UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Jéssica Cristina Dos Santos

**O carcinoma mamário experimental induz mudanças duradouras no eixo neuroimune
em repouso e em resposta ao desafio imune com lipopolissacarídeo**

Ribeirão Preto – SP

2018

JÉSSICA CRISTINA DOS SANTOS

O carcinoma mamário experimental induz mudanças duradouras no eixo neuroimune em repouso e em resposta ao desafio imune com lipopolissacarídeo

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gabriela Silva Bisson.

Co-orientadora: Dr^ª. Sabrina Francesca de Souza Lisboa.

Ribeirão Preto – SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Jéssica Cristina

O carcinoma mamário experimental induz mudanças duradouras no eixo neuroimune em repouso e em resposta ao desafio imune com lipopolissacarídeo.

118 p: il: 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP. Versão corrigida.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Gabriela Silva Bisson

Co-orientadora: Sabrina Francesca de Souza Lisboa

1. Tumor mamário. 2. Neuroinflamação. 3. Micróglia. 4. Citocinas. 5. Câncer

Nome: Jéssica Cristina dos Santos

Título: O carcinoma mamário experimental induz mudanças duradouras no eixo neuroimune em repouso e em resposta ao desafio imune com lipopolissacarídeo.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Profª. Dra. **Gabriela Silva Bisson**

Julgamento: _____

Instituição: **EERP – USP**

Assinatura: _____

Prof. Dr. **João Santana da Silva**

Julgamento: _____

Instituição: **FMRP – USP**

Assinatura: _____

Prof. Dr. **Marcelo Dias Baruffi**

Julgamento: _____

Instituição: **FCFRP – USP**

Assinatura: _____

Profª. Dra. **Christie Ramos Andrade Leite Panissi**

Julgamento: _____

Instituição: **FORP – USP**

Assinatura: _____

Prof. Dr. **Victor Rodrigues Santos**

Julgamento: _____

Instituição: **UFMG**

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Genômica e Imunobiologia da Escola de Enfermagem
de Ribeirão Preto – Universidade de
São Paulo – USP em conjunto com o laboratório da Prof^a Dr^a Leah M. Pyter no Institute For
Behavioral Medicine Research da The Ohio State University, com apoio financeiro da
CAPES.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, sobretudo à minha família que desde sempre esteve ao meu lado me estimulando e motivando a fazer o que amo e ao meu noivo Samuel Rowe que foi essencial no último ano do meu doutoramento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha Família que me apoiou, incentivou e me guiou durante todos os meus anos na pós-graduação. Agradeço ao meu pai, Juvenal Santos, pelos momentos de reflexão e pelos sábios conselhos, sempre repletos de serenidade. Agradeço à minha mãe, Neide Santos, pela força, pela dedicação e por sempre acreditar em mim, às vezes mais do que eu mesma. Agradeço à minha irmã, Jesiane Puga, que sempre esteve diretamente envolvida em todos os meus projetos de vida sendo parte fundamental para que todos eles dessem certo; agradeço pelas broncas, puxões de orelha e apoio incondicional. Agradeço também ao José Luiz Puga Junior (Neco), por ser um irmão e estar sempre me apoiando em todos os momentos.

Ao meu noivo Samuel Rowe que mudou a minha vida e o meu conceito de lar. Obrigada pelo apoio incondicional, por ser parceiro nos bons e maus momentos, pela cia nas noites intermináveis no laboratório, por revisar todos os meus artigos mil vezes sempre que eu pedia e por ser o amor da minha vida!

Agradeço à professora Gabriela Bisson por me receber em seu laboratório e me dar a oportunidade de estudar dois assuntos pelos quais sempre tive paixão: câncer e neurobiologia!

À minha co-orientadora Sabrina Lisboa que foi essencial em todas as etapas desse projeto, sempre me ajudando, orientando e sugerindo os melhores caminhos para o projeto e sendo essencial para que tudo desse certo, além de prover espaço e recursos que foram fundamentais!

À professora Leah Pyter primeiramente pela calorosa acolhida em seu laboratório, pela rica troca de ideias e pela colaboração, essencial para a realização deste trabalho. Agradeço também pela orientação e por todo o apoio nesse ano incrível em que eu estava longe de casa, dos amigos e da família, mas tive a oportunidade de fazer novos amigos e de iniciar a minha própria família. Muito obrigada pelo carinho e pela amizade. Agradeço aos amigos do Laboratório de Genômica e Imunobiologia (LGBIO - família Camundongo para os mais íntimos), por estarem sempre bem-dispostos a ajudar, aprender e ensinar, minha

passagem no laboratório não teria sido tão produtiva sem vocês. Obrigada pela amizade, pelo apoio e por se fazerem sempre presentes mesmo quando um de nós estava “*abroad*”.

À Denise Sayuri, Luciana Chain e Luís Lopes Júnior pela amizade e colaboração dentro e fora do laboratório, pelo ombro amigo, por serem fundamentais na minha formação como pesquisadora, mas sobretudo por não me deixarem enlouquecer ao longo desse processo que é edificante, mas permeado de dificuldades e sacrifícios. Vocês foram e são muito importantes para mim, muito obrigada mesmo! À professora Beatriz Ferreira, Anderson Vulckzac, Andressa Fish e Isabela Daher pela amizade e carinho e por estarem sempre bem-dispostos a ajudar.

Aos queridos amigos de Columbus, Annemarie Krug, Ashley Lahoud, Savannah Bever, Kelley Jordan, Hellen Chen, Jasskiran Kaur, Lindsay Strehle, Kyle Sullivan, Browning Haynes por me acolherem tão bem na Ohio State University, pela oportunidade de aprender e ensinar neste ano de trocas tão ricas e pela amizade!

Ao professor Francisco Guimarães, por me acolher em seu laboratório e às suas alunas Alice Hartmann, Andreza Buzolin e Nicole Rodrigues por me auxiliarem nos experimentos comportamentais e serem sempre tão solícitas, além de serem companhias muito agradáveis e descontraídas. Aos técnicos Eleni Gomes e Afonso Padovan, pela compreensão, boa vontade e pelo bom humor, por serem tão solícitos e prontos a ajudar! Aos amigos do curso de Biologia Celular, obrigada pelos momentos que, embora difíceis, sempre foram marcados pela descontração e bom humor de todos, tornando os dias mais agradáveis. Obrigada a todos pelo carinho e pelas risadas. À secretária do departamento de Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine Ferreira pela boa vontade e eficiência sempre. Agradeço aos professores e colegas do departamento de Imunologia Básica e Aplicada, pelos ensinamentos e vivências que me proporcionaram o preparo científico para seguir a carreira acadêmica e à oportunidade de pertencer a esta tão renomada instituição de pesquisa. Por fim agradeço à CAPES pelo financiamento deste projeto.

**“Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe, não praticar o que se ensina,
não perguntar o que se ignora.”**

São Beda

RESUMO

SANTOS, J.C. O carcinoma mamário experimental induz mudanças duradouras no eixo neuroimune em repouso e em resposta ao desafio imune com lipopolissacarídeo.

122 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres no Brasil e no mundo. Pacientes com câncer de mama frequentemente apresentam alterada resposta inflamatória após desafios imunes, bem como elevada prevalência de comorbidades psiquiátricas e disfunções cognitivas. Modelos animais de câncer indicam que os tumores por si só são suficientes para exacerbar as respostas neuroinflamatórias após um desafio imunológico. No entanto, tumores primários geralmente não estão presentes em sobreviventes de câncer, e as consequências comportamentais destas respostas alteradas permanecem desconhecidas. Portanto, no presente trabalho, utilizando modelo murino, primeiramente foi estudada se a indução de tumor mamário exacerba respostas inflamatórias (tanto sistêmica quanto em estruturas encefálicas envolvidas com o controle da resposta ao estresse) e a extensão em que a remoção do tumor (mastectomia) influencia estas respostas. Ainda, avaliamos o comportamento doentio após um desafio imunológico com lipopolissacarídeo (LPS). Por fim, investigamos se as alterações neuroimunoendócrinas induzidas por tumores influenciam parâmetros cognitivos, bem como o comportamento do tipo ansioso em repouso. Os tumores diminuíram os níveis de mRNA de *Tnf- α* , *Il-1 β* e *Il-6* em múltiplas regiões encefálicas no grupo tumor após desafio com LPS. Este efeito foi atenuado em camundongos mastectomizados em alguns casos. Os tumores também atenuaram parâmetros do comportamento doentio (temperatura corporal e locomoção) durante o período de 24 horas após a injeção de LPS em comparação com os controles tratados com LPS. Os camundongos mastectomizados exibiram respostas intermediárias. Adicionalmente, foram avaliados parâmetros cognitivos e relacionados à ansiedade em diferentes fases do ciclo claro-escuro, bem como a expressão basal de 88 genes envolvidos na resposta imune inata e adaptativa em estruturas cerebrais por PCR *array*. Dentre os parâmetros comportamentais, observou-se que os tumores induzem comportamento semelhante à fadiga na fase ativa, o qual persiste mesmo após a remoção tumoral. Os tumores também regularam positivamente a expressão de vários genes relacionados às respostas imune, tais como *Il1- α* , *Il1r1*, e *Icam1*, enquanto a remoção

tumoral reestabeleceu os níveis basais de expressão destes marcadores. Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que a experiência tumoral induz alterações duradouras na sinalização neuroimune funcional, as quais podem além de afetar a resposta inflamatória e comportamental a desafios imunes subsequentes, contribuir para a persistência de comorbidades neuropsiquiátricas nos sobreviventes de câncer. Desta forma, concluímos que elucidação dos mecanismos pelos quais o desenvolvimento tumoral altera a sinalização neuroimune e induz comorbidades comportamentais é essencial para refinar as estratégias de tratamento e garantir qualidade de vida para a crescente população de sobreviventes de câncer.

