

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL**

**REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E MODULAÇÃO
MICROAMBIENTAL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A
MODELO DE ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

ANDERSON AMARO MELO DOS SANTOS

**São Paulo
2018**

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL**

**REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E MODULAÇÃO
MICROAMBIENTAL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A
MODELO DE ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

ANDERSON AMARO MELO DOS SANTOS

**São Paulo
2018**

Santos, Anderson Amaro Melo dos.

Redução do crescimento tumoral e modulação microambiental em camundongos submetidos a modelo de esquizofrenia / Anderson Amaro Melo dos Santos. - 2018.

29 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Biologia da diferenciação e transformação celular.
Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

ANDERSON AMARO MELO DOS SANTOS

**REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E MODULAÇÃO
MICROAMBIENTAL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE
ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Isaltino Marcelo Conceição
Universidade Metodista de São Paulo - UMEP

Profa. Dra. Eliana Aparecida Perrone
Universidade Paulista - UNIP

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista - UNIP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Aderson e Marinete, e à vida, por todo acompanhamento, suporte e confiança nesta jornada. Sem eles, evidentemente, nada teria sido possível.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Aderson e Marinete, e às minhas irmãs, Tatiane e Elaine, fontes de inspiração que sempre apoiam minhas escolhas e asseguram o suporte necessário.

À minha família que está sempre presente, incentivando e apoiando nossas decisões.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Guilherme Xavier, pela confiança depositada, empenho, paciência, amizade e determinação na condução deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Regina Kleeb, pela amizade, confiança, ensinamentos e por me apresentar efetivamente ao mundo da pesquisa científica, possibilitando que tudo isso pudesse ocorrer.

Aos amigos, Eliziéle Paroli, Eduardo Sampaio e Luiz Fabio Dimov, pelo incentivo, companheirismo e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos amigos das cadeiras da universidade, Amanda Matrai, Jéssica Albano e Rodrigo Veroneze, por estarem ao meu lado, sempre apoiando e incentivando os nossos interesses.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental - UNIP, Vanessa Xavier e Renato Piccolo, por tornarem essa jornada muito mais leve.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental – UNIP.

Aos camundongos, fontes da obtenção dos dados deste trabalho.

À Universidade Paulista – UNIP, pela bolsa oferecida e disponibilização de suas instalações, laboratórios e estrutura geral, essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigado!

Tumoral growth reduction and microenvironmental modulation in mice submitted to a model of schizophrenia

Redução do crescimento tumoral e modulação microambiental em camundongos submetidos a modelo de esquizofrenia

Anderson Amaro Melo dos SANTOS¹; LIVIA Davoglio GARCIA²; Thalita Mirele de Souza e SILVA²; Rodrigo Tavares NIEMAN²; Silvia Regina KLEEB²; José Guilherme XAVIER^{1,2}

¹ Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, Avenida José Maria Whitaker 290, Vila Clementino, São Paulo, SP, 04057-000, Brasil. Pesquisa de mestrado.

² Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metodista de São Paulo, Avenida Dom Jaime de Barros Câmara 1000, Planalto, São Bernardo do Campo, São Paulo, SP, Brasil.

Abstract

Schizophrenia is a psychiatric disorder of multifactorial origin, which affects about 1% of the world population. Epidemiological studies indicate a lower incidence of cancer in schizophrenic patients. In addition to an important genetic component, environmental aspects are related to the onset of the condition, and maternal infection during pregnancy is one of the risk factors. In this study the tumor growth was evaluated in animals submitted or not to the murine model of schizophrenia, based on the permanent influence of prenatal infection on the offspring of mice, in a period with effects that simulate schizophrenia. The parameters evaluated were neoplastic volume, histopathology, tumor proliferative activity, vascularization, extracellular matrix and expression of COX-2 by infiltrating leukocytes. Progenies of swiss mice were used, totalizing 54 animals, males and females. The matrices were or were not inoculated on the ninth day of pregnancy with Poly-I: C. At 2 months of age, their progenies received subcutaneously suspension containing 5.0×10^6 Ehrlich tumor cells. After 30 days of inoculation the tumors were excised, measured and submitted to histological, histochemical and immunohistochemical evaluation. There was a statistically significant difference regarding the tumor volume, but no difference in the proliferative activity of the cells. Tumors were present in animals of the experimental group, on average, with a higher microvascular density, higher deposition of extracellular matrix and lower expression of COX-2. These findings corroborate the reports of restriction to tumor growth in schizophrenic patients, reinforcing the action of Poli-I: C on the ninth day of pregnancy as a model of this psychiatric disorder. Particularly changes in the amount and pattern of deposition of extracellular matrix elements may alter the mechanical interactions and potentially the

gene expression in this microenvironment, interfering with cell signaling and tumor evolution. Also, the inflammatory response shows signs of modulation, with a lower leukocyte expression of COX-2 in the tumor microenvironment of the experimental group, potentially interfering in tumor cell survival. Finally, the presence of alterations in the composition of the extracellular matrix in brain regions in the schizophrenic patient deserve mention, suggesting an active participation of the extracellular matrix in the modulation of different processes in the schizophrenic patient.

Keywords: Ehrlich tumor; Schizophrenia; Tumor microenvironment; Extracellular matrix.

Resumo

A esquizofrenia é uma desordem psiquiátrica de origem multifatorial, que acomete cerca de 1% da população mundial. Estudos epidemiológicos indicam menor incidência de câncer em pacientes esquizofrênicos. Além de um importante componente genético, aspectos ambientais estão relacionados ao aparecimento da condição, sendo a infecção materna durante a prenhez um dos fatores de risco. Neste estudo foi avaliado o crescimento tumoral em animais submetidos ou não a modelo murino de esquizofrenia, fundamentado na influência permanente de infecção pré-natal sobre a prole de camundongos, em um período com efeitos que simulam a esquizofrenia. Os parâmetros avaliados foram o volume neoplásico, histopatologia, atividade proliferativa tumoral, vascularização, matriz extracelular e expressão de COX-2 por leucócitos infiltrantes. Foram utilizadas as progênies de camundongos Swiss, totalizando 54 animais, machos e fêmeas. As matrizes foram inoculadas ou não ao nono dia de prenhez com Poli-I:C. Aos 2 meses de idade suas progênies receberam subcutaneamente suspensão contendo $5,0 \times 10^6$ células do tumor de Ehrlich. Após 30 dias de inoculação, os tumores foram excisionados, mensurados e submetidos à avaliação histológica, histoquímica e imuno-histoquímica. Houve diferença estatisticamente significante relativa ao volume tumoral, porém sem diferença quanto à atividade proliferativa de suas células, sendo os tumores presentes em animais do grupo experimental em média menores, com maior densidade microvascular, maior deposição de matriz extracelular e menor expressão de COX-2. Tais achados corroboram os relatos de restrição ao crescimento tumoral em pacientes esquizofrênicos, reforçando a ação do Poli-I:C no nono dia de prenhez como modelo desse transtorno psiquiátrico. Particularmente as alterações na quantidade e padrão de deposição de elementos da matriz extracelular podem alterar as interações mecânicas e potencialmente a expressão gênica nesse microambiente, interferindo na sinalização celular e na evolução tumoral. Também a resposta inflamatória apresenta sinais de modulação, com uma menor expressão leucocitária de COX-2 no microambiente tumoral no grupo experimental, potencialmente interferindo na sobrevida das células tumorais. Por fim, merece referência a presença de alterações

também na composição da matriz extracelular em regiões encefálicas no paciente esquizofrênico, sugerindo uma participação ativa da matriz extracelular na modulação de diferentes processos no paciente esquizofrênico.

