos tumorais (Saltz et al; 1996).

Outro problema encontrado no protocolo da quimioterapia convencional encontra-se no fato de que são obedecidos intervalos de 3-4 semanas entre as administrações dos medicamentos, permitindo que o paciente se recupere dos efeitos colaterais gerados pela dose máxima tolerável, porém a ausência de medicação nestas semanas reduz a concentração sérica da mesma, o que culmina no crescimento dos clones resistentes ao tratamento. Dessa forma mesmo apresentando uma regressão satisfatória no início do tratamento, as recidivas são frequentes após período prolongado de tratamento (Hahnfeldt et al; 2003).

A quimioterapia pode induzir apoptose das células do tumor, condição em que são consideradas pouco imunogênicas (Kerr et al 1972). Assim, o uso de altas doses de drogas antineoplásicas pode levar a uma exposição exagerada de antígenos ao sistema imune, capaz de induzir tolerância imunológica (Nowak et al; 2003). Paradoxalmente, tem sido demonstrado que a quimioterapia pode aumentar a resposta imunológica contra o tumor quando administrada em concentrações mais baixas e frequentes (Nowak et al; 2006), abrindo a perspectiva de combinação desta forma de tratamento com as propostas da imunoterapia.

Para tal alternativa de tratamento utilizam-se doses mais baixas dos agentes antineoplásicos, administrados com maior frequência (conhecida como terapia metronômica), objetivando manter níveis séricos efetivos das drogas, com redução dos efeitos colaterais (Laquente et al, 2007).

Os alvos principais dessa modalidade de tratamento são as células endoteliais dos vasos do tumor, que participam do processo de angiogênese para suprimento sanguíneo do tumor em formação. Essas células são mais sensíveis à toxicidade induzida pelas baixas doses dos agentes antineoplásicos quando comparadas às células tumorais (Shurin et al, 2009).

Observou-se que concentrações não citotóxicas de determinadas drogas antineoplásicas modulam a resposta imune do hospedeiro, como pode ser exemplificado pela ciclofosfamida, um agente alquilante de DNA, responsável por potencializar a reação de hipersensibilidade tardia, através da redução do número e da função das células T regulatórias (Tregs) quando administrada de 1 a 3 dias antes do antígeno (Turk et al, 1982). Tal tratamento é capaz de retroregular os genes de FoxP3 e GITR, responsáveis pela função regulatória das células Tregs. Além disso, a ciclofosfamida também se mostrou eficaz em aumentar a resposta de anticorpos em modelos animais (Bass et al, 1998).

A primeira demonstração da habilidade de aumentar a resposta imunológica humana da ciclofosfamida data de 1982, quando 22 pacientes foram tratados com a droga em concentrações de 1000 mg/m² e de 300 mg/m², sendo comprovado o aumento da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia quando comparado ao grupo controle, porém a resposta humoral só demonstrou aumento no grupo tratado com a dose ultra baixa (Berd et al, 1986). Também foi demonstrado que o número de células CD8+CD11+, na época, referidas como células T supressoras, diminuiu no grupo tratado com a droga quando comparado ao grupo sem tratamento (Hoon et al, 1990).

A combinação desta droga com imunoterapia baseada em células dendríticas mostrou aumentar a sobrevivência de camundongos acometidos por tumor, sendo que a depleção de Tregs pelo uso concomitante de ciclofosfamida melhora a resposta frente ao tumor quando comparados a grupos que receberam os tratamentos de maneira isolada (Veltman et al, 2010).

Outra droga antitumoral que teve seus efeitos testados quando administradas em doses mais baixas e não citotóxicas, é o paclitaxel (PAC), um inibidor mitótico, com ação sobre a formação dos microtúbulos. Estudos prévios já demonstraram a capacidade da droga de alterar a expressão de genes de células tumorais humanas, sendo estes associados com os mecanismos de processamento antigênico (Kaneno et al, 2010). Também se mostrou eficaz em aumentar a imunogenicidade, quando utilizada sobre linhagem celular de câncer colorretal (HCT-116), aumentando a sensibilidade à resposta T citotóxica (Kaneno et al, 2010).

Adicionado às células dendríticas, o PAC foi capaz de regular positivamente a maturação dessas células, aumentando a expressão de moléculas de superfície como CD83, CD40 e MHC de classe II. Observou-se também efeito direto sobre sua capacidade de apresentação de antígenos (Kaneno et al, 2009). Outros estudos realizados com a droga demonstraram que o PAC foi o principal indutor da expressão de IL-12 nas DCs, necessário para a expansão clonal, função efetora e fenótipo de memória das células T (Shurin et al, 2009).

A combinação de PAC com protocolos de imunoterapia, neste caso por injeções intratumorais de células dendríticas, também foi testada. Em um modelo murino de carcinoma de pulmão, esta combinação de quimio e imunoterapia mostrou-se mais eficiente do que os tratamentos isolados em inibir crescimento tumoral, induzir infiltrados de células T CD4⁺ e CD8⁺ no tumor e desenvolver resposta tumor específica nos linfonodos regionais (Moschella et al; 2010).

Dentre os cânceres mais incidentes no mundo encontramos o câncer colorretal, e a principal droga de escolha para o tratamento desta doença é o 5-fluorouracil (5-FU) (Conley et al, 1998). A droga inibe a enzima timidilato sintase, cujos metabólitos incorporam-se ao RNA e ao DNA da célula, reduzindo a síntese e o reparo de danos do DNA (Noordhuis et al.; 2004). Assim o medicamento reduz a atividade proliferativa das células tumorais, uma vez que atua sobre o ciclo celular (Van der Wilt, 1994). O 5-FU tem sido usado no tratamento dos cânceres gastrointestinais há mais de cinco décadas e cerca de dois milhões de pacientes já receberam essa droga, porém mais da metade demonstrou respostas falhas no tratamento da doença, devido a sua toxicidade (Pettersen et al, 2011).

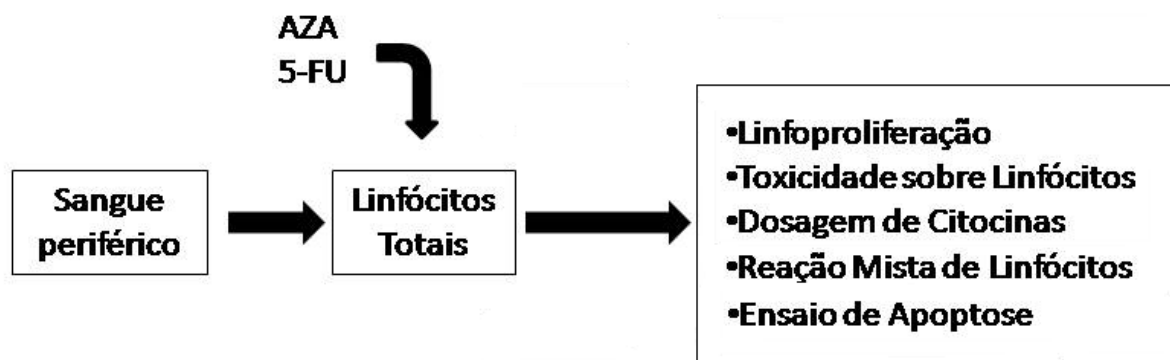
Outra droga que mereceu ser estudada quanto aos seus efeitos imunomoduladores é a 5-aza-2-deoxicitidina (AZA), um análogo de nucleotídeo com estrutura de ribose, que é incorporado ao RNA e posteriormente ao DNA, por ação de uma ribonucleotídeo redutase (Issa et al, 2005). A droga atua através de hipometilações de regiões promotoras de genes e pode reativar genes silenciados, como os genes supressores tumorais, restaurando as funções supressoras ou induzindo a diferenciação celular. Em estudo prévio do grupo, observou-se que a AZA foi capaz de aumentar a expressão de CD40 e de MHC II, indicando ter ação direta sobre a maturação das DCs humanas *in vitro* (Kaneno, 2009). A atividade funcional também foi beneficiada pelo tratamento, observando-se a facilitação da proliferação de células na reação mista de linfócitos.