Palavras-Chave: Tumor mamário, Neuroinflamação, Micróglia, Citocinas, Câncer

ABSTRACT

SANTOS, J.C. The experimental mammary carcinoma induces long-lasting changes on the neuro-immune axis at rest and in response to an immune challenge with lipopolysaccharide. 122 p. PhD Thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Breast cancer is the most common type of cancer among women in Brazil and worldwide. Breast cancer patients often present altered inflammatory responses after an immune challenge, as well as increased prevalence of psychiatric comorbidities and cognitive dysfunctions. Animal cancer models suggest that tumors alone are sufficient to exacerbate neuroinflammatory responses following an immune challenge. Since, primary tumors are generally not present in cancer survivors, the behavioral consequences of these altered responses remain unclear. Therefore, in the present study, using a rodent model, we first studied whether mammary tumor induction exacerbates inflammatory responses (both systemic and in brain structures involved in the control of stress response) and the extent to which tumor removal influences these responses. Then, we evaluated the sickness behavior in response to an immune challenge with lipopolysaccharide (LPS). Finally, we investigated whether the tumor-induced neuroimmunoendocrine changes influence cognitive parameters, and anxiety-like behavior at rest. Tumors decreased *Tnf- α* , *Il-1 β* and *Il-6* mRNA levels in multiple brain regions after LPS challenge. This impaired neuroinflammatory response was attenuated in mastectomized mice in some cases. Tumors also attenuated parameters sickness behavior (body temperature and locomotion) during the 24-hour period after LPS injection compared to LPS-treated controls. The mastectomized mice exhibited intermediate responses. The same procedure of tumor induction and removal was performed in another cohort of animals to evaluate cognitive and anxiety-related parameters in different phases of the light-dark cycle, as well as the basal expression of 88 genes involved in the innate and adaptive immune response in the brain structures by PCR array. Tumors induced fatigue during the active phase, which persisted after tumor removal. Tumors also increased the brain expression of various genes of immune responses, such as *Il1- α* , *Il1r1*, and *Icam1*, which were reversed by tumor removal. Taken together, our results indicate that tumor experience induces lasting changes in functional neuroimmune signaling, which may affect the inflammatory and behavioral response to subsequent immune challenges and contribute to persistence of

neuropsychiatric comorbidities in cancer survivors. Thus, we conclude that the identification of the mechanisms by which tumor development alters neuroimmune signaling and induces behavioral comorbidities is essential to refine treatment approach and provide quality of life for the growing population of cancer survivors.

KEYWORDS: Mammary neoplasm, Neuroinflammation, Microglia, Cytokine, Cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Remoção de tumor mamário. Os animais do grupo mastectomizado foram submetidos à ressecção cirúrgica dos tumores (A) com as cápsulas intactas (B); a pele foi fechada com grampos cirúrgicos (C).42
- Figura 2. Delineamento experimental. Os animais do grupo mastectomizado foram submetidos à inoculação com as células tumorais da linhagem 67NR na semana 0, mesma janela temporal na qual os animais *sham* passaram por uma cirurgia simulada com inoculação de PBS. Os animais do grupo tumor foram submetidos à inoculação tumoral na semana 2, mesma janela temporal na qual os animais do grupo mastectomizado foram submetidos à remoção cirúrgica do tumor e os animais *sham* passaram por uma cirurgia simulada dessa remoção. Os animais do subconjunto neuroinflamação (n=10-20 animais/grupo) foram submetidos à eutanásia e tiveram seus tecidos coletados 4 ou 24 horas após a injeção com LPS/PBS. As medidas de comportamento doentio para os animais do subconjunto comportamento foram coletadas 24 horas antes e 0, 4 e 24 horas após a injeção com LPS/PBS; dados de ingestão alimentar e massa corporal foram coletados para todos os animais deste subconjunto (n=9-11 animais/grupo), enquanto locomoção e temperatura corporal foram medidos apenas para os animais implantados com transmissores teleméricos (n=7-9 animais/grupo); todos os animais do subconjunto comportamento foram submetidos à eutanásia e tiveram seus tecidos coletados 24 horas após a injeção com LPS/PBS. * representa a janela temporal para implantação de transmissor telemérico para um subconjunto de camundongos; ** representa a janela temporal para realização das medidas de comportamento doentio.42
- Figura 3. Massa corporal e ingestão alimentar basal. Média ($\pm$ SEM) da massa corporal (g) e da ingestão alimentar (g) em um intervalo de 24 horas para camundongos do grupo sham, tumor e mastectomizados previamente ao desafio imune com LPS (n=9-19 animais/grupo).48
- Figura 4. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral sobre a perda de peso induzida por LPS. Média ($\pm$ SEM) da porcentagem de mudança na massa corporal para camundongos dos grupos *sham*, tumor e mastectomizado 4 e 24 horas após injeção i.p. com PBS ou LPS relativa à medida basal realizada no mesmo horário do dia 24 horas antes do desafio imune (n=9-11 animais/grupo). * $p \leq 0.05$ LPS comparado ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.49
- Figura 5. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral sobre a anorexia induzida por LPS. Média ($\pm$ SEM) da porcentagem de mudança na ingestão alimentar para os

grupos *sham*, tumor e mastectomizado 4 e 24 horas após injeção i.p. com PBS ou LPS relativa à medida basal realizada no mesmo horário do dia 24 horas antes do desafio imune (n=9-11 animais/grupo); * $p \leq 0.05$ LPS comparado ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.50

Figura 6. Tumores atenuam a letargia induzida por LPS, a qual é revertida após a remoção tumoral. (A) Média ($\pm$ SEM) da atividade locomotora (contagens/h) 24 horas antes e 24 horas após a injeção de LPS. Barra preta no topo: diferença significativa entre o grupo tumor e *sham* injetados com LPS; barra cinza: diferença significativa entre o grupo tumor e mastectomizado injetados com LPS. (B) Aumento da atividade locomotora durante a fase escura após injeção de LPS da caixa destacada em (A); * $p \leq 0.05$ grupo tumor em relação ao *sham* LPS; # $p \leq 0.05$ grupo tumor em relação ao mastectomizado; & $p \leq 0.05$ grupo mastectomizado em relação ao *sham* LPS por ANOVA de medidas repetidas (A) ou 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni (B); (n=6-8 animais/grupo). ...51

Figura 7. A remoção tumoral reverte parcialmente os aumentos na temperatura corporal basal induzidos por tumores e restaura parcialmente a resposta bifásica de febre/hipotermia ao LPS. (A) Temperatura corporal média basal ($\pm$ SEM) 24 horas antes da injeção de LPS. (B) Temperatura corporal relativa ($\pm$ SEM) em resposta ao desafio imune com LPS (os grupos *sham* receberam PBS ou LPS enquanto os grupos tumor e mastectomizado receberam apenas LPS). * $p \leq 0.05$ grupo tumor em relação ao *sham* LPS; # $p \leq 0.05$ grupo tumor em relação ao mastectomizado; & $p \leq 0.05$ grupo mastectomizado em relação ao *sham* LPS; ^ $p \leq 0.05$ grupo *sham* PBS em relação ao *sham* LPS; a linha com símbolos representa as diferenças observadas por ANOVA de medidas repetidas, enquanto os símbolos sobre os diferentes pontos ao longo do tempo representam as diferenças observadas por 1-way ANOVA (n=7-15 animais/grupo).53

Figura 8. Efeitos da completa remoção de tumor mamário na massa relativa do baço. Média $\pm$ SEM (A) da massa tumoral coletada na cirurgia (mastectomizado) ou na coleta de tecidos (tumor), (B) ou da massa do baço relativa à massa corporal em animais *sham* tratados com PBS e entre os diferentes grupos 4 ou 24 horas pós-LPS (n=7-20 animais/grupo; letras representam diferenças estatísticas por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni).55

Figura 9. Tumores alteram a concentração de citocinas circulantes no plasma em resposta ao desafio com LPS. Média $\pm$ SEM (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) TNF- α e (D) CXCL1 (pg/ml) nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=10-20 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; # $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; & $p < 0.05$ em relação ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.57

- Figura 10. Tumores alteram a recuperação das concentrações plasmáticas de corticosterona 24 horas após desafio com LPS. Média $\pm$ corticosterona (ng/ml) circulante no plasma nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=10-20 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos 24 horas após LPS por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; # $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por *2-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; & $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*. 58
- Figura 11. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na expressão de RNAm de *Il-1 β* em regiões encefálicas que regulam o comportamento doentio. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Il-1 β* (A) no hipocampo, (B) hipotálamo e (C) córtex pré-frontal nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=10-20 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal (4 ou 24h) por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; & $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; + $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por *2-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*. 59
- Figura 12. Efeitos de tumores mamários e remoção tumoral na expressão de RNAm de *Il-6* em regiões encefálicas que regulam o comportamento doentio. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Il-6* (A) no hipocampo, (B) hipotálamo e (C) córtex pré-frontal nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=10-20 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal (4 ou 24h); # $p < 0,05$ em relação ao grupo tumor na mesma janela temporal (4 ou 24h)) por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; & $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; + $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por *2-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*. 61
- Figura 13. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na expressão de RNAm de *Tnf- α* em regiões encefálicas que regulam o comportamento doentio. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Tnf- α* (A) no hipocampo, (B) hipotálamo e (C) córtex pré-frontal nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=10-20 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal (4 ou 24h) por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; & $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; + $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por *2-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*. 62
- Figura 14. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na expressão de RNAm de *Cd11b* em regiões encefálicas que regulam o comportamento doentio. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Cd11b* (A) no hipocampo, (B) hipotálamo e (C) córtex pré-frontal nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado

(n=10-20 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal (4 ou 24h) por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; & $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; + $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por *2-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*. 63

Figura 15. Correlação entre a massa tumoral e a resposta neuroinflamatória após o desafio com LPS. Regressões lineares entre a massa tumoral total e a expressão de mRNA de *Cd11b* cortical e hipocampal em camundongos do grupo tumor 4 horas após injeção de LPS (A). Correlação entre a massa tumoral anterior do grupo mastectomizado e a resolução da resposta inflamatória no hipocampo e hipotálamo 24 horas pós-LPS (B). 64

Figura 16. Delineamento experimental. O grupo mastectomizado foi submetido à inoculação com as células tumorais da linhagem 67NR na semana 0, mesma janela temporal na qual o grupo *sham* passou por uma cirurgia simulada com inoculação de PBS. O grupo tumor foi submetido à inoculação tumoral na semana 2, mesma janela temporal na qual o grupo mastectomizado foi submetido à remoção cirúrgica do tumor e o grupo *sham* passou por uma cirurgia simulada dessa remoção. O subconjunto neuroinflamação (n=4 animais/grupo) foi submetido à eutanásia e teve seus tecidos coletados no dia 5 após o início das avaliações comportamentais. As medidas comportamentais foram iniciadas na semana 5, sendo que para o teste do campo aberto (CA) os animais foram divididos em 2 dias (n=5 animais/grupo/dia; dias +1-2). No dia +3 foi realizado o teste da alternância espontânea (AE; n=10-12 animais/grupo). No dia +4 foi realizado o teste do reconhecimento do objeto (RO; n=10-12 animais/grupo). Todos os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram seus tecidos coletados no dia +5, nas respectivas fases do ciclo claro-escuro (n=10-12 animais/grupo). 67