Palavras-chave: Tumor de Ehrlich; Esquizofrenia; Microambiente tumoral; Matriz extracelular.

INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma desordem psiquiátrica de origem multifatorial, que acomete de 0,5 a 1% da população mundial (OS et al., 2010). Além de um importante componente genético, aspectos ambientais estão relacionados ao aparecimento da condição (TSUANG; FARAONE, 1995). Um dos fatores de risco é a infecção materna durante a prenhez (BARR et al 1990; OZAWA et al., 2006). Tal condição pode ser simulada pela administração pré-natal de Poli-I:C a camundongos prenhes no nono dia pós-concepção, resultando em déficit comportamental na progênie adulta, de maneira similar ao identificado na esquizofrenia (GEYER; MOGHADDAM, 2002; ASHDOWN et al., 2006). Alterações morfológicas cerebrais também acompanham a exposição a citocinas durante a vida fetal, determinando a redução no desenvolvimento de dendritos neuronais, à semelhança do observado na esquizofrenia (GILMORE et al., 2004). Estudos indicam que essa é uma ação indireta, possivelmente relacionada à elevação nos níveis de IL-1 e consequente redução de outras citocinas, como IGF-1. Esta, por sua vez, é reconhecida indutora de proliferação neuronal e diferenciação no cérebro fetal, além de relacionar-se positivamente a incidência do câncer (FAN et al., 1996; AJO et al., 2003). Nesse sentido, estudos relativos à possível repercussão permanente dessas condições sobre a progênie são de potencial interesse na saúde pública. Estudos dessa natureza são escassos, em particular relacionando tais eventos a modificações na evolução de neoplasias.

Estudos epidemiológicos evidenciam uma menor incidência de neoplasias em pacientes esquizofrênicos em comparação à incidência média na população (BARAK et al., 2005). Jablensky (2001) descreve que vários estudos relataram reduções na ocorrência de neoplasias malignas em pacientes esquizofrênicos, em especial o câncer de pulmão. Hippisley-Cox et al. (2007) observaram que pacientes com esquizofrenia têm um risco significativamente maior de câncer de cólon e um menor risco de câncer respiratório em comparação a pacientes sem esquizofrenia.

No presente estudo, visa-se avaliar a relação entre esquizofrenia, o desenvolvimento tumoral e seu microambiente, comparando-se o processo em camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida, submetidos ou não a modelo de esquizofrenia, com especial interesse na participação do microambiente tumoral. Este tem sido identificado como um elemento fundamental na progressão tumoral, constituído pelos elementos não-transformados na área neoplásica, como os componentes do sistema imune, vasos sanguíneos, fibroblastos, miofibroblastos, células tronco mesenquimais, adipócitos e matriz extracelular (PARK et al, 2015). Nesse contexto, a resposta inflamatória crônica, presente em pacientes esquizofrênicos e no tecido neoplásico, também se apresenta como um potencial modulador do processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de São Paulo, sob os protocolos 98/2012 e 41/2013.

Animais:

Foram utilizados 62 camundongos Swiss, sendo 2 padreadores, 6 matrizes, e as respectivas progêñies (54 animais), envolvendo machos e fêmeas, recebendo água e alimento *ad libitum* durante todo o procedimento experimental, mantidos no Biotério da Universidade Metodista de São Paulo. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e sistema de exaustão e ciclo de 12 horas de claro e escuro, sendo a luz acesa às 7h. Os animais foram divididos em dois grupos: experimental e controle.

Para o início do procedimento, fêmeas foram colocadas com machos (2x1) até a inferência da detecção da prenhez. Esta foi realizada no início da manhã (entre 7h e 8h), por meio de lavado vaginal efetuado com a introdução de uma pipeta plástica contendo salina (cloreto de sódio 0,9%) na vagina do camundongo fêmea, sendo feita a colheita da secreção vaginal. Procedeu-se a extensão deste conteúdo em lâmina de vidro. Observando o microscópio óptico, buscaram-se espermatozoides junto ao material biológico da fêmea. Na presença dos espermatozoides, considerou-se como dia de gestação (GD) 0 daquela fêmea (LEITE et al., 2002). Para a formação do grupo experimental, fêmeas foram inoculadas intravenosamente com Poli-I:C (ácido poli-inosínico-policitidílico, Sigma®) na dose de 5 mg/kg no nono dia de prenhez, e sua progênie a recebeu aos 2 meses de idade. Igualmente, os animais gerados por fêmeas não manipuladas durante a prenhez (grupo controle) receberam suspensão de 0,1ml contendo $5,0 \times 10^6$ células do tumor de Ehrlich em subcutâneo na região cervical dorsal (OZAWA et al., 2006; MEYER et al., 2008; WINTER et al., 2009). Os animais foram eutanasiados e necropsiados 30 dias pós-inóculo de células tumorais. Foram excluídos do experimento os animais nos quais houve a ulceração do tumor.

Avaliação macroscópica

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e na sequência foram colhidos fragmentos de pele da região inoculada com tumor. Para a determinação do volume tumoral, foi utilizado paquímetro, aplicando-se a fórmula: $v = 4/3\pi[(d_1+d_2)4]$; onde d₁ e d₂ são diâmetros perpendiculares.

Avaliação histológica:

Após a avaliação macroscópica, os tecidos foram submetidos à fixação em solução de formol a 10%, seguindo o processamento histológico de rotina e corando os cortes de 5µm pela hematoxilina/eosina.

Avaliação histoquímica:

Complementarmente, avaliou-se a matriz extracelular do tecido tumoral em cortes corados com os métodos tricrômico de Masson, Gordon & Sweets e Verhoeff.

Avaliação imuno-histoquímica:

Anticorpos:

Anticorpos monoclonais de camundongo anti-humano para-PCNA, clone PC10 (DAKO); e para COX-2, clone SP21 (Spring), e anticorpo policlonal de coelho anti-humano fator VIII, clone A0082 (DAKO).

O procedimento seguiu a metodologia descrita por Hsu et al (1981). Cortes histológicos de 4 µm foram dispostos em lâminas e submetidos à recuperação antigênica pelo calor em panela de pressão, contendo solução tampão de citrato de sódio a 0,01M, pH 6,5, bloqueio da peroxidase endógena, incubação com o anticorpo primário em câmara úmida por 12h a 4°C. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário e complexo estreptavidina-peroxidase (Advance-HRP, DAKO) e revelação com diaminobenzidina.

Avaliação quantitativa da expressão de PCNA

Cada formação tumoral teve sua expressão de PCNA quantificada através da contagem de 1000 células neoplásicas da lesão, observadas em ao menos quatro campos distintos, sob a objetiva de 40x. Os resultados obtidos na análise quantitativa foram submetidos à avaliação estatística com a utilização do teste t de Student.

Morfometria vascular

A vascularização foi quantificada utilizando a contagem de estruturas vasculares positivas para fator VIII em 10 campos de grande aumento (CGA), em cada caso, avaliando-se 3 casos do grupo controle e 5 do grupo experimental. Foram evitadas áreas francamente necróticas e territórios periféricos, limítrofes ao crescimento neoplásico. Os campos foram capturados por câmera Motic acoplada ao microscópio Nikon E200, realizando a contagem de estruturas vasculares em cada um deles para calcular em sequência a média e desvio padrão para cada grupo. Os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo o teste t não pareado em relação ao crescimento tumoral e o teste de Mann-Whitney para a vascularização.