Embora muitos grupos tenham estudado os efeitos de baixas doses de quimioterápicos sobre DCs, há pouca informação sobre a ação direta em linfócitos. Assim, tendo em vista os resultados já obtidos em nosso grupo com as drogas supracitadas sobre as DCs e a linhagem de células HCT-116 de câncer colorretal humano, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos causados por essas drogas, nessas concentrações, sobre linfócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, e se tais efeitos sustentam a hipótese

de que o uso de concentrações não tóxicas dos agentes antineoplásicos favorece o uso da imunoterapia.

Dessa maneira foram analisados *in vitro* os efeitos de 5-FU e AZA em suas concentrações efetiva mínima e não tóxicas sobre os linfócitos de indivíduos normais, avaliando-se a toxicidade e o efeito sobre a proliferação espontânea e induzida (Concanavalina A) dessas células.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Determinação das concentrações efetiva mínima e não tóxica dos agentes antineoplásicos (ação sobre células tumorais).

Células de câncer de cólon humano de linhagem HCT-116 foram mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25mM de HEPES, 1mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais e 0,1% de piruvato de sódio (meio completo) a 37° C, sob tensão de 5% de CO₂.

Culturas de células à concentração de $4 \cdot 10^5$ células/poço em placa de 96 alvéolos de fundo plano foram adicionadas de soluções contendo a droga estudada em concentrações decrescentes de 100µM a 1µM para 5-FU e de 5nM a 0,1562nM para AZA. Após 72 horas à 37° C e 5% de CO₂, as placas foram lavadas com meio completo e adicionadas de solução a 0,05% de MTT para avaliação das células viáveis que permaneceram na placa. Os cristais de formazana, resultantes do metabolismo do MTT foram solubilizados com 2-mercaptoetanol e a placa foi analisada por espectrometria à 540 nm.

5.2. Ensaio de citotoxicidade sobre linfócitos

Para preparo da cultura de linfócitos T, foram colhidos 20 mL de sangue periférico de indivíduos normais e as células foram enriquecidas através de separação em gradiente de Ficoll-Hypaque. As células foram ressuspensas em meio completo e incubadas com as drogas por 72 ou 120 horas para avaliar o efeito dos medicamentos sobre os linfócitos. Os doadores foram convidados a participar do estudo, após esclarecimento dos objetivos e apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO).

Para tal ensaio, metade do meio foi removido da cultura e incubado com solução de MTT (SIGMA) à concentração de 5 mg/mL diluído em meio simples RPMI. Foram adicionados 10 µL dessa solução por poço, e a placa foi incubada por 4 horas a 37 °C. Após incubação, o sobrenadante foi removido, e então adicionado 100 µL de DMSO. A solução foi homogeneizada até que os cristais de formazan fossem completamente dissolvidos. A leitura da absorbância, diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, foi feita através de leitor de ELISA no comprimento de onda de 540 nm.

A porcentagem de viabilidade celular foi obtida através de cálculo da média aritmética das triplicatas e normalizada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância das células das amostras} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância de células controle negativo} - \text{Absorbância do branco}} \times 100$$

5.3. Ensaio de Apoptose (Anexina V)

Para avaliação da apoptose gerada pela administração das concentrações de trabalho de AZA e 5-FU foi realizado o ensaio de Anexina V. Culturas de linfócitos obtidos de sangue periférico de indivíduos normais foram tratados com as concentrações efetiva mínima e não tóxica das drogas e mantidos em cultura a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas em placas de 24 wells. Após este período a placa foi lavada com meio RPMI completo e as células não aderentes foram lavadas com PBS, e em seguida com solução tampão do fabricante (eBioscience). A concentração das células foi ajustada para 1x10⁶ céls/mL e 100 µL dessa suspensão foi transferido para tubo de citometria. Foi adicionado 5µL de Anexina V- FITC, o qual foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionada Solução de Iodeto de propídio (marcador de DNA). A análise do ensaio foi realizada através de citometria de fluxo, utilizando-se o Software CellQuest e os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas.

5.4. Ensaio de Linfoproliferação

Os linfócitos isolados de sangue periférico de doadores voluntários saudáveis (20 mL) (n=8) foram cultivados em meio completo e incubados com as drogas nas concentrações pré estabelecidas, de acordo com o item 1, para avaliar o efeito dos medicamentos sobre a proliferação linfocitária espontânea ou induzida por mitógeno dos linfócitos.

A atividade linfoproliferativa foi avaliada por coloração das células com MTT e subsequente determinação da viabilidade das células. O resultado foi expresso como índice de estimulação, calculado de acordo com a fórmula: $I.E = D.O. teste/D.O. controle$

Para avaliar o efeito das drogas sobre a linfoproliferação induzida, as culturas foram repetidas na presença de Concanavalina A, um mitógeno para linfócitos T, à concentração de 5µg/mL.

5.5. Reação Mista de Linfócitos (MLR)

Células dendríticas (DCs) foram obtidas a partir de monócitos de sangue periférico de indivíduos normais. Células mononucleares foram separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, ressuspensas em meio AIM-V e distribuídas em placas de cultura de 6 wells. Em cada well foram adicionados 2 mL de suspensão celular a 5×10^6 céls/mL. As placas foram mantidas em cultura a 37 °C e 5% de CO₂ por período de 2 horas para adesão dos monócitos.

As células não aderentes foram removidas através de lavagem da placa com meio AIM-V morno. As células aderidas foram incubadas com meio de cultura RPMI completo suplementado com 160 ng/mL de GM-CSF e IL-4, por 6 dias para que houvesse a diferenciação dos monócitos em DCs.

No sexto dia de cultura foi preparada uma cultura de linfócitos alogênicos, obtidos de sangue periférico de indivíduos normais e separados por gradiente de Ficoll-Hypaque tratados

com as concentrações estabelecidas de AZA e 5-FU, que foi mantida a 37 °C e 5% de CO₂ por período de 24 horas a concentração de 1×10^6 céls/mL, em placas de 96 wells.

No sétimo dia as DCs foram recolhidas com auxílio de pipeta, lavadas com meio RPMI completo e a concentração foi ajustada para 1×10^6 céls/mL. Estas células foram, então, adicionadas a placa de linfócitos alogênicos para co-cultivo, estabelecendo-se proporções Ly:DCs T de 1:1, 3:1, 10:1, 30:1, 100:1, 300:1. A cultura foi mantida por 4 dias a 37 °C e 5% de CO₂ e a proliferação dos linfócitos foi avaliada através ensaio de MTT (já descrito).

5.6. Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos para determinação de IFN- γ e IL-10, através de método de ELISA (Biosciences, Inc). O método consiste na sensibilização da placa com 100 μ L do anticorpo de captura e incubação da mesma a 4 °C overnight. No dia seguinte a placa foi lavada 4 vezes com PBS Tween e adicionado reagente diluente, para bloquear reações inespecíficas, com posterior incubação da placa por 1 hora a temperatura ambiente. Após este período a placa foi novamente lavada 4 vezes com PBS Tween e foram adicionados os sobrenadante de cultura, que estavam congelados, assim como a curva padrão e a placa foi incubada por mais 2 horas a temperatura ambiente.