Figura 17. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral no comportamento do tipo ansioso e na fadiga nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média $\pm$ SEM; (A) Distância total percorrida no teste de campo aberto. (B) Percentual do tempo gasto explorando o centro da arena, (n = 10-12 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação grupo *sham* na mesma fase do ciclo claro-escuro por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*; # $p < 0,05$ em relação à fase clara por *2-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*. 73

Figura 18. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral no desempenho cognitivo no teste de aprendizado e memória espacial avaliados através do comportamento de alternância espontânea no labirinto em Y nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média $\pm$ SEM; (A) Distância total percorrida (m), (B) porcentagem de alternâncias espontâneas (n = 10-12 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros grupos na mesma fase do ciclo claro-escuro por *1-way ANOVA* com *post*

- hoc de Bonferroni*; # $p < 0,05$ em relação à fase clara por 2-way ANOVA com *post hoc de Bonferroni*..... 74
- Figura 19. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral no desempenho cognitivo no teste de reconhecimento do objeto nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média±SEM; (A) Índice total de discriminação, (B) investigação total (segundos), (C) investigação do objeto familiar (segundos), (D) investigação do novo objeto (segundos); * $p < 0,05$ em relação aos outros grupos na mesma fase do ciclo claro-escuro por 1-way ANOVA com *post hoc de Bonferroni*; # $p < 0,05$ em relação à fase clara por 2-way ANOVA com *post hoc de Bonferroni* (n = 10-12 animais/grupo)..... 76
- Figura 20. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral nos níveis de LBP nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média ± SEM dos níveis de LBP (ng/ml) circulantes no plasma nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado nas fases clara e escura, respectivamente (n=10-12 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*; # $p < 0,05$ grupo tumor em relação ao mastectomizado por 2-way ANOVA com *post hoc de Bonferroni*. 77
- Figura 21. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na expressão de genes da resposta imune inata e adaptativa nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Análise da expressão gênica integrada gerada pela análise de dados do RT² PCR Array (SABiosciences, EUA). O clustergrama cria um mapa de calor com dendrogramas indicando os genes que são corregulados entre os grupos *sham*, tumor e mastectomizado. A saturação de cor reflete a magnitude da mudança na expressão gênica. Os genes regulados positivamente e negativamente estão representados em vermelho e verde, respectivamente. O eixo x indica os grupos (control: *sham*/claro; 1: tumor/claro; 2: mastectomizado/claro; 3: *sham*/escuro; 4: tumor/escuro e 5 mastectomizado/escuro) e o eixo y indica os genes. As setas representam os genes nos quais foram observadas diferenças significativas por 2-way ANOVA entre os grupos tumorais ou fases do ciclo claro-escuro em relação ao grupo *sham* ($p < 0,05$); (n=3-4 animais/grupo); as setas hachuradas representam genes nos quais foram observadas diferenças significativas por 2-way ANOVA, mas com um grande número de amostras indeterminadas requerendo assim futuras confirmações. O clustergrama representado foi feito em <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com.br/pcr/arrayanalysis.php>..... 80
- Figura 22. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral nos níveis de expressão de genes inflamatórios nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média ± SEM da expressão gênica quantitativa de *Il-1α* (A), *Il1r1* (B) *Lyz2* (C), *Rorc* (D) e *Icam1*(E) no cérebro (macerado de hipocampo e córtex pré-frontal) nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado nas diferentes fases do ciclo claro-escuro (n=3-4

animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*; ou # $p < 0,05$ em relação ao grupo mastectomizado por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni..... 81

Figura 23. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na ritmicidade de expressão de genes inflamatórios no cérebro. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Myd88* (A), *Cd4* (B) e *C3* (C) no cérebro (macerado de hipocampo e córtex pré-frontal) nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=3-4 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*; & $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo na fase clara; # $p < 0,05$ mastectomizado em relação aos grupos *sham* e tumor por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni. 82

Figura 24. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral sobre a expressão de genes que regulam ou são regulados pelos relógios biológicos nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Análise da expressão gênica integrada gerada pela análise de dados do RT² PCR Array (SABiosciences, EUA). O clustergrama cria um mapa de calor com dendrogramas indicando os genes que são corregulados entre os grupos *sham*, tumor e mastectomizado. A saturação de cor reflete a magnitude da mudança na expressão gênica. Os genes regulados positivamente e negativamente estão representados em vermelho e verde, respectivamente. O eixo x indica os grupos (*control*: *sham*/claro; 1: tumor/claro; 2: mastectomizado/claro; 3: *sham*/escuro; 4: tumor/escuro e 5 mastectomizado/escuro) e o eixo y indica os genes (n=4 animais/grupo). As setas representam os genes nos quais foram observadas diferenças significativas por 2-way ANOVA entre os grupos tumorais ou fases do ciclo claro-escuro em relação ao grupo *sham* ($p < 0,05$); as setas hachuradas representam genes nos quais foram observadas diferenças significativas por 2-way ANOVA, mas com um grande número de amostras indeterminadas requerendo assim futuras confirmações. O clustergrama representado foi feito em <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com.br/pcr/arrayanalysis.php>. 84

Figura 25. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral nos níveis de expressão de genes relacionados aos ritmos biológicos nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Alas1* (A), *Aanat* (B), *Camk2b* (C), *Irf1* (D), *Mat2a* (E), *Nr1d2* (F), *Prkar1* (G), *Prkar2* (H), *Sp1* (I), *Tef* (J), e *Tgfb1* (K) no hipotálamo dos grupos *sham*, tumor e mastectomizado nas diferentes fases do ciclo claro-escuro (n=3-4 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*; ou # $p < 0,05$ em relação ao grupo mastectomizado; & $p < 0,05$ tumor em relação aos grupos *sham* e mastectomizado por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni. 85

Figura 26. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na sincronização da expressão de genes que regulam os ritmos biológicos no hipotálamo. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Clock* (A), *Arntl* (B) *Per1* (C), *Per2* (D) e *Per3*

(E) no hipotálamo nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=3-4 animais/grupo); $p>0,05$ em todos os casos por 2-way-ANOVA. 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aanat- do inglês, Arylalkylamine N-acetyltransferase (enzima taxa-limitante na síntese de melatonina)

Alas1- do inglês, Aminolevulinic acid synthase 1 (enzima taxa-limitante da biossíntese do heme)

Arntl- do inglês, Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like

BMAL1- do inglês, Brain and muscle Arnt-like protein-1

C3- do inglês, Complement component 3

Camk2b- do inglês, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta

Ccl2- do inglês, Chemokine (C-C motif) ligand 2

Cd11b- do inglês, Cluster of differentiation 11b

Cd4- do inglês, CD4 antigen

cDNA- do inglês, complementary DNA

CLOCK- do inglês, Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

CXCL- Receptor de quimiocinas CXC

DNA- do inglês, Deoxyribonucleic Acid

HER-2- do inglês, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HHA- Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

Hprt- do inglês, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1

Icam1- do inglês, Intercellular adhesion molecule 1

IFN- Interferon

IL- Interleucina

Il1r1- do inglês, Interleukin 1 receptor, type I

Irf1- do inglês, Interferon regulatory factor 1

Kg- Quilograma

LBP – do inglês, Lipopolysaccharide Binding Protein

LPS – Lipopolissacarídeo

Lyz2– do inglês, Lysozyme 2

MAPK- do inglês, Mitogen-activated protein kinases

Mat2a- do inglês, Methionine adenosyltransferase II, alpha

MDSC- do inglês, myeloid derived suppressor cells

Mtnr1a- do inglês, Melatonin receptor 1A

Mtnr1b- do inglês, Melatonin receptor 1B

µl- Microlitro

µM- Micromolar

MDSCs – do inglês, Myeloid-Derived Suppressor Cells

MyD88- do inglês, Myeloid Differentiation Primary Response 88

Mg- Miligrama

MHC- do inglês, Major Histocompatibility Complex

mM- Milimolar

NK- do inglês, natural killer

NOD- do inglês, Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein

Nr1d1- do inglês, Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1, também conhecido como Rev-Erbα

Nr1d2- do inglês, Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2, também conhecido como Rev-Erb β

PBMCs- do inglês, Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS- do inglês, Phosphate Buffered Saline

Prkar1a- do inglês, Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha

Prkar2a- do inglês, Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II, alpha

qPCR- do inglês, “quantitative Real-time polymerase chain reaction”

RNA- do inglês, Ribonucleic Acid

Rorc- do inglês, RAR-related orphan receptor gamma

SBF- Soro bovino fetal

SCN- do inglês, Suprachiasmatic Nucleus

Sp1- do inglês, Trans-acting transcription factor 1

STAT- do inglês, Signal transducer and activator of transcription

TAAs- do inglês, Tumor-Associated Antigens

TCR- Receptor de célula T

Tef- do inglês, Thyrotroph embryonic factor

TGF- β - do inglês Transforming growth factor beta

Th- do inglês, T helper

Tlr- do inglês Toll like receptor

TNF- α - Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
1.1 Câncer de mama	28
1.1.1 Epidemiologia, etiologia e tratamento.....	28
1.2 Inflamação e câncer	29
1.3 Neuroimunologia das comorbidades comportamentais associadas ao câncer.....	31
OBJETIVO	37
2.1 Objetivo geral 1	37
2.2 Objetivos específicos 1	37
2.3 Objetivo geral 2	37
2.4 Objetivos específicos 2.....	38
MATERIAL E MÉTODOS 1	39
3.1 Animais experimentais	40
3.2 Linhagem de células e carcinoma mamário murino.....	40
3.3 Modelo de indução de tumor mamário.....	40
3.4 Modelo de remoção de tumor mamário.....	41
3.5 Delineamento experimental 1	42
3.6 Registros teleméricos.....	43
3.7 Indução de inflamação aguda	43
3.8 Comportamento doentio – (do inglês <i>Sickness behavior</i>)	44
3.9 Coleta de tecidos e análise moleculares	44
3.10 Concentrações plasmáticas de citocinas	44
3.11 Concentrações plasmáticas de corticosterona.....	45
3.12 Concentrações encefálicas de citocinas	45
3.13 Análise estatística	45
RESULTADOS 1.....	47
4.1 Comportamento doentio	48