Quantificação da expressão de COX-2

A expressão de COX-2 foi quantificada contando-se o número de células leucocitárias positivas em 4 campos de grande aumento em áreas periféricas de crescimento tumoral. Os resultados foram submetidos à análise estatística com o emprego do teste t de Student não pareado.

RESULTADOS

Os resultados do desenvolvimento do tumor experimental de Ehrlich nos grupos podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Média e desvio padrão do volume tumoral em camundongos dos grupos controle e experimental ($p<0,05$, teste t não pareado).

Grupo	Animais	Média de Volume Tumoral (mm^3) ± Desvio Padrão
Controle	33	185+-182
Experimental	21	96+-78
Total	54	

Pode-se observar uma diferença estatisticamente significante concernente ao volume entre os tumores presentes em animais do grupo experimental em relação aos do grupo controle nos quais as formações em geral atingiram maiores dimensões ($p<0,05$, teste t não pareado).

O gráfico a seguir evidencia maior volume tumoral em camundongos do grupo controle, representado em azul, quando comparados aos animais do grupo experimental, representado em vermelho (Figura 1).

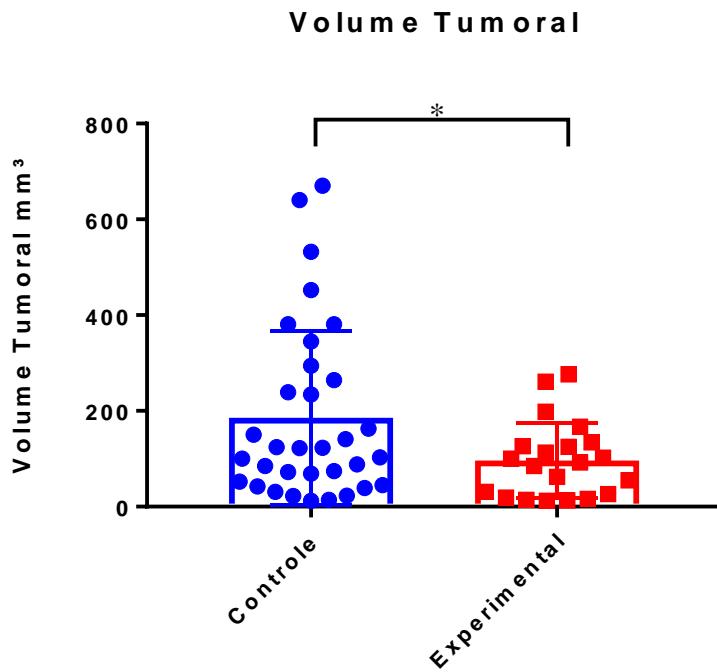


Figura 1. Volume tumoral em camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida pertencente aos grupos controle, representados em azul, e experimental, representados em vermelho. Dados apresentados como média ± desvio padrão ($p<0,05$, teste t não pareado).

O tumor de Ehrlich se desenvolveu como massa sólida na derme de região dorsal dos animais, com características de neoplasia extremamente maligna, exibindo elevado pleomorfismo, com população epitelial anaplásica disposta solidamente, apresentando extensa invasão de territórios adjacentes. Nos animais do grupo controle, evidenciou-se elevada densidade celular, nos quais se constituíram tapetes (Figura 2a). Nos camundongos do grupo experimental, foram frequentes as áreas necróticas intercaladas a focos de expansão neoplásica (Figura 3a). Aumento de relação núcleo/citoplasma, anisocariose, macronucléolos, células gigantes multinucleadas e mitoses aberrantes foram mais frequentes e intensas no grupo experimental (Figura 3b). No entanto, não houve diferença estatística entre a atividade proliferativa das células neoplásicas, sendo superior a 90% em ambos os grupos. Por outro lado, foram identificadas divergências microambientais entre eles. Assim, no microambiente neoplásico de animais do grupo experimental foi observada uma maior densidade microvascular ($p<0,05$, Mann-Whitney) (Tabela 2).

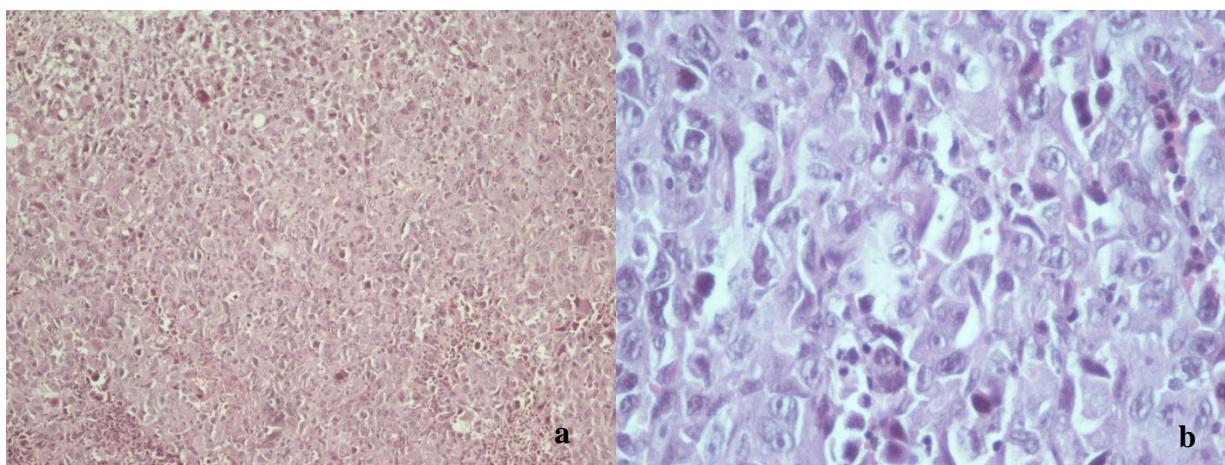


Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico do tumor de Ehrlich na forma sólida em animais do grupo controle, observando em “a” a visão panorâmica do tecido neoplásico, H&E, 10x. Em “b”, detalhe da imagem anterior, há evidência do pleomorfismo celular, H&E, 40x.

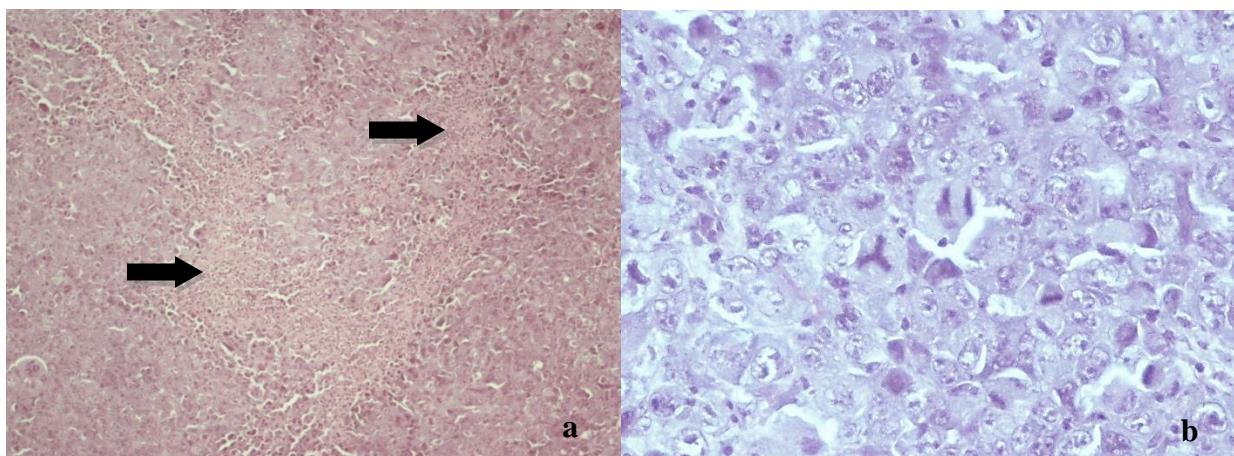


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico do tumor de Ehrlich na forma sólida em animais submetidos a modelo de esquizofrenia. Em “a”, observa-se o tecido neoplásico com múltiplas áreas necróticas (setas), H&E, 10x. Em “b”, detalhe de intenso pleomorfismo celular associado a incremento mitótico com atipias, H&E, 40x.