Passadas as 2 horas, a placa foi lavada e adicionou-se 100 μ L de solução contendo o anticorpo de detecção em cada poço. Após mais uma hora de incubação, novas lavagens foram realizadas e 100 μ L de Avidina foi adicionada por poço. A placa foi então incubada por mais 30 minutos, e lavada 5 vezes com o PBS Tween, deixando-o de 30 a 60 segundos na placa. Por fim foi adicionado TMB e a placa foi mantida no escuro por poucos minutos até detecção de cor, com seguida adição de solução stop (2N H₂SO₄). A leitura foi realizada em leitor de ELISA com filtro de 450 nm.

5.7. Análises Estatísticas

As análises estatísticas de valores paramétricos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), seguidas de teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos. Para valores não paramétricos utilizamos testes de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. Foram consideradas significantes as diferenças cuja probabilidade de erro foram inferiores a 5% ($p \leq 0.05$).

6. RESULTADOS

6.1. Determinação das concentrações efetiva mínima e não-tóxica de AZA e 5-FU

A análise dos resultados do ensaio de citotoxicidade foi baseada na incorporação de MTT e redução a cristais de formazana, representando a população de células vivas. Cada diluição foi comparada aos controles positivo e negativo e entre cada uma delas. Como controle representativo da concentração inicial de células, adicionou-se uma suspensão de células 24 horas antes da leitura de MTT (controle basal).

A concentração efetiva mínima foi determinada através de comparação com os controles basal e positivo (apenas meio de cultura), indicando interrupção do crescimento celular. A concentração não tóxica foi comparada aos controles negativo (composto de células tumorais em meio de cultura – controle de 72h) e positivo.

O ensaio indicou que a concentração de 20 μ M como a concentração efetiva mínima (CEM) e de 1 μ M como a concentração não tóxica (CNT) para 5-FU (Fig.1). Para AZA as concentrações determinadas foram 5nM como CEM e 0,1562nM como CNT (Fig. 2).

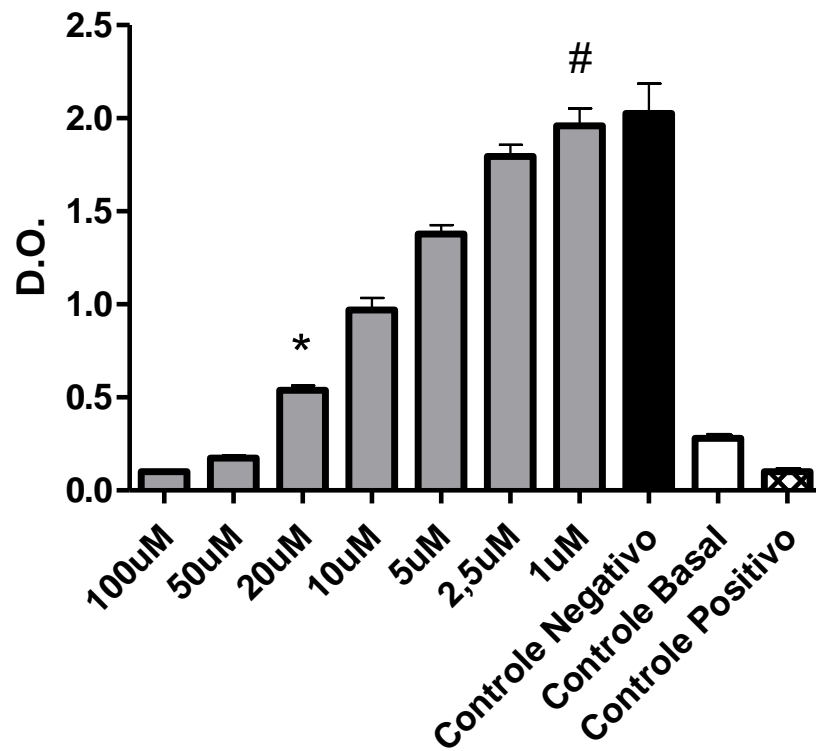


Figura 1 - Reação de citotoxicidade de 5-FU sobre células HCT-116 para determinação das concentrações efetiva mínima (*) e não tóxica (#), baseado na média de 3 experimentos independente.

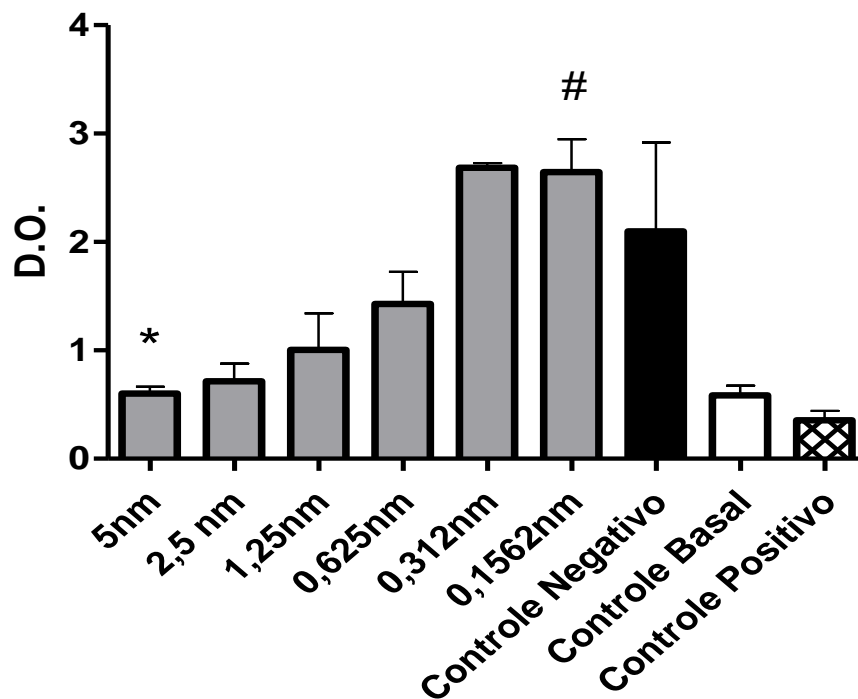


Figura 2- Reação de citotoxicidade de AZA sobre células HCT-116 para determinação das concentrações efetiva mínima (*) e não tóxica (#). Média de 3 experimentos independentes.

6.2. Ensaio de citotoxicidade sobre linfócitos

A análise dos dados permite observar que a adição das drogas nas culturas de linfócitos por 72h não alterou o número de células viáveis totais. Porém, quando se adicionou mitógeno ao sistema observou-se diferença na viabilidade das células, como ilustrado na Figura 3. Notou-se queda acentuada do número de células nos grupos tratados com ambas drogas na CEM (5-FU: $0,410 \pm 0,088$ e AZA: $0,757 \pm 0,233$; $p < 0,05$). Tais resultados indicam atividade citostática do 5-FU sobre os linfócitos uma vez que o mitógeno não provocou proliferação celular nestes grupos, o qual apresentou proliferação semelhante à ausência do estímulo. Para AZA a resposta foi diferente, em sua concentração efetiva mínima reduziu o crescimento celular quando comparado ao controle, mas não apresentou atividade citostática sobre os linfócitos.