4.1.1 Efeito do LPS sobre a massa corporal e ingesta alimentar na presença de tumor ou em animais mastectomizados.	48
4.1.2 Efeito do LPS sobre a atividade locomotora na presença de tumor ou em animais mastectomizados.....	50
4.1.3 Efeito do LPS sobre a resposta de febre e hipotermia na presença de tumor ou em animais mastectomizados.	52
4.2 Efeito do LPS sobre a Massa tumoral	54
4.3 Efeito do LPS sobre as concentrações plasmáticas de citocinas na presença de tumor ou em animais mastectomizados.	55
4.4 Efeito do LPS sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona na presença de tumor ou em animais mastectomizados.	57
4.5 Efeito do LPS sobre os níveis de expressão de citocinas em estruturas encefálicas na presença de tumor ou em animais mastectomizados.	58
4.5.1 <i>Il-1β</i>	58
4.5.2 <i>Il-6</i>	59
4.5.3 <i>Tnf-α</i>	61
4.5.4 <i>Cd11b</i>	62
MATERIAL E MÉTODOS 2	65
5.1 Animais experimentais	66
5.2 Modelo de indução e remoção de tumor mamário	66
5.3 Delineamento experimental 2	67
5.4.1 Campo aberto.....	68
5.4.2 Teste de alternância espontânea no labirinto em Y	68
5.4.3 Teste de reconhecimento de objetos	69
5.5 Coleta de tecidos.....	69
5.6 Concentrações plasmáticas da proteína ligadora de LPS (LBP)	70
5.7 RT-PCR <i>array</i> quantitativo	70
5.7.1 – Genes da resposta imune inata e adaptativa	70
5.7.2 Genes relacionados ao controle do ciclo circadiano.....	71
5.8 Análise estatística	71
RESULTADOS 2	72

6.1 Avaliação comportamental	73
6.1.1 Campo aberto.....	73
6.1.2 Teste de alternância espontânea no labirinto em Y	73
6.1.3 Teste de reconhecimento de novos objetos	75
6.2 Concentrações plasmáticas da proteína ligante de LPS (LBP)	76
6.3 Perfil de expressão de genes da resposta imune inata e adaptativa	77
6.3.1 Perfil global de expressão gênica	77
6.3.2 Efeitos da presença ou remoção tumoral sobre a expressão de genes inflamatórios no cérebro observados durante as fases clara e escura	80
6.3.3 Tumores induzem perda do ritmo circadiano de expressão de <i>Cd4</i> e <i>Myd88</i>	81
6.4 Perfil de expressão de genes de controle do relógio circadiano	82
6.4.1 Perfil global de expressão gênica	82
6.4.1.2 Efeitos da presença ou remoção tumoral sobre a expressão de genes relacionados aos ritmos biológicos no hipotálamo	84
DISCUSSÃO	87
CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS	102

INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

1.1.1 Epidemiologia, etiologia e tratamento

O câncer de mama é a neoplasia mais prevalente em mulheres no mundo, respondendo por cerca de 1,67 milhões de novos casos e 500 mil mortes por câncer no ano de 2012 (Ferlay et al. 2015), gerando elevado ônus psicossocial e econômico e constituindo importante questão global de saúde pública. No Brasil, é o tipo de câncer mais frequente na população feminina, tendo causado 15.403 óbitos no ano de 2015 e há uma estimativa de ocorrerem aproximadamente 59.700 novos casos para o biênio 2018-2019 (INCA 2018).

A maioria dos tumores mamários ocorre de forma esporádica, envolvendo mutações somáticas e instabilidades genéticas que ativam oncogenes ou inibem genes supressores tumorais, bem como genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA, favorecendo assim a proliferação celular exacerbada, o estabelecimento e a progressão tumoral (Schmitt 2003; Lee e Muller 2010). O câncer de mama não é uma entidade nosológica única, mas sim um conjunto de doenças de morfologia heterogênea e etiologia multifatorial, o qual é influenciado tanto por fatores endógenos quanto exógenos (Provenzano, Ulaner, e Chin 2018). Dentre os fatores de risco destacam-se a idade, uma vez que 80% dos casos ocorrem em mulheres acima de 50 anos (Davies 2016), além de fatores endócrinos, vida reprodutiva (menarca precoce, nuliparidade, uso de contraceptivos orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal), comportamento e estilo de vida (hábitos alimentares, consumo de álcool e/ou prática de exercícios físicos) e histórico familiar de câncer de mama (INCA 2018). Embora as mutações dos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2, transmitidas na herança genética familiar, confirmem uma elevada predisposição - 40 a 85% - ao câncer de mama por toda a vida, o fator hereditário responde somente por aproximadamente 5% dos casos (Davies 2016).

O câncer de mama é caracterizado pela formação de tumores sólidos a partir de células epiteliais (carcinomas), que se originam nos ductos (carcinoma ductal; 70-80% dos casos) ou nas glândulas mamárias (carcinoma lobular), os quais são denominados como *in situ* enquanto permanecem na camada tecidual onde se desenvolveram, ou invasivos, quando se propagam

para as camadas adjacentes e se tornam capazes de invadir outros tecidos (Provenzano, Ulaner, e Chin 2018).

A escolha do tratamento para o câncer de mama varia de acordo com o estadiamento da doença (tamanho do tumor e acometimento dos linfonodos regionais), características biológicas do tumor, tais como expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona, bem como fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2), presença de metástase e preferência da paciente. Quando diagnosticado nos estádios mais iniciais normalmente é feita uma intervenção cirúrgica, que pode ser conservadora (restrita ao tumor, acrescida de uma margem de tecido normal circundante) ou mais radical, com a retirada completa da mama e dos linfonodos da região axilar. Para reduzir o risco de recidiva, bem como melhorar a sobrevida, a intervenção cirúrgica é acompanhada de tratamentos adjuvantes, cuja escolha depende das características biológicas do tumor e incluem a radioterapia, hormônio-terapia, quimioterapia ou imunoterapia (Davies 2016).

1.2 Inflamação e câncer

O processo de desenvolvimento tumoral é denominado tumorigênese e classicamente dividido em iniciação, promoção e progressão metastática (Hanahan e Weinberg 2011). Todas as etapas deste processo são influenciadas por inflamação (Grivennikov, Greten, e Karin 2010). Deveras, a relação entre inflamação e câncer é relatada desde Rudolph Virchow que, ainda no século XIX, notou a presença de leucócitos em tecidos neoplásicos (Balkwill e Mantovani 2001), sugerindo que elementos teciduais não cancerosos podem afetar a formação e o crescimento de tumores e que o câncer originar-se-ia em locais de inflamação crônica. Não obstante, o papel do sistema imune durante o desenvolvimento do câncer é multifatorial e complexo, podendo exibir papéis tanto pró quanto antitumorais (Candido e Hagemann 2013).

Em tumores sólidos, é descrito que ao longo da tumorigênese as células transformadas e seu estroma circundante (fibroblastos, células endoteliais e células mesenquimais, entre outras) secretam citocinas, que por sua vez atraem células inflamatórias [tais como macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK), células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs), bem como células do sistema imune adaptativo], colaborando para a formação do microambiente tumoral inflamatório, que podem favorecer o crescimento,

progressão e metástase tumoral (Gabrilovich e Nagaraj 2009). No entanto, a expressão dos diversos mediadores e moduladores imunes é que determina em que direção o balanço entre inflamação promotora de tumor ou imunidade antitumoral irá seguir (Grivennikov, Greten, e Karin 2010). Ao longo do processo tumorigênico os componentes do microambiente tumoral e o sistema imune estabelecem complexas interações, de modo que, embora a resposta de defesa do hospedeiro atue na eliminação das células tumorais, ela também seleciona tumores menos imunogênicos em um processo conhecido como imunoeedição (Dunn et al. 2002).

A imunoeedição é um processo dinâmico dividido em três fases conhecidas como os três “Es” da imunoeedição: eliminação, equilíbrio e escape (Dunn et al. 2002). Na fase de eliminação, componentes da imunidade inata e adaptativa atuam em conjunto reconhecendo e eliminando as células transformadas (Reilly et al. 2016). Inúmeros estudos utilizando diferentes abordagens genéticas e de biologia molecular revelaram que, ao serem expostos à carcinógenos, camundongos imunocomprometidos desenvolvem tumores mais rapidamente do que animais imunocompetentes (Mittal et al. 2015; Shankaran et al. 2001). Nessa fase inicial, a resposta efetora de células NK e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos é fundamental para a eliminação das células tumorais. Os linfócitos T CD8⁺ identificam as células transformadas através do reconhecimento de antígenos tumorais via MHC de classe I (MHC-I). Para se esquivar do reconhecimento pelo sistema imune adaptativo, as células tumorais reduzem a expressão de MHC-I (Reilly et al. 2016). No entanto, a presença de moléculas de MHC-I é essencial para inibir a atividade citotóxica de células NK contra tecidos saudáveis por meio da ativação de receptores inibitórios (tais como os receptores de lectina tipo C - NKG2A/CD94), que suprimem a ativação das células NK (Long e Rajagopalan 2002). Desse modo, a perda de MHC-I impede a supressão das células NK, que podem assim eliminar as células transformadas. As células NK também reconhecem antígenos tumorais por meio da ativação de receptores NKG2D, que se ligam com alta afinidade a ligantes induzidos por estresses celulares, desencadeando citotoxicidade contra a célula tumoral (Long e Rajagopalan 2002). Adicionalmente, a sinalização por interferons do tipo I (IFN- α/β) e II (IFN- γ) é fundamental para o desenvolvimento de uma resposta antitumoral eficiente. O IFN- γ , produzido por diferentes células do microambiente tumoral (em especial células NK e linfócitos T CD8⁺), induz potentes respostas antitumorais por aumentar as funções citotóxicas, a antigenicidade das células tumorais (pelo aumento da expressão de MHC-I) e a indução de apoptose nas células transformadas (Mojic, Takeda, e Hayakawa 2018), entre outras funções. Já os IFNs do

tipo I são necessários para aumentar a função de células dendríticas na apresentação cruzada de antígenos tumorais aos linfócitos T CD8⁺ (Diamond et al. 2011), a qual é essencial para a eliminação do tumor.