Tabela 2. Densidade microvascular tumoral expressa pelo número de vasos por campo de grande aumento em animais portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida, dos grupos controle e experimental, com diferença estatisticamente significante entre os grupos, $p \leq 0,05$, teste Mann-Whitney.

Grupo	Média vasos/CGA ± Desvio Padrão
Controle	$6,57 \pm 0,45$
Experimental	$10,64 \pm 3$

Em relação à matriz extracelular, foi verificada a presença de delicada trama de fibras reticulares que compõem o interstício neoplásico em animais do grupo controle (Figura 4a), com maior espessamento e espaçamento de fibras no estroma tumoral de camundongos do grupo experimental, constituindo alvéolos (Figura 4b). Também se mostrou distinta a quantidade de colágeno depositada, sendo evidenciado o incremento no microambiente tumoral de animais do grupo experimental (Figura 5). Não foi identificada diferença em relação à distribuição de fibras elásticas no tecido neoplásico entre os grupos examinados.

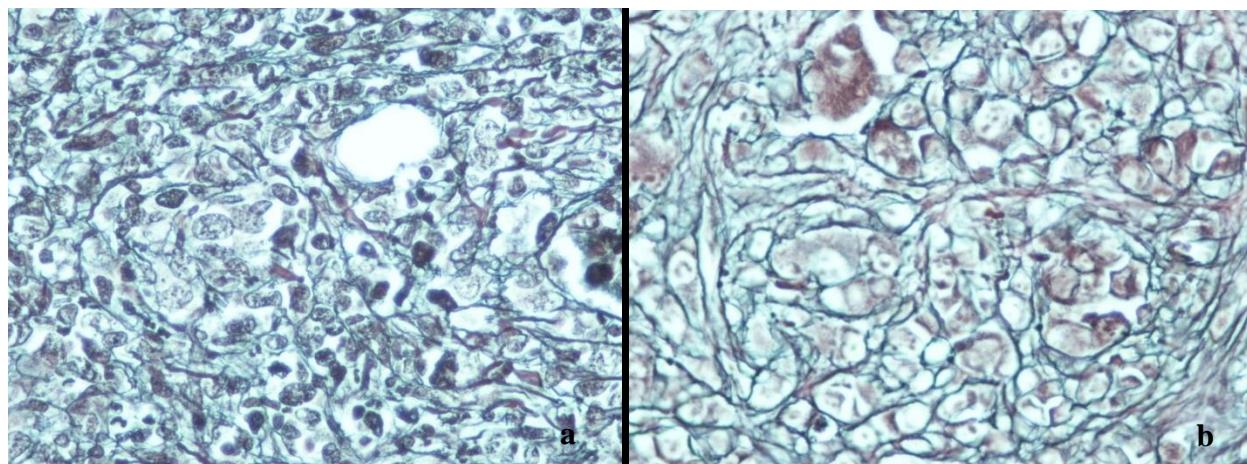


Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico do tumor de Ehrlich na forma sólida. Em “a”, animal do grupo controle, apresentando estroma constituído por fibras reticulares, delimitando lojas e canais estreitos, reticulina, 10x. Em “b”, tumor em animal submetido a modelo de esquizofrenia, apresentando estroma reticular composto por fibras espessas, o que delimita nichos ou alvéolos, H&E, 40x.

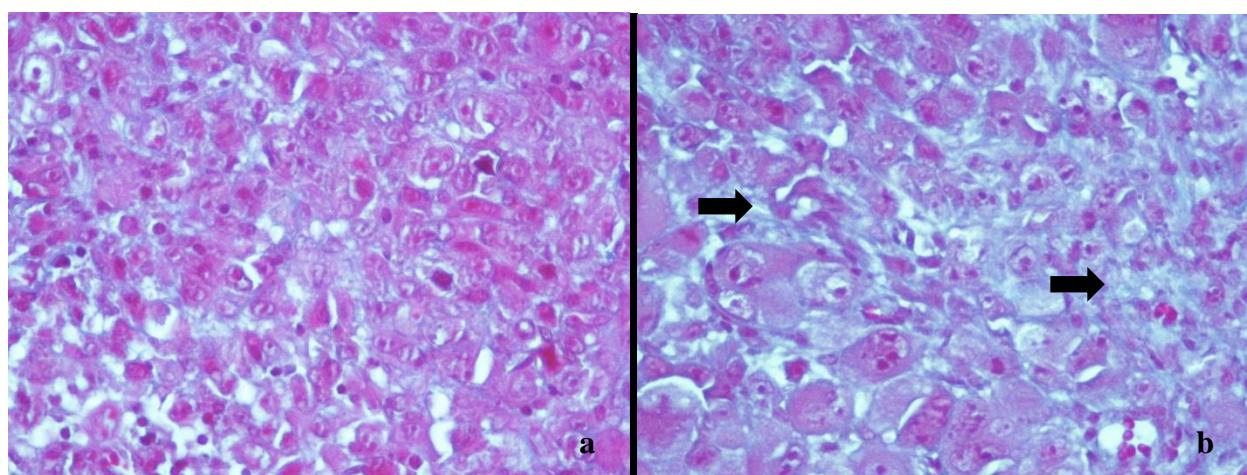


Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico do tumor de Ehrlich na forma sólida. Em “a”, animal do grupo controle apresentando escasso estroma colagênico, Tricrômico de Masson, 40x; Em “b”, tumor exibe denso estroma colagênico corado em azul (setas), Tricrômico de Masson, 40x.

Particularmente nas áreas periféricas do tumor, foi identificado importante infiltrado leucocitário predominantemente linfoplasmocítico em animais de ambos os grupos. Avaliando-se a expressão local de COX-2 (Figuras 6 e 7), foram observadas a ausência de expressão nas células neoplásicas e a maior extensão e intensidade de marcação em leucócitos, infiltrando o tecido neoplásico de camundongos do grupo controle ($p<0,05$, teste t não pareado).