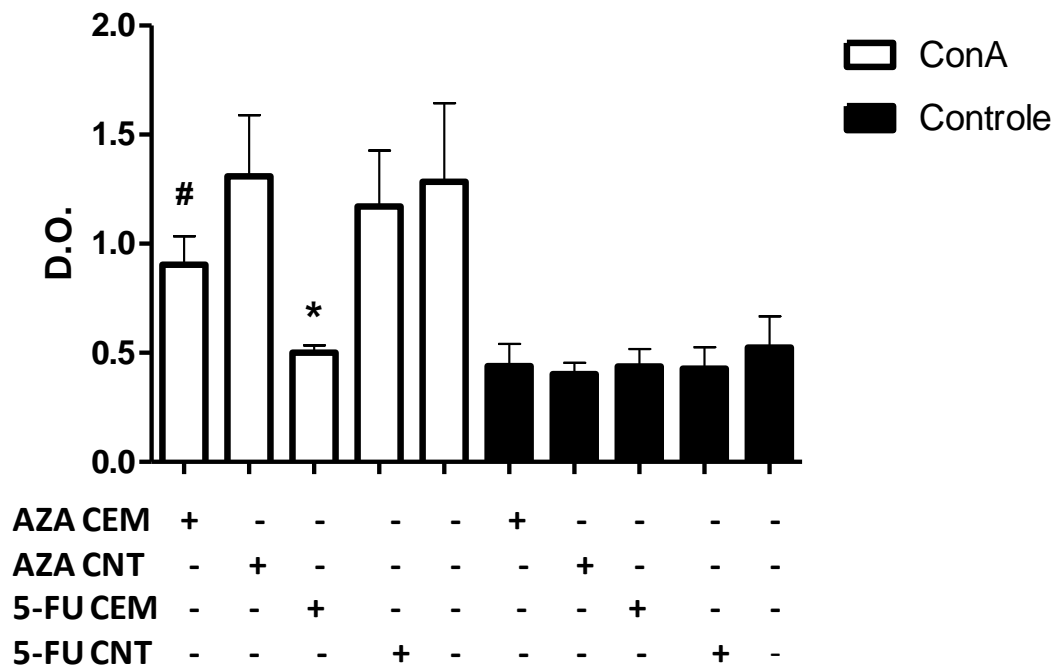


Figura 3 - Ensaio de Toxicidade sobre linfócitos. Cultura de 72 horas de linfócitos na presença ou não de ConA. Média de 8 avaliações independentes. Dados expressos em D.O. Quando na presença de ConA (#): AZA CEM vs AZA CNT e CTRL; $p < 0,05$ e (*): 5-FU CEM vs AZA CEM; AZA CNT; 5-FU CNT e CTRL $p < 0,001$

Também foram realizadas análises de culturas de 120 h (5 dias) com a intenção de avaliar se as drogas tinham ação estimulante sobre linfócitos. Os dados deste ensaio não indicaram nenhuma diferença significativa entre os grupos e deste com o controle. Fig. 4

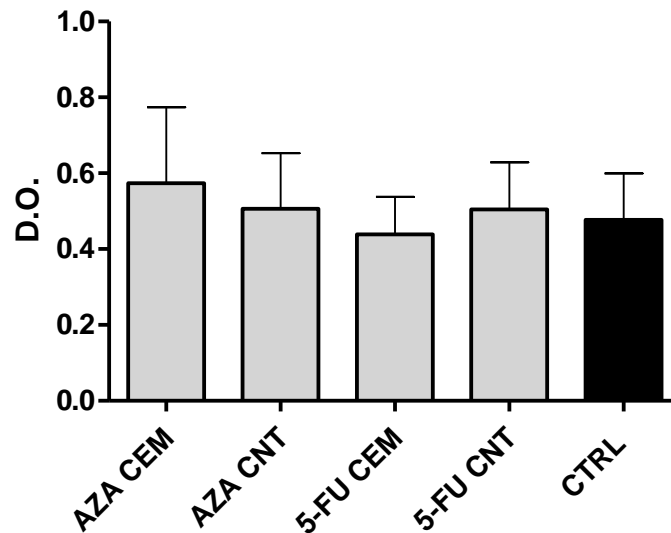


Figura 4 - Ensaio de toxicidade sobre linfócitos. Cultura de 120 h. Média de 4 avaliações independentes. Dados expressos em D.O resultante da redução de MTT .

6.3. Ensaio de Apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado utilizando linfócitos tratados com as diferentes doses das drogas, os quais foram mantidos em cultura por 24 horas, para posterior análise da Anexina V.

Como pode ser observado nas figuras 5 e 6, as drogas, nas concentrações de trabalho, não induziram apoptose nos linfócitos. Mais de 90% das células permaneceram viáveis após 24 horas de cultura com as concentrações efetiva mínima e não tóxica das drogas de trabalho. As figuras 5 e 6 representam os dados dos indivíduos analisados.

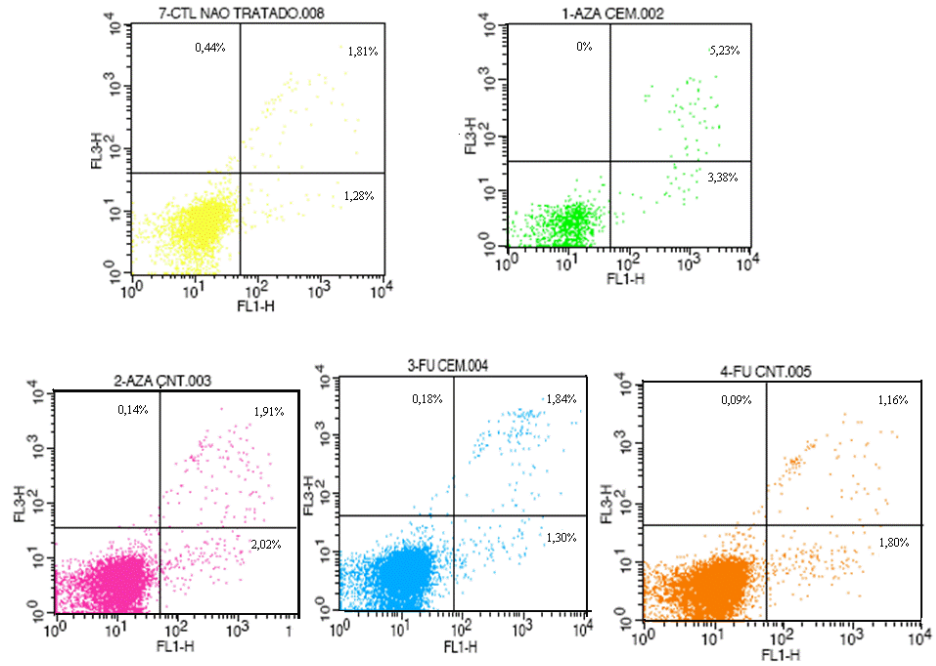


Figura 5 - Ensaio de Apoptose. Células em apoptose foram marcadas com Anexina V e estão representadas nos quadrantes inferior e superior direito. Taxa de apoptose inferior a 10%. Dados obtidos por citometria de fluxo.