A fase de equilíbrio é a menos compreendida entre as fases da imunoedição, mas os escassos trabalhos na literatura indicam que as células tumorais que sobreviveram à fase de eliminação entram em estado de latência, no qual tumor e sistema imune permanecem em equilíbrio dinâmico (Dunn et al. 2002). Evidências provenientes de um modelo animal de fibrossarcoma indicam que essa dormência tumoral é mediada pela resposta imune adaptativa (Koebel et al. 2007). Nesta fase o sistema imune exerce uma forte pressão de seleção que resulta em tumores menos imunogênicos (Schreiber 2014).

Na fase de escape os tumores evadem as respostas imunológicas, que não mais conseguem conter o crescimento tumoral. As células tumorais escapam da resposta imune por meio de inúmeros mecanismos, tais como a redução na expressão de antígenos tumorais, MHC-I e moléculas co-estimuladoras e a liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β) e pró-angiogênicas (VEGF, TGF- β , IL-6, M-CSF) que estabelecem um microambiente tumoral imunossupressor, o qual induz a progressão tumoral e invasão tecidual (Schreiber 2014). Além disso, a resposta efetora de células T é suprimida pelo aumento na expressão de moléculas inibidoras de superfície, como CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) e PD-1 (Programmed Death 1), bem como pela infiltração de células T reguladoras (T reg Foxp3⁺), MDSCs e macrófagos associados ao tumor, favorecendo assim o crescimento e metástase tumoral (Gabrilovich e Nagaraj 2009; Mittal et al. 2015; Schreiber 2014).

1.3 Neuroimunologia das comorbidades comportamentais associadas ao câncer

Além de contribuírem para o desenvolvimento tumoral propriamente dito, os mediadores e células inflamatórias podem ainda influenciar a sinalização neuroimune, induzindo alterações comportamentais e comorbidades neuropsiquiátricas (McAfoose e Baune 2009). Os avanços no diagnóstico e tratamento do câncer têm proporcionado um aumento substancial na população de sobreviventes de câncer. Enquanto a taxa de sobrevida ao câncer de mama é de cerca de 90% (Howlader et al., 2016) em países desenvolvidos, no

Brasil essa taxa aumentou em 9,5% entre os anos de 2000 e 2014, atingindo a marca de 75% (Allemani et al. 2018). No entanto, as sequelas advindas da experiência tumoral permanecem a longo prazo, gerando elevado ônus psicossocial e econômico e representam novos desafios na busca de qualidade de vida para esta população. Dentre essas sequelas estão sintomas mentais persistentes como depressão (9-65% de prevalência), ansiedade (18-33%) e deficiências cognitivas (15- 60%) (Maass et al. 2015; Wefel et al. 2015; Reid-Arndt, Hsieh, e Perry 2010).

Evidências provenientes de modelos animais de câncer indicam que tumores periféricos causam alterações neuroinflamatórias e comportamentais (Pyter et al. 2010, 2009; Yang et al. 2014; Lebeña A, Vegas O, Gómez-Lázaro E, Arregi A, Garmendia L, Beitia G 2014; Norden et al. 2015), semelhantes ao “*priming*” neuroinflamatório observado em outros contextos de saúde, como no estresse crônico. Nesses contextos, o “*priming*” resulta na redução do limiar para ativação subsequente dessas vias, resultando em neuroinflamação exacerbada ou patológica e consequências comportamentais negativas (Herman e Pasinetti 2018). De fato, pacientes oncológicos em tratamento e sobreviventes apresentam respostas alteradas diante de desafios fisiológicos e psicológicos agudos, mesmo após o tratamento e remissão completa do tumor (Pyter 2016). Alterações persistentes na responsividade imune, em particular, podem contribuir para os debilitantes problemas de qualidade de vida enfrentados pelos sobreviventes (Duric et al. 2016). Deveras, a ativação imune periférica induz a ativação imune no cérebro e está implicada em condições psiquiátricas relevantes tanto para os pacientes em tratamento quanto para os sobreviventes do câncer (Bower 2014), incluindo fadiga, depressão e deficiências cognitivas (Maes et al. 2012). Embora o tratamento quimioterápico seja frequentemente apontado como uma possível causa de consequências psicológicas nestas populações, evidências indicam que a biologia tumoral também contribui para essas comorbidades, uma vez que estas são observadas mesmo previamente aos tratamentos do câncer (Miranda et al. 2014; Cimprich et al. 2010; Ahles et al. 2008; Hermelink et al. 2015; Kesler et al. 2017; Wefel et al. 2004; Vin-Raviv et al. 2013).

Embora as comorbidades neuropsiquiátricas sejam classicamente relacionadas a alterações nos sistemas neurotransmissores (Nishida et al. 2002), diversos trabalhos implicam os sistemas endócrino e imunológico na etiologia destes transtornos (Hernandez et al. 2013; Castren, Voikar, e Rantamaki 2007; Capuron e Dantzer 2003; Felger e Lotrich 2013; Singhal et al. 2014; Kreisel et al. 2013), sugerindo um papel causal para a inflamação subjacente ao

desenvolvimento tumoral na gênese dessas comorbidades. Não obstante, os efeitos de diferentes tumores sobre as funções cerebrais permanecem ainda pouco compreendidos (Yang et al. 2014; Schrepf, Lutgendorf, e Pyter 2015). Embora muitos trabalhos na literatura tentem elucidar os mecanismos pelos quais o estresse influencia e facilita a progressão tumoral (Azpiroz et al. 2008; Armaiz-pena et al. 2013; Lamkin et al. 2012; Volden e Conzen 2013), a investigação dos mecanismos pelos quais os tumores alteram essas respostas é bastante escassa.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é de grande importância nas respostas adaptativas a situações de estresse, tanto de origem externa quanto interna. Tanto pacientes com transtornos psiquiátricos como depressão, quanto roedores expostos a diferentes estressores apresentam alterações nos níveis circulantes de glicocorticoides (cortisol e corticosterona, respectivamente), as quais incluem aumento, redução ou perda do ritmo circadiano de liberação destes hormônios (Czeh et al. 2001; Hernandez et al. 2013; Felger e Lotrich 2013; Raison e Miller 2003), o que influencia as respostas fisiológicas adaptativas frente a agentes estressores. Além disso, a inflamação crônica induzida pelo processo tumorigênico pode influenciar estas respostas neuroendócrinas pelas vias neural ou humoral (Quan 2014). Visto que a adequada sinalização por glicocorticoides é necessária para a manutenção da homeostasia em situações de estresse, disfunções no eixo HHA induzidas por tumores podem contribuir para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos associados a disfunções imunológicas (A. H. Miller e Raison 2016; Felger e Lotrich 2013). Além disso, o tratamento a longo-prazo com corticosteroides em pacientes com câncer está associado à alta incidência de depressão (Judd et al. 2014; Brown e Chandler 2001). Alternativamente, os tumores podem ainda alterar a amplitude, ou mesmo interromper, a ritmicidade circadiana de glicocorticoides e/ou mediadores inflamatórios por efeitos diretos no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (SCN) (Pyter 2016).

Em mamíferos, o SCN é o marcapasso central que regula a ritmicidade circadiana ao receber e processar informações ambientais (agentes sincronizadores, *Zeitgeber Time* – ZT), como informações térmicas ou luminosas, e sincroniza os relógios endógenos centrais e periféricos (Buhr e Takahashi 2013), ajustando comportamentos e processos fisiológicos às alterações ambientais. Os relógios circadianos regulam as mais diversas funções fisiológicas, como o ciclo sono-vigília (Wulff et al. 2009), o ciclo celular (B. H. Miller et al. 2007), a temperatura corporal (Aschoff 1983), os sistemas que regulam a resposta ao estresse, como o

eixo HHA e o sistema nervoso autônomo (Koch et al. 2017), bem como o sistema imune (Castanon-Cervantes et al. 2010b), de modo que a ritmicidade circadiana é fundamental para a manutenção da homeostase. Os ritmos circadianos oscilam de maneira autossustentada em um ciclo de retroalimentação composto por elementos positivos, como o gene *Clock* (do inglês, *circadian locomotor output cycles kaput*), cujo fator de transcrição se dimeriza com *Bmal1* (do inglês, *brain and muscle Arnt-like protein*), induzindo a expressão das proteínas PERIOD (PER) e CRYPTOCHROME (CRY), as quais, por sua vez, atuam como reguladores negativos de CLOCK-BMAL1 (Koch et al. 2017). O heterodímero CLOCK-BMAL1 também ativa a transcrição de *Rev-Erba* e *Rora*, cujas proteínas se ligam competitivamente aos elementos responsivos ao ROR presentes no promotor de *Bmal1*; enquanto ROR ativa a transcrição do gene *Bmal1*, o mesmo é inibido por REV-ERB α (Koch et al. 2017). Estas oscilações regulam o aumento/redução da expressão de inúmeros genes, com intervalos de aproximadamente 12 horas entre si, cujo ciclo completo dura em média 24 horas e constituem a base molecular do relógio biológico que gera os ritmos circadianos endógenos (Curtis et al. 2014).

Evidências recentes indicam que o sistema imunológico pode responder aos desafios de maneira rítmica, dada a existência de mecanismos funcionais de regulação do relógio molecular em macrófagos, células dendríticas e células B (Silver et al. 2012). Além disso, a deleção do gene *Arntl* especificamente em monócitos abole os ritmos de *Arntl* e *Nr1d1* (do inglês, *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*) nestas células, bem como as variações diurnas no número de monócitos na circulação e no baço, além de exacerbar a resposta inflamatória (IL-1 β , IL-6, IFN- γ e CCL2) frente à infecção com *Listeria monocytogenes*, demonstrando que as oscilações circadianas desempenham um papel regulador “anti-inflamatório” ao limitar a transcrição de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas (Nguyen et al. 2013). Evidências indicam ainda que a sincronização entre o relógio central do SCN e os relógios periféricos possa ser, pelo menos em parte, mediada pelo eixo HHA e sistema nervoso autônomo (SNA), através das flutuações circadianas dos hormônios glicocorticoides e das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), que supostamente atuariam como sincronizadores para os relógios periféricos, incluindo as células imunes (Guo et al. 2018; Curtis et al. 2014; Kalsbeek et al. 2012).