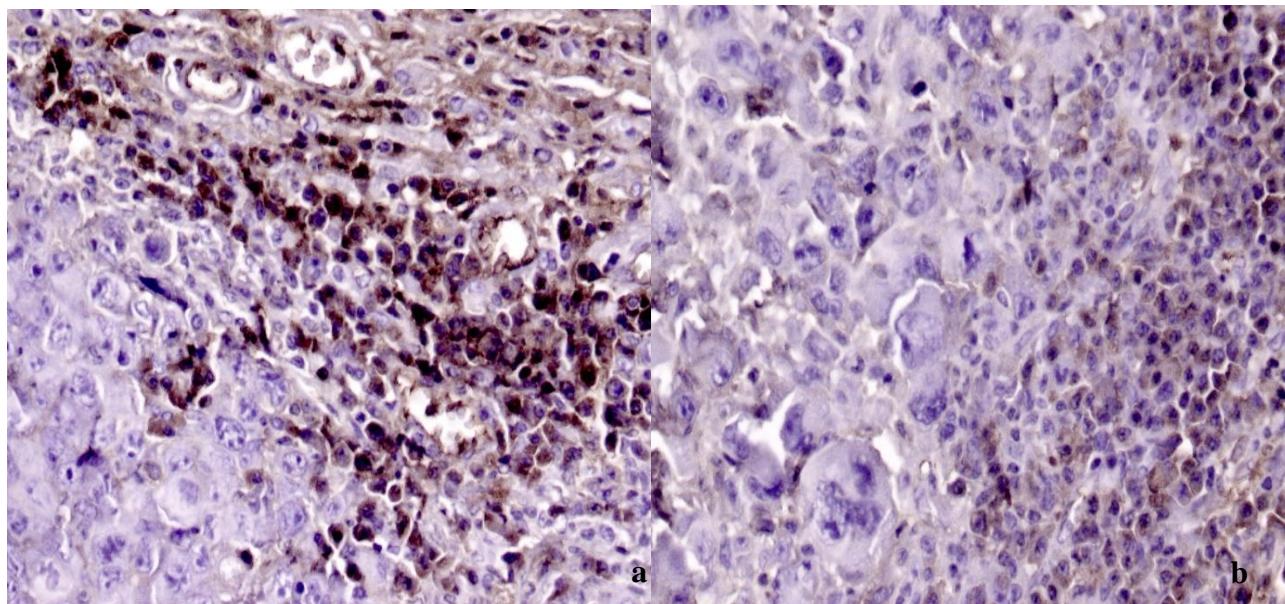


Figura 6. Fotomicrografia de corte histológico de tecido tumoral de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida, evidenciando a imunopositividade para COX-2 em leucócitos infiltrantes, em animais dos grupos controle (a) e experimental (b), com maior expressão no primeiro, 40x, ADVANCE-HRP contra corado com hematoxilina de Harris.

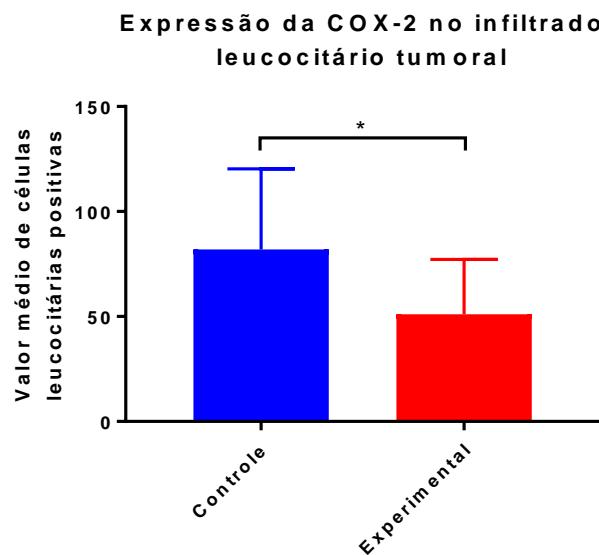


Figura 7. Expressão da COX-2 no infiltrado leucocitário do tumor de Ehrlich na forma sólida pertencente aos grupos controle e experimental ($p<0,05$, teste t não pareado).

DISCUSSÃO

A proposta deste estudo foi verificar o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em modelo animal de esquizofrenia. Partindo do pressuposto de uma possível redução no risco de doença neoplásica em pacientes esquizofrênicos (BARAK et. al., 2005), optou-se pelo emprego de camundongos heterogênicos no sentido de aumentar a variabilidade genética da amostra, simulando uma variabilidade naturalmente observada em populações. Conforme o esperado, ao combinar a heterogeneidade genética dos camundongos com a diversidade gênica presente em uma neoplasia indiferenciada, como o tumor de Ehrlich, uma grande variação foi identificada em relação ao ritmo de crescimento neoplásico entre os animais avaliados, mas ainda assim com uma redução estatisticamente significante no crescimento tumoral em animais submetidos ao modelo de esquizofrenia (Tabela 1).

Dentre os diversos modelos experimentais de esquizofrenia, estão aqueles vinculados a estímulos pré-natais estabelecidos sobre a fêmea prenhe, o que induz a um incremento na liberação de citocinas e modula o desenvolvimento e a atividade do sistema nervoso central, proporcionando modificações permanentes na progênie. Nesse sentido, a exposição ao Poli-I:C no nono dia de prenhez apresenta uma ação indireta, possivelmente relacionada à elevação nos níveis de IL-1 e consequente redução de outras citocinas, como IGF-1. Esta, por sua vez, é reconhecida indutora de proliferação neuronal e diferenciação no cérebro fetal, além de relacionar-se positivamente à incidência do câncer (FAN et al., 1996; AJO et al., 2003). Embora não tenhamos optado pela averiguação de alterações morfológicas no sistema nervoso central nem pela mensuração dos níveis dopaminérgicos na progênie, alterações caracterizadas anteriormente quando do estabelecimento do modelo (MEYER et al., 2008), nossos achados sugerem a existência de uma alteração no padrão de desenvolvimento tumoral análoga à referida em literatura em pacientes esquizofrênicos, com comprometimento do desenvolvimento neoplásico.

Uma redução na atividade proliferativa das células tumorais poderia ser um dos fatores responsáveis pelo comprometimento no crescimento tumoral. Essa possibilidade foi testada com a imunomarcação para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), porém sem diferença estatisticamente significante entre os grupos. Esta é uma proteína associada à síntese de DNA, funcionando como um cofator da DNA polimerase- δ , sintetizada entre as fases G1 e S do ciclo celular, apresentando expressão intimamente relacionada à proliferação celular (BRAVO & MACDONALD-BRAVO, 1987). A maioria das células nas fases G0 e G1 do ciclo celular não expressam quantidades significativas de PCNA, fato que ocorre no fim de G1, e em células nas fases S e G2/M (GORCZYCA et al., 1993). Anticorpos monoclonais anti-PCNA têm sido utilizados na distinção entre neoplasias

benignas e malignas e no estabelecimento de prognóstico em casos de mastocitomas e em neoplasias mamárias caninas (SEGUIN et al., 2006. KUMARAGURUPARAN et al., 2006). O elevado percentual de positividade identificado nas amostras testadas reflete não apenas o grande envolvimento dessa população neoplásica com a atividade proliferativa, mas também a extensa meia vida da proteína e a influência da fixação do tecido com aldeídos (BRAVO & MACDONALD-BRAVO 1987).

Os mecanismos envolvidos na redução do desenvolvimento tumoral na esquizofrenia permanecem parcialmente compreendidos, sugerindo que o incremento da atividade dopaminérgica em pacientes esquizofrênicos e a atividade inibitória da dopamina sobre a angiogênese tumoral relacionem-se a esse efeito (SARKAR et al., 2008). Também a migração de células precursoras endoteliais, a partir da medula óssea para o tecido neoplásico parece ser antagonizada pela dopamina via inibição da expressão de metaloproteinase 9 (CHAKROBORTY et al., 2008). No entanto, em nossas amostras foi caracterizada uma maior densidade microvascular no microambiente neoplásico em animais do grupo experimental (Tabela 2). Uma explicação possível para esse evento se relaciona à dinâmica do crescimento tumoral. O evento angiogênico caracterizado após 30 dias de desenvolvimento tumoral pode representar um mecanismo adaptativo, compensatório à inibição inicial, decorrendo da utilização de vias metabólicas alternativas (CONLEY et al., 2012). Como exemplo, o emprego de bloqueadores de receptores para VEGF determina uma hiperexpressão de PIGF, membro da família de VEGF, gerando uma atividade angiogênica compensatória (TAYLOR et al., 2003).