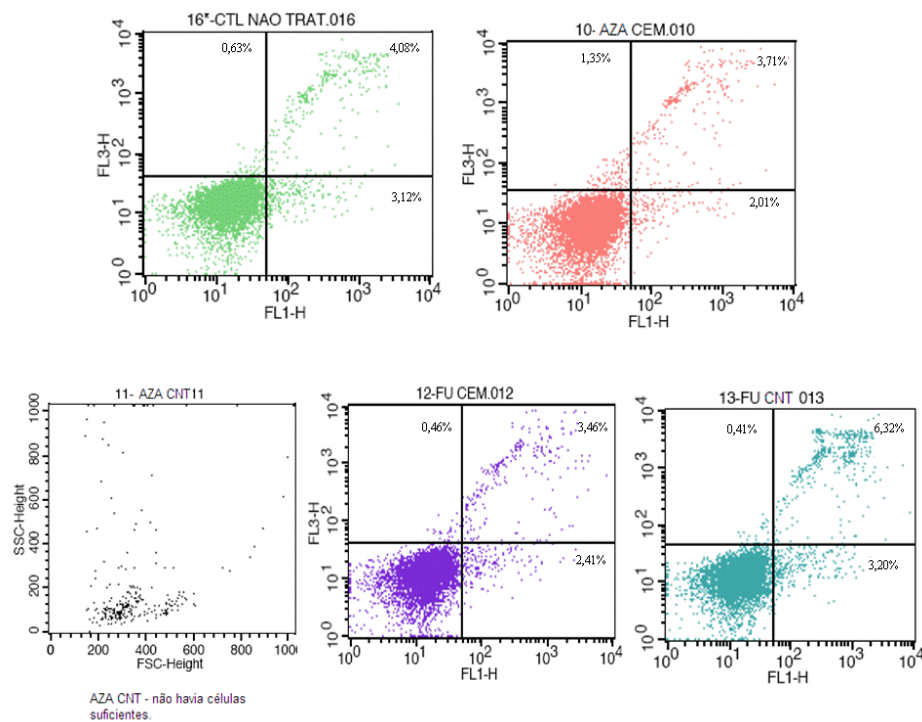


Figura 6 - Ensaio de Apoptose. Células em apoptose foram marcadas com Anexina V e estão representadas nos quadrante inferior e superior direito. Taxa de apoptose inferior a 10%. Dados obtidos por citometria de fluxo.

6.4. Ensaio de Linfoproliferação

A análise dos índices de proliferação de linfócitos mostrou diferença significativa quando estes foram tratados com AZA CEM e 5-FU CEM, na presença de ConA durante 72 h de cultura. O tratamento com AZA CEM + ConA teve índice significativamente menor que de AZA CNT + ConA ($p < 0,05$), enquanto a administração de 5-FU CEM + ConA mostrou redução significativa em relação a todos os outros tratamentos, ($p < 0,001$). Quando avaliamos a cultura de 72 h sem a presença do mitógeno, não foi constatada nenhuma alteração significante entre os tratamentos (Fig 7).

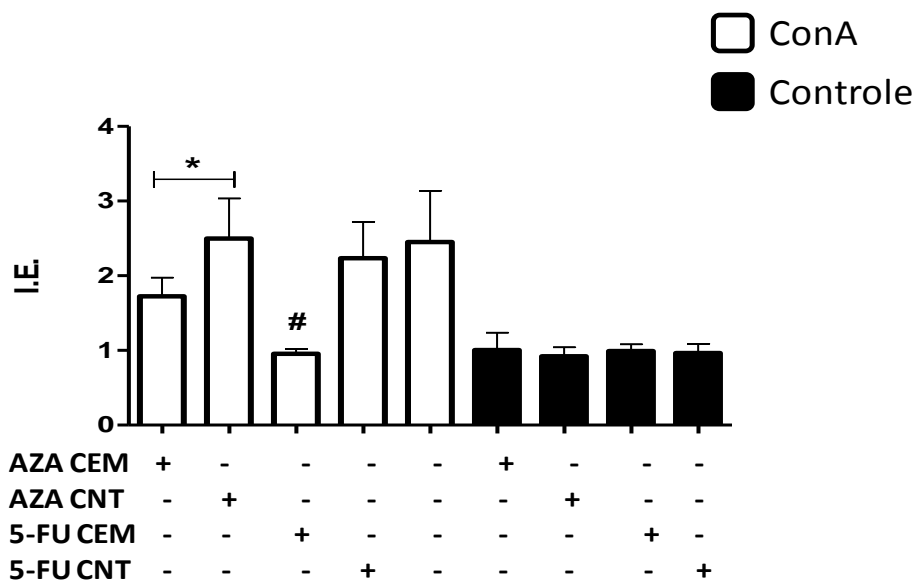


Figura 7 – Efeito de baixas concentrações de 5-FU e AZA sobre proliferação de linfócitos em cultura de 72 horas. Média de 8 avaliações independentes. Dados expressos em Índice de Estimulação (I.E.). (*): 5-FU CEM + ConA vs AZA CEM-ConA, AZA CNT-ConA, 5-FU CNT-ConA e CTRL ConA $p < 0,001$; (#): AZA CEM + ConA VS AZA CNT + ConA $p < 0,05$

Com o objetivo de verificar se baixas concentrações das drogas eram capazes de modular positivamente a atividade linfoproliferativa, linfócitos tratados com as drogas foram mantidos em cultura por 120 horas na ausência de mitógeno, nenhuma diferença significativa foi encontrada sobre a estimulação espontânea dos linfócitos. Figura 8.

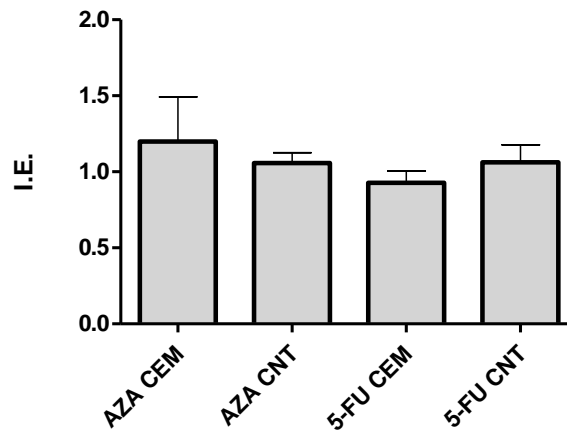


Figura 8 - Proliferação espontânea em cultura de linfócitos de 120 horas. Média de 4 avaliações independentes. Dados expressos em I.E.

6.5. Reação Mista de Linfócitos

A proliferação dos linfócitos foi avaliada frente a apresentação de antígenos por DCs alogênicas. Os linfócitos foram tratados com as drogas nas concentrações pré-estabelecidas 24 horas antes de serem colocados em co-cultura com as DCs.

A Figura 9 representa a distribuição dos grupos em relação às diferentes proporções de linfócitos T e células dendríticas alogênicas. Nossos dados mostram que o tratamento não mostrou efeito tóxico significativo sobre a atividade de linfócitos T alogênicos.

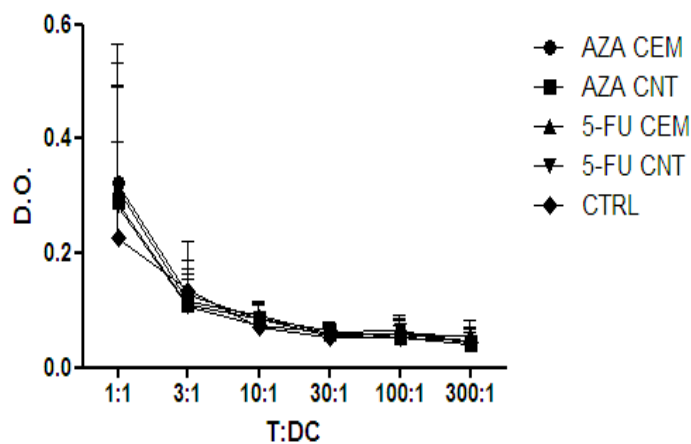


Figura 9 - Reação Mista de Linfócitos. Média de 3 avaliações independentes. Dados expressos em D.O.(Média + DP).

6.6. Quantificação de Citocinas

O sobrenadante das culturas de linfócitos tratados com as drogas nos ensaios de linfoproliferação e citotoxicidade sobre linfócitos foram recolhidos para dosagem da produção de citocinas – IFN- γ e IL-10, através de método de ELISA.

A produção de IL-10 foi analisada em 3 diferentes condições de cultura, as quais correspondem a cultura de linfócitos tratados por 72h com adição de ConA (Figura 10A), cultura de linfócitos de 72h sem mitógeno (Figura 10B) e cultura de 120h de tratamento (Figura 10C). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos e o controle, indicando que a presença da droga não alterou a produção desta citocina.