Uma vez que os relógios circadianos endógenos, em especial BMAL1, CLOCK e REV-ERB α , também regulam o ciclo celular, a dessincronização dos ritmos circadianos pode influenciar direta ou indiretamente o processo tumorigênico e tem sido associada ao

desenvolvimento de câncer colorretal metastático, osteossarcoma e câncer de mama, entre outros (Filipski et al. 2002; Blakeman et al. 2016). Os efeitos da ruptura do ritmo circadiano em pacientes oncológicos persistem na sobrevivência e têm sido associados à prejudicada resposta imune e ao estresse, bem como em comorbidades psiquiátricas como a depressão em sobreviventes de câncer de mama (Sephton et al. 2009; Bower 2011; Bower et al. 2005, 2007).

Adicionalmente, a ativação das células imunes inatas no sistema nervoso central – micróglia residente – pode estar envolvida nas alterações neuroinflamatórias subjacentes a essas comorbidades, uma vez que a ativação da micróglia e consequente neuroinflamação têm sido implicadas na patogênese de múltiplas doenças neurológicas e transtornos psiquiátricos, como a depressão, esclerose múltipla, senescência e doença de Alzheimer (Pimplikar 2014; Giannetti et al. 2014; Ownby 2010; Walker et al. 2013). Embora as células da micróglia, astrócitos e oligodendrócitos expressem constitutivamente receptores de reconhecimento padrão, tais como *Toll-like receptors* (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) em todo o encéfalo (Hanke e Kielian 2011), as consequências neuroimunes e comportamentais da ativação destas vias de sinalização no contexto do câncer permanecem desconhecidas.

Compreender como tumores podem modular o funcionamento do sistema imunológico tem potencial relevância não apenas para aumentar a sobrevida de pacientes oncológicos, mas também melhorar a saúde mental e física a longo prazo dos sobreviventes de câncer. De fato, alterações duradouras induzidas por câncer podem fragilizar o sistema imunológico, levando a uma maior suscetibilidade a doenças subsequentes ou aumentando o tempo necessário para a recuperação. Neste sentido, modelos experimentais de câncer têm sido úteis para delinear como a inflamação periférica leva à neuroinflamação, assim como a deficiências cognitivas e alterações de comportamentos do tipo afetivo (Dantzer, Meagher, e Cleeland 2012). Buscando elucidar como o câncer altera as respostas neuroimunes, um estudo anterior mostrou que tumores exacerbam as respostas neuroinflamatórias frente à uma infecção periférica mimética (lipopolissacarídeo, LPS) em um modelo de câncer de mama induzido por carcinógeno em ratos (Pyter et al. 2014). Corroborando estas evidências, o desafio imune com LPS induz exacerbação da resposta neuroinflamatória e do comportamento doentio em um modelo murino de tumor de cabeça e pescoço (Vichaya et al. 2017). Para avançar neste conhecimento, o presente estudo buscou primeiramente determinar a extensão em que tumores induzem

alterações neuroinflamatórias após desafio imune com LPS e suas potenciais consequências funcionais no comportamento doentio.

Dada a enorme e crescente população de sobreviventes de câncer, a identificação dos mecanismos subjacentes aos efeitos colaterais de longa duração relacionados à experiência tumoral faz-se necessária tanto para desenvolver intervenções como para prevenir prejuízos na qualidade de vida desses sobreviventes. Assim, modelos animais que avaliem as mudanças persistentes após a remoção bem-sucedida do tumor são imperativos. Assim, buscamos ainda avaliar as alterações imunes e comportamentais duradouras induzidas por tumores mamários nas diferentes fases do ciclo claro-escuro e se estas estão correlacionadas com alterações na expressão de genes que regulam os ritmos biológicos no hipotálamo. Para tal, foi utilizado um modelo murino de "sobrevivência" ao câncer de mama, pioneiramente desenvolvido por Pyter et al. (2017). Compreender como a experiência tumoral influencia o eixo neuroimune basal, bem como a sua responsividade a desafios subsequentes, tem relevância potencial para o delineamento de terapias que contemplem a saúde mental e física de pacientes com câncer e sobreviventes.

OBJETIVO

2.1 Objetivo geral 1

Avaliar se tumores influenciam o eixo neuroimunoendócrino e a indução de comportamento doentio (“*sickness behavior*”) após desafio imune com LPS. Ainda, avaliar se a remoção cirúrgica do tumor é suficiente para reverter estas alterações.

2.2 Objetivos específicos 1

Avaliar se a presença de tumor periférico exacerba a resposta ao desafio imune com LPS nos seguintes parâmetros:

- Comportamentos doentios (febre, letargia, ingestão alimentar e ganho de massa corpórea);
- Os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e CXCL1) no plasma e (IL-1, IL-6, TNF- α), bem como do marcador *Cd11b* nas estruturas encefálicas relevantes para os comportamentos doentios (córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo);
- Os níveis de corticosterona plasmática.

Avaliar se a mastectomia (remoção cirúrgica do tumor) influencia os parâmetros descritos acima.

2.3 Objetivo geral 2

Investigar se tumores induzem alterações comportamentais, bem como neuroinflamação de maneira dependente do ciclo claro-escuro e se a remoção cirúrgica do tumor é suficiente para reverter estas alterações.

2.4 Objetivos específicos 2

Avaliar se a presença de tumor periférico está associada a:

- comportamento do tipo-ansioso;
- disfunções cognitivas;
- alterações na expressão de genes do relógio no hipotálamo;
- alterações nos ritmos endógenos de expressão de genes ligados às respostas imunes inatas e adaptativas no hipocampo e córtex pré-frontal.

Avaliar se a remoção cirúrgica do tumor influencia os parâmetros descritos acima.

MATERIAL E MÉTODOS 1

3.1 Animais experimentais

Os camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas, nulíparas de 8 a 9 semanas de idade (Charles River, Wilmington, MA, EUA; ver **Fig. 2** para o tamanho final das amostras), foram alojados individualmente e aclimatados ao biotério com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) por 1 semana sob um ciclo claro-escuro de 14:10 (luzes apagadas às 15h). Água e ração (Harlan 7912 foram disponibilizadas *ad libitum* durante todo o estudo e ninhos de algodão e cabanas de plástico foram fornecidos para nidificação. Todos os experimentos foram aprovados pelos Comitês Institucionais de Uso e Cuidados com Animais da *Ohio State University* e realizados de acordo com o Guia dos Institutos Nacionais de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NRC, 2011). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de camundongos usados. Este projeto consistiu em quatro replicações experimentais balanceadas pelo tratamento (duas para avaliação da neuroinflamação, duas para telemetria).

3.2 Linhagem de células e carcinoma mamário murino

A linhagem não metastática de carcinoma mamário murino 67NR, originária de um adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongos Balb/c (Aslakson e Miller, 1992; Dexter et al., 1978), foi generosamente fornecida pelos Drs. Fred Miller e Lisa Polin do Karmanos Cancer Institute. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de penicilina-streptomicina, 1 mM de aminoácidos não essenciais a 37°C com 5% de CO_2 .

3.3 Modelo de indução de tumor mamário

Antes e após a indução tumoral, os camundongos foram habituados à manipulação duas vezes/semana (n=108). Os camundongos foram anestesiados (vapores de isoflurano) e inoculados com 30 μl de uma suspensão celular de (5×10^6 células 67NR em matrigel) na 4ª almofada mamária (F. R. Miller, Medina, e Heppner 1981; F. R. Miller, Miller, e Heppner 1983). Esse procedimento resulta em um carcinoma mamário primário *in situ* (F. R. Miller,

Medina, e Heppner 1981) que não metastatiza (F. R. Miller, Miller, e Heppner 1983). Este é um modelo de câncer de mama ortotópico e singênico validado, que elimina a necessidade de usar camundongos imunocomprometidos (Pyter et al. 2017). Camundongos designados para o grupo de remoção do tumor (mastectomizado; n=53) foram inoculados com células tumorais duas semanas antes dos demais grupos, de modo que o tempo das cirurgias de remoção tumoral correspondeu ao tempo da cirurgia de indução de tumor/*sham* nos outros grupos. Concomitantemente, para controlar os efeitos das cirurgias (como reparo tecidual, anestesia), um subconjunto de camundongos controle (*sham*; n=49) foi inoculado com PBS e, posteriormente submetido à uma cirurgia simulada de remoção tumoral, permitindo avaliações comportamentais e fisiológicas simultâneas em todos os grupos. Os animais foram individualmente identificados por meio de perfurações feitas na orelha durante as cirurgias. A massa corporal e as dimensões do tumor foram medidas duas vezes por semana. Uma vez que a indução tumoral não foi bem-sucedida em 9 camundongos, estes animais foram removidos das análises.

3.4 Modelo de remoção de tumor mamário

Um procedimento modificado de mastectomia radical foi utilizado para remoção completa dos tumores primários no grupo “mastectomizados” (Pyter et al., 2017). Estes camundongos foram anestesiados (isoflurano) e os tumores, com as cápsulas intactas (**Fig. 1A e B**), foram removidos cirurgicamente juntamente com tecido mamário, gordura e linfonodos. A pele foi fechada com grampos cirúrgicos (**Fig. 1C**). Para analgesia no período pós-operatório, buprenorfina (0,05 mg/kg; s.c.) foi administrada imediatamente após a cirurgia e novamente 12 horas mais tarde. Remoções completas do tumor foram verificadas na necropsia e todos os camundongos com tumores recorrentes (n=8) foram removidos das análises. Os controles cirúrgicos receberam uma cirurgia de mastectomia simulada (*sham*).

Figura 1. Remoção de tumor mamário. Os animais do grupo mastectomizado foram submetidos à ressecção cirúrgica dos tumores (A) com as cápsulas intactas (B); a pele foi fechada com grampos cirúrgicos (C).