Paradoxalmente, estudos evidenciam efeito inibitório ao crescimento tumoral secundário em bloqueio de receptores dopaminérgicos e a presença de potencial quimiotático da dopamina sobre células tumorais em modelo de carcinoma mamário (DRELL et al., 2003).

Compreendendo-se o desenvolvimento neoplásico como um processo heterotípico, que envolve uma relação recíproca entre parênquima e estroma, com modulações funcionais exercidas em ambos os sentidos, essa estruturação estromal distinta do grupo experimental pode ser tanto causa como efeito de uma progressão tumoral alterada (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A composição da matriz extracelular é fundamental na regulação da atividade celular, e, à medida que a neoplasia progride, o microambiente coevolui em um estado ativado por meio de comunicação paracrina contínua, criando uma circuitaria sinalizadora dinâmica. Os elementos estromais são parte desse processo, envolvendo fibroblastos, células endoteliais, pericitos, leucócitos e a matriz extracelular (PIETRAS; ÖSTMAN, 2010). Nesse sentido, a quantidade e padrão de organização das fibras colágenas são fatores determinantes no processo de invasão e metastatização, envolvendo sua ligação a integrinas celulares (LEVENTAL et al., 2009). O incremento colagênico associado à alteração na disposição espacial das

células neoplásicas no grupo experimental pode estar relacionado à redução na expressão de metaloproteinases no paciente esquizofrênico referida anteriormente, determinando uma matriz mais rígida em virtude do aumento na deposição de colágeno (CHAKROBORTY et al., 2008). Estudos evidenciam que células neoplásicas cultivadas sobre substratos rígidos apresentam uma supressão de sinalização, comprometendo a expansão neoplásica (SURESH, 2007). Ainda relativamente à relação de causa e feito, cumpre-nos destacar que pacientes esquizofrênicos apresentam alterações na composição de matriz extracelular em sítios cerebrais (BERRETTA, 2012), o que sugere que a modificação no padrão de organização da matriz extracelular pode ser um elemento primário e, portanto, causal, no processo.

Complementando os achados referentes ao microambiente tumoral, foi identificada uma redução na expressão leucocitária de COX-2 nas áreas de invasão tumoral em animais do grupo experimental (Figura 7). Tem sido proposto que a inflamação crônica pode ter efeitos no desenvolvimento tumoral, dependendo do tipo e estágio do mesmo (SCHREIBER et al, 2011; FEIGENSON et al, 2014). Em pacientes esquizofrênicos é relatada a patência de um processo inflamatório crônico com o incremento de citocinas de padrão tipo 2 (MULLER; SCHWARZ, 2006). O aumento da expressão do receptor de dopamina D3 e o aumento na síntese da citocina pro-inflamatória interferon- γ por linfócitos têm sido reportados em pacientes portadores de esquizofrenia não medicados (KHANDAKER et al, 2014). Uma meta-análise de citocinas na esquizofrenia revelou níveis maiores de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico de pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia e pacientes recidivantes do que em pacientes saudáveis, porém, também foram observados níveis maiores de algumas citocinas anti-inflamatórias nesses pacientes quando comparados ao controle (MILLER et al, 2016; MULLER, 2018, no prelo). Funcionalmente, a expressão de COX-2 relaciona-se ao bloqueio apoptótico. Assim, a redução na expressão de COX-2 presente no infiltrado leucocitário tumoral pode estar associada a um incremento apoptótico local e consequente antagonização à expansão neoplásica (YAO et al, 2018). Grudzinski et al (2006) observaram aumento significativo na sobrevida livre de doenças de pacientes com câncer de mama sem expressão de COX-2 em comparação aquelas com positividade para COX-2 em linfonodos axilares em seu estudo sobre a expressão de COX-2 no câncer de mama. Esses achados reforçam a atividade paradoxal pró-tumorigênica da inflamação no desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Suplementarmente há evidências apoiando o papel da COX-2 na carcinogênese (GRUDZINSKI et al, 2006).

No sentido de complementar e elucidar alguns achados seria importante avaliar os níveis de dopamina no sistema nervoso central e no microambiente tumoral nos animais submetidos ao modelo,

assim como a atividade apoptótica nas células neoplásicas e a expressão de metaloproteinases no microambiente tumoral.

CONCLUSÃO

Em camundongos submetidos a modelo de esquizofrenia e portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida, foi observada uma redução no crescimento tumoral associada à preservação da atividade proliferativa das células neoplásicas e a uma modulação estromal, caracterizada por maior densidade microvascular, maior deposição de matriz extracelular e menor expressão de COX-2 por leucócitos infiltrantes. Tais achados sugerem uma participação ativa do microambiente tumoral na modulação do crescimento neoplásico em camundongos submetidos a modelo de esquizofrenia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJO, R.; CACICEDO, L.; NAVARRO, C.; SANCHEZ-FRANCO, F. **Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat.** Endocrinology, v. 144, p. 1086-1097, 2003. doi: <https://doi.org/10.1210/en.2002-220667>.
- ASHDOWN, H.; DUMONT, Y.; POOLE, S.; BOKSA, P.; LUHESHI, G.N. **The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications to schizophrenia.** Molecular Psychiatry, v. 11, p. 47-55, 2006. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001748>.
- BARAK, Y.; ACHIRON, A.; MANDEL, M.; MIRECKI, I.; AIZENBERG, D. **Reduced cancer incidence among patients with schizophrenia.** Cancer, v. 104, p. 2817-2821, 2005. doi: <https://doi.org/10.1002/cncr.21574>.
- BARR, C.E.; MEDNICK, S.A.; MUNK-JORGENSEN, P. **Exposure to influenza epidemics during gestation and adult schizophrenia. A 40 year study.** Archives of General Psychiatry, v. 47, p. 869-874, 1990.
- BERRETTA S. **Extracellular matrix abnormalities in schizophrenia.** Neuropharmacology, v. 62, p. 1584-1597, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.010>.
- BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H. **Existence of two subpopulations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites,** Journal of Cell Biology, v. 105, p. 1549-1554, 1987.
- CHAKROBORTY, D.; CHOWDHURY, U.R.; SARKAR, C.; BARAL, R.; DASGUPTA, P.S.; BASU, S. **Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization.** Journal of Clinical Investigation, v. 118, p. 1380–1389, 2008. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI33125>.
- CONLEY, S.J.; GHEORDUNESCU E; KAKARALA, P.; NEWMAN, B.; KOEKAYAH; HEATH, A.N.; CLOUTHIER, S.G.; WICHA, M.S. **Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 109, p. 2784-2789, 2012. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1018866109>.

DRELL, T.L.; JOSEPH, J; LANG, K. **Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells.** Breast Cancer Research and Treatment, v.80, p. 63–70, 2003. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1024491219366>.

FAN, J.; WOJNAR, M.M.; THEODORAKIS, M.; LANG, C.H. **Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-1 mRNA and peptide and IGF-binding proteins by interleukin-1.** American Journal of Physiology, v. 270, p. R621-R629, 1996. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.270.3.R621>.

FEIGENSON, K.A.; KUSNECOV, A.W.; SILVERSTEIN, S.M. **Inflammation and the two-hit hypothesis of schizophrenia.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 38, p. 72-93, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.11.006>.