Quando comparou-se as culturas de linfócitos tratadas na ausência de mitógeno, o tempo de cultura pareceu influenciar a produção de IL-10, visto a redução da quantidade desta citocina detectada, sendo esta menor na cultura de 120h (5dias).

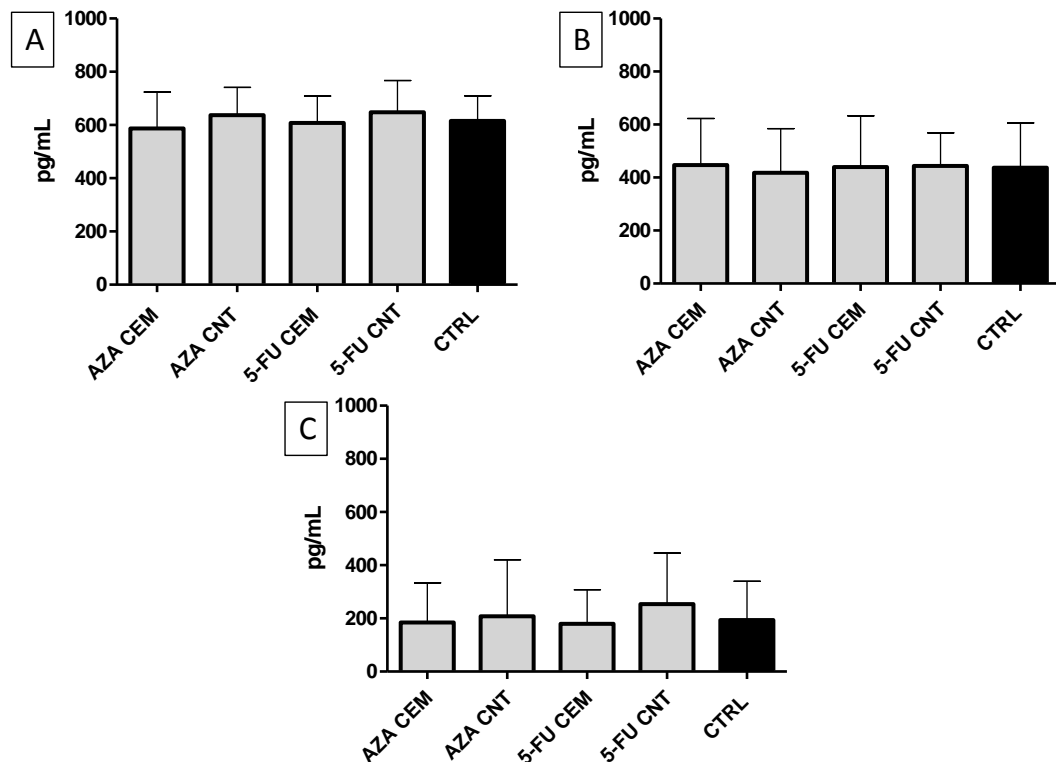


Figura 10 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de cultura de linfócitos: (A) 72 h com mitógeno, (B) 72 h sem mitógeno e (C) de 5 dias sem mitógeno. Dados expressos em pg/mL.

A produção de IFN- γ também foi dosada, uma vez esta citocina é indicativa de atividade de linfócitos TH1 e Tc. Assim como para Il-10, a produção desta citocina foi analisada nas três condições de cultura já descritas. A Figura 11A corresponde a cultura de linfócitos tratados por 72h na presença de ConA, 11B a cultura de linfócitos de 72h sem mitógeno e 11C a cultura de linfócitos de 120h. Da mesma maneira, o tratamento de linfócitos com baixas concentrações de drogas não interfere na capacidade de produção de IFN- γ .

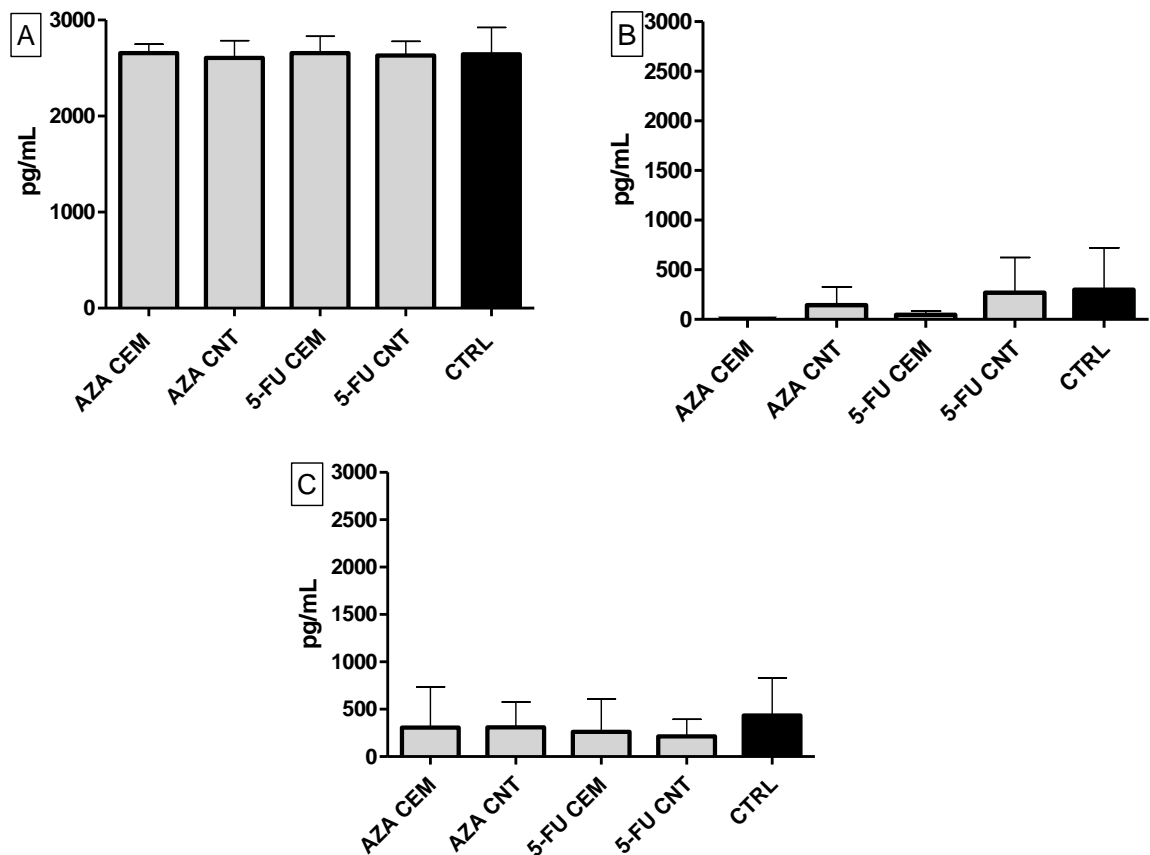


Figura 11 - Quantificação de IFN- γ em cultura de linfócitos tratados com as drogas durante 72 h com ConA (A), 72 h sem ConA (B) e em cultura de 5 dias (C). Dados expressos em pg/mL.

Também foi realizada a dosagem de citocinas a partir do sobrenadante das culturas de ensaio de reação mista de linfócitos (MLR). Os resultados obtidos mostram que houve maior

produção de IL-10 do que de IFN- γ sendo esta citocina produzida em quantidades insignificantes.

A Figura 12 representa a produção de IL-10 nas diferentes proporções Ly: DC, mostrando uma produção maior na proporção de 1:1 e consequente queda gradativa dessa produção, a qual está relacionada a maior proliferação apresentada na Fig. 7 nesta mesma proporção. A produção de IFN- γ ocorreu em níveis inferiores a sensibilidade do teste de ELISA realizado, tendo, portanto, produção insignificante desta citocina.