3.5 Delineamento experimental 1

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, de acordo com os protocolos de inoculação e remoção tumoral, respectivamente, conforme descrito na figura abaixo:

Figura 2. Delineamento experimental. Os animais do grupo mastectomizado foram submetidos à inoculação com as células tumorais da linhagem 67NR na semana 0, mesma janela temporal na qual os animais sham passaram por uma cirurgia simulada com inoculação de PBS. Os animais do grupo tumor foram submetidos à inoculação tumoral na semana 2, mesma janela temporal na qual os animais do grupo mastectomizado foram submetidos à remoção cirúrgica do tumor e os animais sham passaram por uma cirurgia simulada dessa remoção. Os animais do subconjunto neuroinflamação (n=10-20 animais/grupo) foram submetidos à eutansia e tiveram

seus tecidos coletados 4 ou 24 horas após a injeção com LPS/PBS. As medidas de comportamento doentio para os animais do subconjunto comportamento foram coletadas 24 horas antes e 0, 4 e 24 horas após a injeção com LPS/PBS; dados de ingestão alimentar e massa corporal foram coletados para todos os animais deste subconjunto (n=9-11 animais/grupo), enquanto locomoção e temperatura corporal foram medidos apenas para os animais implantados com transmissores teleméricos (n=7-9 animais/grupo); todos os animais do subconjunto comportamento foram submetidos à eutanásia e tiveram seus tecidos coletados 24 horas após a injeção com LPS/PBS. * representa a janela temporal para implantação de transmissor telemérico para um subconjunto de camundongos; ** representa a janela temporal para realização das medidas de comportamento doentio.

3.6 Registros teleméricos

Um subgrupo de camundongos foi alojado individualmente por uma semana e distribuído aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- (1) *sham*/PBS;
- (2) *sham*/LPS;
- (3) tumor/LPS;
- (4) mastectomizado (remoção tumoral) /LPS.

Este subconjunto foi então submetido à anestesia com isoflurano e implantado intraperitonealmente com transmissores teleméricos (G2 E-mitter; Starr Life Sciences, Oakmont, PA, EUA). Buprenorfina (0,05 mg/kg; s.c.) foi administrada imediatamente após a cirurgia e novamente a cada 4-6 horas por 72 horas após a cirurgia. Os transmissores teleméricos são sensores que capturam a energia do campo elétrico gerado por plataformas receptoras (receptor ER-4000, Starr Life Sciences) que recebem as informações dos sensores e as transmitem a um computador, onde são interpretadas por um software (Vital View, v. 5.1, Mini Mitter Company, Bend, OR, EUA). Caixas individuais foram colocadas sobre as plataformas receptoras que coletavam os dados de temperatura corporal e os sinais de atividade locomotora a cada um minuto. Estes dados foram convertidos em um registro longitudinal pelo próprio *software* e exportados para arquivos ASCII, onde foram processados para respectivas análises estatísticas.

3.7 Indução de inflamação aguda

Os camundongos foram injetados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; E. coli, 026:B6, 250 µg/kg em 100 µl de PBS, i.p.) às 08:00 h EST. Um subconjunto dos camundongos *sham* receberam 100 µl de PBS.

3.8 Comportamento doentio – (do inglês *Sickness behavior*)

A massa corporal, a ingestão de alimentos, a locomoção e a temperatura corporal (as duas últimas por meio dos transmissores implantados) foram registradas para um subconjunto de camundongos 4 e/ou 24 horas após a injeção com LPS. As medidas basais para estes parâmetros foram feitas 24 horas antes da injeção.

3.9 Coleta de tecidos e análise moleculares

Após decapitação rápida, o sangue foi coletado através de tubos de sangue natelson revestidos com heparina, mantidos em gelo e então centrifugados (20 min a 2.000 rpm); o plasma foi armazenado a -80°C até a quantificação de citocinas e corticosterona. As regiões encefálicas relevantes para o comportamento doentio (hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal) foram dissecadas e congeladas em solução estabilizadora de RNA (RNA later® - Qiagen) para posterior avaliação da expressão gênica neuroinflamatória. Os tumores e baços foram removidos assepticamente e pesados.

3.10 Concentrações plasmáticas de citocinas

Para comparação da inflamação sistêmica entre os diferentes tratamentos, interleucina (IL) 1β, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e quimioatraente de queratinócito (CXCL1) foram medidos em amostras de plasma usando um ensaio quantitativo fluorescente de multiplex (Mouse Inflammatory 4-Plex Invitrogen, Frederick, MD, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

3.11 Concentrações plasmáticas de corticosterona

Glicocorticoides são potentes agentes anti-inflamatórios inatos, os quais são produzidos em resposta à injeção periférica de LPS (Silverman et al. 2013). A fim de verificar se há alterações relativas à ativação do eixo HHA, a corticosterona foi medida em duplicata em amostras de plasma via ensaio imuno enzimático (EIA), de acordo com as instruções do fabricante (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, EUA). As amostras foram diluídas na proporção de 1:40 para a realização do EIA. O limiar de detecção foi de 27 pg / ml. As variações intra-ensaio e inter-ensaio foram <10%.

3.12 Concentrações encefálicas de citocinas

O RNA total foi extraído do hipocampo, do hipotálamo e do córtex pré-frontal utilizando mini kits da *Qiagen RNeasy* (Valencia, CA, EUA). As concentrações de RNA foram medidas e as razões 260/280 foram determinadas como sendo 1,8-2,0 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se os kits *SuperScript First-Strand* (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Quatro genes de interesse foram escolhidos com base em seu papel estabelecido no comportamento doente induzido por neuroinflamação (*Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf- α* , *Cd11b*). Os ensaios de expressão gênica *TaqMan* para camundongos foram comprados da *Applied Biosystems* (Carlsbad, CA, EUA) com sondas marcadas com 6-FAM e MGB (quencher não fluorescente) nas extremidades 5' e 3', respectivamente: *Il-1 β* (Mm00434228_m1), *Il-6* (Mm00446190_m1), *Tnf- α* (Mm00443258_m1), *Cd11b* (Mm00434455_m1), *Gapdh* (Mm99999915_g1; marcado com VIC). Foram utilizadas as condições universais de ciclos de RT-PCR de dois passos no sistema de detecção de sequências 7000 (Applied Biosystems): 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), 40 ciclos de 95°C (15 segundos) e 60°C (1 minuto). A expressão gênica relativa de amostras individuais corridas em duplicata foi calculada pelo método comparativo de C_T ($2^{-\Delta CT}$).

3.13 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a testes de homogeneidade de variância e analisados por testes não paramétricos quando as variáveis não apresentavam distribuição normal. Comparações estatísticas de massa corporal, ingestão de alimentos, massa tecidual, expressão gênica, citocinas circulantes e corticosterona foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma-via (*1-way ANOVA*, sendo tumor o fator) ou duas-vias (*2-way ANOVA*, sendo tumor e tempo os fatores) seguida por teste *post-hoc Bonferroni* ou *t-Student* usando o *software Statview* versão 5.0.1 (Scientific Computing, Cary, NC, EUA). O teste não paramétrico de *Mann-Whitney U* foi usado quando a variância não foi distribuída normalmente. ANOVAs de medidas repetidas foram utilizadas para comparar as mudanças na temperatura corporal e atividade locomotora ao longo do tempo. Correlações entre as variáveis foram avaliadas pelo teste de correlação de *Pearson*. Devido às diferenças detectadas entre os grupos controle e portadores de tumor/mastectomizados nas medidas basais de temperatura corporal, a influência da injeção de LPS na temperatura corporal foi calculada como uma mudança percentual em relação aos registros da temperatura basal (isto é, calculada em relação à temperatura registrada para o mesmo indivíduo 24 horas antes da injeção de LPS). Os dados foram determinados como estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$ e foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

RESULTADOS 1

4.1 Comportamento doentio

4.1.1 Efeito do LPS sobre a massa corporal e ingesta alimentar na presença de tumor ou em animais mastectomizados.

As medidas de referência para massa corporal e ingestão de alimentos não foram diferentes entre os grupos (**Fig. 3**; $p > 0,05$ por 1-way ANOVA com post hoc de Bonferroni).

Figura 3. Massa corporal e ingestão alimentar basal. Média ($\pm$ SEM) da massa corporal (g) e da ingestão alimentar (g) em um intervalo de 24 horas para camundongos do grupo sham, tumor e mastectomizados previamente ao desafio imune com LPS (n=9-19 animais/grupo).

O tratamento com LPS reduziu significativamente a massa corporal 24 horas após a injeção ($F_{1,37}=123,5$, $p < 0,0001$; **Fig. 4**). As alterações na massa corporal não diferiram entre os grupos tumor, mastectomizado e sham LPS em nenhum momento ($p > 0,05$).

Figura 4. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral sobre a perda de peso induzida por LPS. Média ($\pm$ SEM) da porcentagem de mudança na massa corporal para camundongos dos grupos *sham*, tumor e mastectomizado 4 e 24 horas após injeção i.p. com PBS ou LPS relativa à medida basal realizada no mesmo horário do dia 24 horas antes do desafio imune ($n=9-11$ animais/grupo). $*p \leq 0.05$ LPS comparado ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

A injeção de LPS alterou a ingestão de alimentos ($F_{1,37} = 13,4$, $p < 0,001$), induzindo anorexia em todos os grupos 4 ($F_{1,37}=16,2$, $p < 0,0005$; **Fig. 5**) e 24 horas ($F_{1,37}=34,3$, $p < 0,0001$; **Fig. 5**) após a injeção em relação ao grupo *sham* PBS. O tempo desde a injeção de LPS influenciou a ingestão de alimentos ($F_{1,37}=133,8$, $p < 0,0001$), de modo que a anorexia foi menos pronunciada 24 horas após o LPS em relação às medidas feitas 4 horas após a injeção. Dentre os grupos tratados com LPS (*sham*, tumor e mastectomizado), não foram observadas diferenças na ingestão alimentar 4 ou 24 horas após a injeção ($p > 0,05$).

Figura 5. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral sobre a anorexia induzida por LPS. Média ($\pm$ SEM) da porcentagem de mudança na ingestão alimentar para os grupos *sham*, tumor e mastectomizado 4 e 24 horas após injeção i.p. com PBS ou LPS relativa à medida basal realizada no mesmo horário do dia 24 horas antes do desafio imune (n=9-11 animais/grupo); * $p \leq 0.05$ LPS comparado ao grupo *sham* PBS por *1-way ANOVA* com *post hoc* de *Bonferroni*.