GEYER, M.A.; MOGHADDAM, B. **Animals models relevant to schizophrenia disorders.** In: DAVIS, KL; CHARNEY, D; COYLE, JT; NEMEROFF, C, eds. Neuropsychopharmacology, The Fifth Generation of Progress. Baltimore, MD: Lippincott, Williams & Wilkins, p. 689-701, 2002.

GILMORE, J.H.; JARSKOG, L.F.; VADLAMUDI, S.; LAUDER, J.M. **Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1 β , IL-6, and TNF α inhibit cortical neuron dendrite development.** Neuropsychopharmacology, v. 29, p. 1221-1229, 2004. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300446>.

GORCZYCA,W.; KRAM,A.; TUZIAK,T.; DARZYNKIEWICZ,Z.; MELAMED,M.R. **Proliferating cell nuclear antigen in archival surgical specimens of malignant lymphoma and metastatic carcinoma: immunohistochemical and flow cytometric analysis.** Patologia Polska, v.44, p.121-8,1993.

GRUDZINSKI, M.; CAMBRUZZI, E.; LAHUEDE, E.; SAVARIS, R.F.; PEDRINI, J.L.; ZETTLER, C.G. **Expressão da cox-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença.** Revista da Associação Médica Brasileira, v.52, n.4, p. 275-280, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302006000400031>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. **The hallmarks of cancer, Cell, v. 100, p. 57-70, 2000.** doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. **The hallmarks of cancer.** The next generation, Cell, v. 144, p. 646-674, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HIPPISLEY-COX, J.; VINOGRADOVA, Y.; COUPLAND, C.; PARKER, C. **Risk of malignancy in patients with schizophrenia or bipolar disorder: nested case-control study.** Archives of General Psychiatry, v. 64, n.12, p. 1368 – 1376, 2007. doi: <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.12.1368>.

HSU, M.K.; RAINES, L.; FANGER, H. **Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v. 29, p. 577-580, 1981. doi: <https://doi.org/10.1177/29.4.6166661>.

JABLENSKY, A. **Classification of nonschizophrenic psychotic disorders: a historical perspective.** Current Psychiatry, v. 3, p. 326-331, 2001.

KHANDAKER, G.M.; COUSINS, L.; DEAKIN, J.; LENNOX, B.R.; YOLKEN, R.; JONES, P.B. **Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment.** The Lancet Psychiatry, v.2, n.3, p.258-270, 2015. doi: [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(14\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(14)00122-9).

KUMARAGURUPARAM, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. **Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours.** Research in Veterinary Science, v. 81, p. 218-24, 2006.

LEITE, LG.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, RM.; PIACENTI, A.; ARAGÃO, M.; SCHONS, SV. **Susceptibilidade de animais de laboratório à intoxicação por Ateleia glazioviana (Leg. Papilioideae),** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 22, p. 73-78, 2002.

LEVENTAL, K.R.; YU, H.; KASS, L. et al. **Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling.** Cell, v. 139, p. 891-906, 2009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.

MEYER, U.; NYFFELER, M.; SCHWENDENER, S.; YEE, B.K.; FELDON, J. **Relative prenatal and postnatal maternal contributions to schizophrenia-related neurochemical dysfunction after in utero immune challenge.** Neuropsychopharmacology, v. 33, p. 441-456, 2008. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301413>.

MILLER, B.J.; BUCKLEY, P.F. **The case for adjunctive monoclonal antibody immunotherapy in schizophrenia.** Psychiatric Clinics of North America, v.39, p.187-198, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.psc.2016.01.003>.

MULLER, N. **Inflammation in schizophrenia: pathogenetic aspects and therapeutic considerations.** Schizophrenia Bulletin, 2018. No prelo. doi: <https://doi.org/10.1093/schbul/sby024>.

MULLER, N.; SCHWARZ, M.J. **Neuroimmune-endocrine crosstalk in schizophrenia and mood disorders.** Expert Reviews in Neurotherapeutics, v. 6, p. 1017-1038, 2006. doi: <https://doi.org/10.1586/14737175.6.7.1017>.

OS, J.; KENIS, G.; RUTTEN, B.P. **The environment and schizophrenia.** Nature, v. 468, p. 203-212, 2010. doi: <https://doi.org/10.1038/nature09563>.

OZAWA, K.; HASHIMOTO, K.; KISHIMOTO, T.; SHIMIZU, E.; ISHIKURA, H.; IYO, M. **Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia,** Biological Psychiatry, v. 59, p. 546- 554, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.07.031>.

PARK, S.Y.; KIM, H.M.; KOO, J.S. **Differential expression of cancer-associated fibroblast-related proteins according to molecular subtype and stromal histology n breast cancer.** Breast Cancer Research and Treatment, v. 149, p. 727-741, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3291-9>.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. **Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma.** Experimental Cell Research, v. 316, p. 1324-1331, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045>.

SARKAR, C.; CHAKROBORTY, D.; CHOWDHURY, U.R.; DASGUPTA, P.S.; BASU, S. **Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models.** Clinical Cancer Research, v. 14, p. 2502- 2510, 2008. doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1778>.

SCHREIBER, R.D.; OLD, L.J.; SMYTH, M.J. **Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.** Science. v.331, p. 1565-1570, 2011. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.

SEGUIN, B.; BESANCON, M.F.; MCCALLAN, J.L.; DEWE, L.L.; TENWOLDE, M.C.; WONG, E.K.; KENT, M.S. **Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002).** Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 20, p. 933-40, 2006.

SURESH, S. **Biomechanics and biophysica of cancer cells.** Acta Materialia, v. 3, p. 413-438, 2007.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.002>.

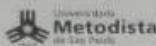
TAYLOR, A.P.; RODRIGUEZ, M.; ADAMS, K.; GOLDENBERG, D.M.; BLUMENTHAL, R.D. **Altered tumor vessel maturation and proliferation in placenta growth factor producing tumors: potential relationship to post-therapy tumor angiogenesis and recurrence.** International Journal of Cancer, v. 105, p. 158-164, 2003. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.11059>.

TSUANG, M.T.; FARAONE, S.V. **The case for heterogeneity in the etiology of schizophrenia.** Schizophrenia Research, v. 17, p. 161-175, 1995.

WINTER, C.; DIODARI-IRANI, A.; SOHR, R.; MORGESTERN, R.; FELDON, J.; JUCKEL, G.; MEYER, U. **Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia.** The International Journal of Neuropsychopharmacology, v. 12, p. 513-524, 2009. doi: <https://doi.org/10.1017/S1461145708009206>.

YAO, Q.; GU, A.; WANG, Z.; XUE, Y. **MicroRNA-144 functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting cyclooxygenase-2.** Experimental and therapeutic Medicine, v. 15, p. 3088-3095, 2018. doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5763>.

ANEXOS



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Protocolo Nº 019/2010

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA – METODISTA

Título do Projeto de Pesquisa: Repercussões de infecção pré-natal, em modelo de esquizofrenia, sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich na progénie de camundongos

Pesquisador Responsável: José Guilherme Xavier

Curso: Medicina Veterinária

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reunida em **01/09/2010** deliberou como segue sobre o projeto em questão:

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo "Avaliar a influência permanente de infecção pré-natal sobre a prole, em um período com efeitos que simulam a esquizofrenia, utilizando como parâmetro de avaliação o crescimento neoplásico; Avaliar o crescimento do tumor de Ehrlich na forma sólida na prole de camundongos que receberam ou não poli I:C durante a prenhez, considerando, em particular: volume tumoral; sobrevida dos animais; atividade proliferativa das células neoplásicas e expressão de metaloproteinases."