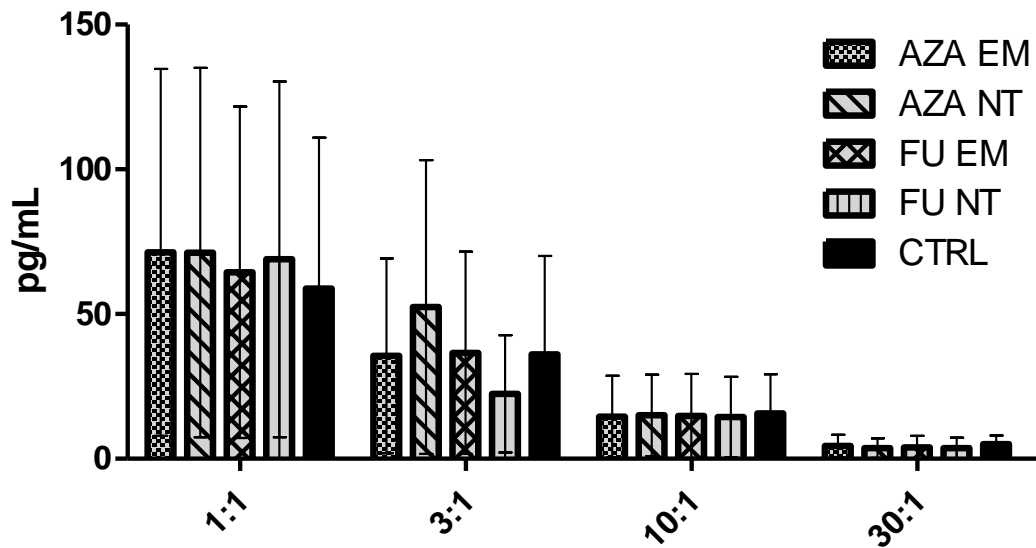


Figura 12 - Quantificação de IL-10 em ensaio de MLR. Dados expressos em pg/mL.

7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo procuramos avaliar se o tratamento de linfócitos humanos com baixas concentrações de agentes antineoplásicos, em concentrações pré-determinadas – CEM e CNT, promove alterações na proliferação e na atividade destas células, que correspondem ao principal mecanismo de defesa do sistema imunológico contra o câncer.

Os resultados, aqui representados, indicam que o tratamento não apresentou efeito tóxico para os linfócitos, não interferindo em sua capacidade de proliferação espontânea, mas na presença de mitógenos, reduziu significativamente o índice de estimulação. Estes achados indicam que a atividade da Concanavalina A foi inibida pela presença da droga, que parece agir sobre o ciclo celular, observando-se ação mais evidente do 5-FU do que da AZA. A avaliação da porcentagem de apoptose por ensaio de Anexina V através de citometria de fluxo mostrou que o tratamento com as concentrações de trabalho de AZA e 5-FU não provocou morte celular significativa quando comparada ao seu controle, indicando ausência de efeito tóxico direto das mesmas sobre as células imunes, como visto no ensaio de citotoxicidade, no qual os linfócitos tratados com as drogas em condições espontâneas mostraram viabilidade celular muito parecida com o controle.

O 5-fluorouracil atua através da inibição da enzima timidilato sintetase, importante na síntese do DNA, sendo seu bloqueio relacionado à morte celular por depleção de timidina (Cohen, S.; 1971). AZA por sua vez, age inibindo a enzima DNA metiltransferase, gerando hipometilações e reativação de genes relacionados à supressão do crescimento celular (Esteller M 2007). Consequentemente ambas atuam influenciando a capacidade proliferativa dos linfócitos quando estes são estimulados com mitógeno.

As concentrações de trabalho de tais drogas foram determinadas sobre células tumorais de câncer colorretal, sendo a concentração efetiva mínima aquela que impede a

proliferação destas células. Como visto sobre células do tumor, a concentração efetiva mínima de 5-FU também apresentou efeitos citostáticos sobre os linfócitos de indivíduos saudáveis, enquanto AZA reduziu a proliferação celular, mas sem apresentar ação citostática, uma vez que a quantidade de células neste grupo foi maior do que encontrada em condições espontâneas.

A estimulação dos linfócitos T alogênicos no ensaio de MLR mostra que as drogas não interferem de modo significativo na resposta proliferativa das células, embora na proporção Ly:DC de 1:1 a quantidade de células tenha sido ligeiramente maior nos grupos tratados com as drogas. Esse achado, embora sem diferença estatisticamente significativa, corrobora observação prévia de que a resposta alogênica pode ser positivamente modulada por baixas concentrações de antineoplásicos (Kaneno et al.2009).

A produção de citocinas também não sofreu influencia do tratamento com as drogas. A produção de Il-10 foi significativamente reduzida após 120h, sendo possível que tal resultado indique degradação da citocina produzida, em virtude do tempo de cultura. Visto que essa produção foi avaliada com o uso de linfócitos “naive”, avaliamos também a produção de citocinas a partir de linfócitos incubados com células dendríticas no ensaio de MLR. Os resultados mostram que, também nessas condições, não há interferência negativa das drogas sobre a função dos linfócitos. Foi possível detectar apenas a produção de IL-10, uma vez que as concentrações de IFN- γ para os tratamentos e o controle foram insignificantes. Tal resultado mostra uma possível supressão da atividade dos linfócitos indicando diferenciação de tais células para um padrão T regulatório. Acreditamos que esta diferenciação se deva à falta de sinais co-estimulatórios das DCs que, apesar de alogênicas, não foram primadas com citocinas ou antígenos tumorais, sendo necessários novos ensaios para confirmar se a tolerância observada é induzida pela presença da droga.

Assim, nossos dados sugerem que o tratamento dos linfócitos com as concentrações efetiva mínima e não tóxica de AZA e 5-FU não demonstrou efeitos deletérios sobre estas células, o que nos permite concluir que a combinação da quimioterapia metronômica com os protocolos vacinação terapêutica com DC, poderiam ser usados para o tratamento do câncer colorretal, com redução dos efeitos colaterais induzidos pela quimioterapia convencional e favorecimento da resposta protetora de células T proporcionado pela injeção de células dendríticas ativadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andre T, de Gramont A. *An overview of adjuvant systemic chemotherapy for coloncancer*. Clin Colorectal Cancer 2004;4 Suppl 1: S22–8.4. McWhinney
2. Bass K. K., Mastrangelo M. J. *Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer*. Cancer Immunol. Immunother. 47, 1998, 1-12.
3. Belardelli F. and Ferrantini M, *Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity*, Trends in Immunology Vol.23, No 4, 2002
4. Berd D., Mastrangelo M.J., Engstrom P.F., Paul A., Maguire H., *Augmentation of the human immune response by cyclophosphamide*. Cancer Res. 42, 1982, 4862-4866.
5. Broncato S. e Miner T. *Surgical management of gastric cancer: review and consideration for total care of the gastric cancer patient*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2008, 11:109-118.
6. Cohen, S. S. *On the nature of thymineless death*. Ann. NY Acad. Sci., 106: 292–301,1971.
7. Conley, B. A., Kaplan, R. S., and Arbusk, S. G. National Cancer Institute Clinical Trials Program in Colorectal Cancer. Cancer Chemother. Pharmacol., 42 (Suppl.):S75–S79, 1998.
8. Esteller M (2007) *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histonemodification maps*. Nat Rev Genet 8: 286–298
9. Ferrari S, Rovati B, Porta C, et al. *Lack of dendritic cell mobilization into the of cancer patients following standard- or high-dose chemotherapy plus granulocyte colony stimulating factor*. Cancer Immunol Immunother 2003;52:359–66.
10. Goldfarb Y. and Ben-Eliyahu S. *Surgery as a risk factor for breast cancer recurrence and metastasis: mediating mechanisms and clinical prophylactic approaches*. Breast Dis. 26, 2006,99-114.
11. Hahnfeldt P, Folkman J, Hlatky L. *Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis*. J Theor Biol 2003;220: 545–54
12. Half E. and N. Alber, *Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention*. Expert Opin Pharmacother, 2009. 10(2): p. 211-9.

13. Hardman, J.G., et al., *Pharmacology: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Vol. 9. 1996.
14. Hoon D.S., Foshag L.J., Nizze A.S., Bohman R., Morton D.L. *Supressor cell activity in a randomized trial of patients receiving specific immunotherapy with melanoma cell vaccine and low dosages of cyclophosphamide*. *Cancer Res.*50, 1990, 5358-5364.
15. Hou J. M., Liu J. Y., Yang L., Zhao X., Tian L., Ding Z. Y., Wen Y. J., Niu T., Xiao F., Lou Y. Y., Tan G. H., deng H. X., Li J., Yang J. L., Mao Y. Q., Kan B., Wu Y., Li Q., Wei Y. Q. *Combination of low-dose gemcitabine and recombinant quail vascular endothelial growth factor receptor-2 as a vaccine induces synergistic antitumor activities*. *Oncology* 69, 2005, 81-87.
16. Issa J. P., Kantarjian H. M., Kirkpatrick P. *Azacitidine*. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):275–276.
17. Jiga LP, Bauer TM, Chuang JJ, et al. *Generation of tolerogenic dendritic cells by treatment with mitomycin C: inhibition of allogeneic T-cell response is mediated by downregulation of ICAM-1, CD80, and CD86*. *Transplantation* 2004;77:1761–4
18. Kaneno R., Shurin G.V., Kaneno F.M., Naiditch H., Luo J., Shurin M. *Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells*. *Cell Oncol.*2011 34:97-106.
19. Kaneno R., Shurin G. V., Tourkova I. L., Shurin M.R., *Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations*. *Journal of Translational Medicine.* 2009, 7:58.
20. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics*. *Br. J. Cancer* 26, 1972, 239-257.
21. Laquente B., Vinals F. and German J. R. *Metronomic chemotherapy: an antiangiogenic scheduling*. *Clin. Transl. Oncol.*9, 2007, 93-98.
22. Mihich E. *Antitumor chemotherapy. Considerations on the potential role of immunity*. *Pathol. Biol.* 15, 1967, 209-214.
23. Mihich E. *New leads in cancer therapeutics: a keynote address*. *Medicine (B Aires)* 60 Suppl 2, 2000a, 4-8.
24. Mihich E. *On the immunomodulating effects of anti-cancer drugs and their therapeutic exploitation*. *Jpn J. Clin. Oncol* 30, 2000b, 469-471.
25. Moschella F, 8.Proietti E, Capone I, et al. *Combination strategies for enhancing the efficacy of immunotherapy in cancer patients*. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1194:169–7

26. Nakashima H, Tasaki A, Kubo M, et al. *Effects of docetaxel on antigen presentation-related functions of human monocyte-derived dendritic cells*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55: 479–87.
27. Noordhuis, P., et al., *5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers*. *Ann Oncol*, 2004. **15**(7): p. 1025-32.
28. Nowak, A.K., et al., *Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(10), 4905-13
29. Nowak A. K., Lake R. A., Robinson B. W. S. *Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: Improving vaccines?*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 2006, 975-990.
30. Nowak A. K., Robinson B. W., Lake R. A. *Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implication for combination chemo-immunotherapy*. *Cancer Res.* 62, 2002, 2353-2358.
31. Page G.G. *Surgery-induced immunosuppression and postoperative pain management*. *AACN Clin. Issues* 16, 2005, 302-309; quiz 416-308.
32. Pettersen H. S., Visnes T., Vagbø C. B., Svaasand E. K., Doseth B., Slupphaug G., Kavli B. and Krokan H. E. *UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation*. *Nucleic Acids Research*, 2011, 1–15.
33. Pratesi G., Petrangolini G., Tortoreto M., Addis A., Belluco S., Rossini A., Selleri S., Rumio C., Menard S., Balsari A. *Therapeutic synergism of gemcitabine and CpG-oligodeoxynucleotides in an orthotopic human pancreatic carcinoma xenograft*. *Cancer Res.* 65, 2005, 6388-6393.
34. Saltz, L.B. and N.E. Kemeny, *Adjuvant Chemotherapy of Colorectal Cancer*. *Oncologist*, 1996. **1**(1 & 2): p. 22-29.
35. Shakhhar G. and Ben-Eliyahu S. *Potential prophylactic measures against postoperative immunosuppression: could they reduce recurrence rate in oncological patients?* *Ann Surg Oncol* 10, 2003, 972-992.
36. Shurin G.V., A.N., Shurin M.R., *Cancer Therapy and Dendritic Cell Immunomodulation*, in *Dendritic Cells in Cancer*, M.R.S.a.R.D. Salter, Editor. 2009, Springer: NY. p. 201-216.
37. Shurin G.V., Tourkova I.L., Kaneno R., Shurin M.R. *Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism*. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 137-144.

38. Shurin MR, Naiditch H, Gutkin DW, et al. *Chemoimmunomodulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents*. *Curr Med Chem*, 2012 19:1792–803.
39. Suzuki E., Kapoor V., Jassar A. S., Kaiser L. P., Albelda S. M. *Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity*. *Clin. Cancer Res.* 11, 2005, 6713-6721.
40. Turk J. L. Parker D., *Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms*. *Immunol. Rev.* 65, 1982, 99-113.
41. Van der Wilt CL, Peters GJ. *New targets for pyrimidine antimetabolites in the treatment of solid tumours: thymidylate synthase*. *Pharm World Sci* 1994 ; 84 – 103.
42. Veltman JD, Lambers ME, van Nimwegen M, et al. *Low-dose cyclophosphamide synergizes with dendritic cell-based immunotherapy in antitumor activity*. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:798467.

ANEXO**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, _____,

RG nº _____, **telefone (opcional):** _____,

residente à _____

_____,

fui informado(a) sobre a realização da pesquisa “ **Efeito de baixas concentrações de agentes antineoplásicos sobre linfócitos humanos de sangue periférico**”. Entendi que os pesquisadores querem testar o efeito de uma proteína bacteriana sobre células de defesa do organismo, com o objetivo avaliar se ela poderá ser usada para melhorar a resposta imunológica contra o câncer. Entendi também que para o desenvolvimento desse estudo é necessário colher 20 mL de sangue para separar as células brancas (leucócitos), uma parte do sangue circulante que pode ser removida, sem prejuízo para o doador.

Consentindo em participar, estou ciente de que as células brancas do meu sangue serão usadas para a realização de culturas celulares. Compreendi que a quantidade de sangue que vou doar (20 mL) não me trará nenhum risco 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 de terapias antitumorais, beneficiando outras pessoas no futuro.

O trabalho será coordenado pelo **Prof. Dr. Ramon Kaneno**, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, que será auxiliado pelas alunas do Curso de Ciências Biomédicas do Instituto de Biociências de Botucatu, **Victoria Elizabeth Galvão**, RG:48.465.990-x CPF: 395.422.998-69, **Fabiana Albani Zambuzi**, CPF: 388.305.188-83 e **Cecília Pessoa Rodrigues**, CPF: 409.585.758-78 e pela

aluna de doutorado do Laboratório de Imunologia de Tumores **Marcela Rodrigues de Camargo**, RG: 32.435.144-6 CPF: 309.427.718-77.

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 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

Colaboradora

UNESP