Como delineamento experimental, "fêmeas serão colocadas com machos (2x1) até a detecção da prenhez, por meio de lavado vaginal. Serão utilizados aproximadamente 70 camundongos Swiss, machos e fêmeas, pesando entre 20 e 40g., mantidos no Biotério da Universidade Metodista de São Paulo, com condições de iluminação, temperatura e umidade controladas, recebendo ração e água "ad libitum". As fêmeas prenhes receberão, ao nono dia de prenhez, dose única, intra-venosa, de solução salina (3 animais) ou de poli I:C (7 animais), na dose de 5 mg/kg, sendo os machos das respectivas progêniens divididos em SHAM (I; 15 animais) e experimental (II; 30 animais). Animais de ambos os grupos receberão aos 2 meses de idade inóculo contendo células de tumor de Ehrlich na região cervical dorsal. Em paralelo será utilizado um grupo controle tumoral (III; 15 animais), de camundongos machos, filhos de mães não-manipuladas experimentalmente durante a prenhez, que receberão aos 2 meses de idade inóculo contendo células de tumor de Ehrlich em região cervical dorsal. Aos 10 e 15 dias pós-inóculo de células tumorais, 5 animais dos grupos I e III, e 10 do grupo II serão eutanasiados em câmara de CO₂ e necropsiados. Os demais animais serão acompanhados para registro de sua sobrevida".

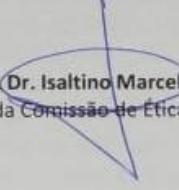
Após leitura e análise do projeto e exame criterioso de todos os itens que compõem os documentos do Protocolo de Pesquisa, incluindo os itens presentes no Roteiro de Checagem para o parecerista, consideramos o Projeto Aprovado.

A CEUA-METODISTA considera que o projeto apresentado segue os princípios preconizados pela LEI Nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, sendo considerado **APROVADO**.

Lembramos que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- Que sejam encaminhados à CEUA-METODISTA relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais)
- Que sejam notificados imediatamente à CEUA-METODISTA eventos adversos que ocorram no curso da pesquisa e que sejam significativos do ponto de vista ético e metodológico;
- Que sejam enviadas para aprovação eventuais emendas e modificações no protocolo de pesquisa. Ressaltando que essas emendas e/ou modificações somente poderão ser implementadas após aprovação da CEUA.

São Bernardo do Campo, 01/09/2010


Prof. Dr. Isaltino Marcelo Conceição
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Dom Jaime de Barros Câmara, 1000 – Edifício B -CEP 09894-400 – Bairro Planalto – São Bernardo do Campo - SP
Fone: 4366-5345/FAX: 4390-8007
E-mail: ceua@metodista.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA – METODISTA

Título do Projeto de Pesquisa: Avaliação da matriz extracelular encefálica e tumoral em camundongos portadores do Tumor de Ehrlich na forma sólida submetidos ou não à modelo de esquizofrenia

Pesquisador Responsável: José Guilherme Xavier **Curso:** Medicina Veterinária

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reunida em 31 de agosto de 2015 deliberou como segue sobre o projeto em questão:

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo

“ Objetivo Geral: Avaliar as características da matriz extracelular no encéfalo e no tecido tumoral de camundongos submetidos ou não a modelo de esquizofrenia;

Objetivos Específicos:- Caracterizar histoquimicamente a matriz extracelular no encéfalo e no microambiente neoplásico, comparando-a em animais da progênie de fêmeas expostas ou não ao poli I:C durante a prenhez. Caracterizar o crescimento tumoral em camundongos que receberam ou não poli I:C durante a vida pré-natal, utilizando como parâmetros o volume e o aspecto histopatológico tumorais.”.

“Serão utilizados 35 camundongos swiss, machos e fêmeas, manipulados experimentalmente a partir de 8 semanas de idade, pesando entre 20 e 25g, provenientes do biotério da Faculdade da Saúde da Universidade Metodista de São Paulo. Sendo 1 macho e quatro fêmeas para o acasalamento (duas tratadas e duas injetadas com salina, conforme delineamento abaixo). Após o nascimento das proles serão utilizados 20 animais entre machos e fêmeas provenientes deste acasalamento. E dez animais (machos e fêmeas) que não são filhotes provenientes do acasalamento acima citado. Durante o período experimental os animais serão mantidos em caixas de policarbonato forradas com maravalha, sob condições de aeração, exaustão, e climatização ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade (65-75%) controladas. Seguirão ciclo de luz noite e dia de 12 horas, com luzes acesas a partir de 7h. Receberão ração balanceada e água ad libitum.

Delineamento experimental:

Quatro fêmeas prenhes receberão, ao nono dia de prenhez, dose única, intra-venosa, de solução salina ou de poli I:C, na dose de 5 mg/kg, sendo os produtos das respectivas progênie divididos em SHAM sólido (I; 10 animais) e experimental (II; 10 animais). Animais de ambos os grupos receberão aos 2 meses de idade inóculo subcutâneo contendo células de tumor de Ehrlich na região lombar dorsal. Em paralelo será utilizado um grupo controle tumoral (III; 10 animais), de camundongos, de 2 meses, filhos de mães não-manipuladas experimentalmente durante a prenhez, que receberão inóculo subcutâneo contendo células de tumor de Ehrlich em região lombar dorsal. Após 30 dias de crescimento tumoral os animais serão eutanasiados e necropsiados, colhendo-se neoplasias e encéfalos para avaliação anátomo-patológica. Os achados serão descritos e avaliados estatisticamente.”

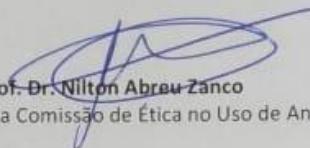
A CEUA-METODISTA considera que o projeto apresentado segue os princípios preconizados pela LEI Nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, sendo considerado **APROVADO**.

Av. Dom Jaime de Barros Câmara, 1000 – Edifício B -CEP 09894-400 – Bairro Planalto – São Bernardo do Campo - SP
E-mail: ceua@metodista.br Fone: 4366-5345/FAX: 4390-8007

Lembramos que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- Que sejam encaminhados à CEUA-METODISTA relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais)
- Que sejam notificados imediatamente à CEUA-METODISTA eventos adversos que ocorram no curso da pesquisa e que sejam significativos do ponto de vista ético e metodológico;
- Que sejam enviadas para aprovação eventuais emendas e modificações no protocolo de pesquisa. Ressaltando que essas emendas e/ou modificações somente poderão ser implementadas após aprovação da CEUA.

São Bernardo do Campo, 31 de agosto de 2015



Prof. Dr. Nilton Abreu Zanco

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

REVISORES ORTOGRÁFICOS E GRAMATICAIS

DECLARAÇÃO

DECLARO que a *Dissertação* do Programa de Mestrado em *Patologia Ambiental e Experimental* da Universidade Paulista – UNIP foi devidamente revisada.

Título: REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E MODULAÇÃO MICROAMBIENTAL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE ESQUIZOFRENIA

Autoria: Anderson Amaro Melo Dos Santos

Orientador(a): Prof. Dr. José Guilherme Xavier

Dados do Revisor(a)

Nome: Marina Gimenez Parra

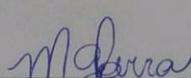
RG: 43494803-2

Telefone de contato: 11 99188-6326

E-mail: magiparra@gmail.com

Tipo de revisão: Total/ Parcial - Ortográfica/ Gramatical - Formatação/ Normatização

27 de junho de 2018.



Assinatura do(a) Revisor(a)