4.1.2 Efeito do LPS sobre a atividade locomotora na presença de tumor ou em animais mastectomizados.

Não foram observadas diferenças basais na locomoção entre os grupos ($p > 0,05$; **Fig. 6A**). O desafio imune induziu letargia, diminuindo significativamente a atividade locomotora ao longo do tempo durante as 24 horas após a injeção de LPS para todos os grupos em comparação ao grupo *sham* PBS ($p < 0,0001$ para os grupos *sham* LPS e mastectomizado; $p < 0,05$ para o grupo tumor; **Fig. 6A**). Embora todos os grupos tratados com LPS tenham exibido letargia (**Fig. 6A**), após observar interação entre os fatores tumor e tempo ($F_{144, 1296} = 2,0$, $p < 0,0001$), observamos diminuição da magnitude daquela resposta no grupo tumor em comparação aos grupos *sham* LPS ($p < 0,0001$) e mastectomizado ($p < 0,0001$). O efeito principal do LPS e do tumor na atividade locomotora foi mais aparente na fase escura (fase ativa; ver **Fig. 6B**), na qual os tumores atenuaram a letargia induzida por LPS em relação aos

grupos *sham* LPS e mastectomizado 7, 8, 9, 13 e 14 h após a injeção de LPS ($p < 0,05$ em todos os casos).

Figura 6. Tumores atenuam a letargia induzida por LPS, a qual é revertida após a remoção tumoral. (A) Média ($\pm$ SEM) da atividade locomotora (contagens/h) 24 horas antes e 24 horas após a injeção de LPS. Barra

preta no topo: diferença significativa entre o grupo tumor e *sham* injetados com LPS; barra cinza: diferença significativa entre o grupo tumor e mastectomizado injetados com LPS. **(B)** Aumento da atividade locomotora durante a fase escura após injeção de LPS da caixa destacada em **(A)**; * $p \leq 0.05$ grupo tumor em relação ao *sham* LPS; # $p \leq 0.05$ grupo tumor em relação ao mastectomizado; & $p \leq 0.05$ grupo mastectomizado em relação ao *sham* LPS por ANOVA de medidas repetidas **(A)** ou 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni **(B)**; (n=6-8 animais/grupo).

4.1.3 Efeito do LPS sobre a resposta de febre e hipotermia na presença de tumor ou em animais mastectomizados.

Para a temperatura corporal basal, a ANOVA de medidas repetidas indicou que tempo ($F_{23,621}=52,0$, $p < 0,0001$) e tratamento ($F_{2,27}=4,3$, $p < 0,05$) influenciaram este parâmetro de maneira independente. A temperatura corporal estava elevada no grupo tumor em relação aos grupos *sham* e mastectomizado durante ambas as fases do ciclo claro-escuro ($F_{2,27}=4,3$, $p < 0,05$; Bonferroni *post-hoc*: $p < 0,0001$ em todos os casos; **Fig. 7A**). A remoção tumoral reverteu esse aumento na temperatura corporal basal em relação ao grupo *sham* apenas durante a fase clara ($p > 0,05$), uma vez que a temperatura permaneceu elevada no grupo mastectomizado em relação ao grupo *sham* durante a fase escura (ANOVA de medidas repetidas para a fase escura com *post hoc* de Bonferroni; $F_{2,27}=4,1$, $p = 0,05$; **Fig. 7A**).

Figura 7. A remoção tumoral reverte parcialmente os aumentos na temperatura corporal basal induzidos por tumores e restaura parcialmente a resposta bifásica de febre/hipotermia ao LPS. (A) Temperatura corporal média basal ($\pm$ SEM) 24 horas antes da injeção de LPS. (B) Temperatura corporal relativa ($\pm$ SEM) em

resposta ao desafio imune com LPS (os grupos sham receberam PBS ou LPS enquanto os grupos tumor e mastectomizado receberam apenas LPS). * $p \leq 0.05$ grupo tumor em relação ao sham LPS; # $p \leq 0.05$ grupo tumor em relação ao mastectomizado; & $p \leq 0.05$ grupo mastectomizado em relação ao sham LPS; ^ $p \leq 0.05$ grupo sham PBS em relação ao sham LPS; a linha com símbolos representa as diferenças observadas por ANOVA de medidas repetidas, enquanto os símbolos sobre os diferentes pontos ao longo do tempo representam as diferenças observadas por 1-way ANOVA (n=7-15 animais/grupo).

Devido às diferenças induzidas pelo tumor na temperatura corporal basal, os dados relativos à resposta termorreguladora após o desafio imune com LPS foram analisados como uma alteração percentual em relação ao *baseline* para cada animal (**Fig. 7B**). A injeção de LPS induziu alterações na temperatura corporal em relação ao *baseline* ao longo do tempo, em comparação ao grupo sham PBS ($p < 0,0001$ em todos os casos), induzindo febre durante a fase clara e hipotermia durante a fase escura no grupo sham LPS. Durante a primeira hora após a injeção, entretanto, a injeção de LPS diminuiu a temperatura corporal agudamente ($F_{3,26}=5,1$, $p < 0,01$) nos grupos sham e mastectomizado (**Fig. 7B**; $p < 0,0005$ e $p < 0,005$, respectivamente) e tendeu a fazer o mesmo para o grupo tumor ($p = 0,06$), mas a cinética de mudança na temperatura corporal nas horas consecutivas diferiu entre os grupos, como demonstrado na Fig. 7B. A ANOVA de medidas repetidas revelou um aumento da temperatura corporal induzido pelo tumor ao longo do tempo durante as 24 horas após a injeção de LPS ($F_{1,24}=1,6$, $p < 0,05$). A temperatura corporal foi significativamente maior no grupo tumor durante a fase escura em relação aos grupos sham LPS e mastectomizado ($p < 0,01$ em relação ao grupo sham; $p < 0,0001$ em relação ao mastectomizado), sugerindo uma atenuação da hipotermia induzida por LPS (**Fig. 7B**). No grupo mastectomizado, o aumento inicial na temperatura corporal induzido por LPS atingiu o pico apenas 6 horas após a injeção, embora não fosse diferente (1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni nos pontos entre 2 - 8 h e 18 - 24 h pós-LPS; $p > 0,05$) daquela observada no grupo sham PBS entre 2-8 horas e 18-24 horas após a injeção. Entre os grupos tratados com LPS, o teste pós-hoc de Bonferroni revelou um aumento na temperatura corporal para o grupo tumor em relação aos grupos sham e mastectomizado ($p < 0,005$) no mesmo período.

4.2 Efeito do LPS sobre a Massa tumoral

As massas tumorais no momento da remoção cirúrgica (grupo mastectomizado) ou coleta final de tecido (grupo tumor) foram semelhantes ($p>0,05$; Figura 8A), indicando que os grupos tumor e mastectomizado foram expostos a cargas tumorais comparáveis. A injeção de LPS induziu aumento progressivo da massa do baço comparado à injeção de PBS ($F_{2,45}=9,3$, $p<0,001$; Figura 8B), de modo que a massa do baço foi maior 24 horas do que 4 horas após o desafio imune ($F_{1,39}=5,1$, $p<0,05$). Não foram observadas diferenças significativas na massa do baço induzidas por LPS ($p>0,05$) entre os grupos *sham*, portadores de tumor e mastectomizados dentro da mesma janela temporal (4 ou 24 horas pós-LPS).

Figura 8. Efeitos da completa remoção de tumor mamário na massa relativa do baço. Média $\pm$ SEM (A) da massa tumoral coletada na cirurgia (mastectomizado) ou na coleta de tecidos (tumor), (B) ou da massa do baço relativa à massa corporal em animais *sham* tratados com PBS e entre os diferentes grupos 4 ou 24 horas pós-LPS ($n=7-20$ animais/grupo; letras representam diferenças estatísticas por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni).

4.3 Efeito do LPS sobre as concentrações plasmáticas de citocinas na presença de tumor ou em animais mastectomizados.

Os níveis de todas as citocinas circulantes examinadas variaram ao longo do tempo ($p<0,05$), de forma que 4 horas após a injeção de LPS todas estavam elevadas em relação aos

níveis observados 24 horas após a injeção (IL-1 β : $F_{1,60}=85,3$, $p<0,0001$; IL-6: $F_{1,60}=294,8$, $p<0,0001$; TNF- α : $F_{1,60}=142,3$, $p<0,0001$; CXCL1: $F_{1,60}=200,4$, $p<0,0001$; **Fig. 9A-D**). A presença de tumor aumentou os níveis globais de CXCL1 ($F_{2,60}=3,7$, $p<0,05$), principalmente 24 horas após a injeção de LPS. Os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α do grupo tumor foram alterados 24 horas após o tratamento com LPS. A recuperação dos níveis basais de IL-6 ($F_{2,34}=11,8$, $p<0,0001$; **Fig. 9B**) e CXCL1 ($F_{2,34}=17,1$, $p<0,0001$; **Fig. 9D**) foi atenuada no grupo tumor em relação a ambos os grupos *sham* e mastectomizado. Em contraste, os tumores precipitaram a recuperação dos níveis basais de TNF- α 24 horas após a injeção de LPS em relação aos grupos *sham* e mastectomizado ($F_{2,34}=3,7$, $p<0,05$; **Fig. 9C**).

Figura 9. Tumores alteram a concentração de citocinas circulantes no plasma em resposta ao desafio com LPS. Média $\pm$ SEM (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) TNF- α e (D) CXCL1 (pg/ml) nos grupos sham, tumor e mastectomizado (n=10-20 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; # $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; & $p < 0,05$ em relação ao grupo sham PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

4.4 Efeito do LPS sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona na presença de tumor ou em animais mastectomizados.

Entre os grupos tratados com LPS, tanto o tempo ($F_{1,43}=102,7$, $p < 0,0001$) quanto a presença de tumor ($F_{2,43}=3,7$, $p < 0,05$) influenciaram independentemente as concentrações

plasmáticas de corticosterona (**Fig. 10**). O desafio imune elevou os níveis circulantes de corticosterona 4 horas pós-LPS em todos os grupos quando comparados ao grupo *sham* PBS, enquanto 24 horas pós-LPS as concentrações de corticosterona permaneceram aumentadas apenas no grupo tumor ($p<0,05$). Todos os grupos retornaram aos níveis circulantes basais de corticosterona 24 horas após a injeção de LPS, sendo comparáveis aos níveis do grupo *sham* PBS ($p>0,05$).

Figura 10. Tumores alteram a recuperação das concentrações plasmáticas de corticosterona 24 horas após desafio com LPS. Média $\pm$ corticosterona (ng/ml) circulante no plasma nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado ($n=10-20$ animais/grupo); * $p<0,05$ em relação aos outros tratamentos 24 horas após LPS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; # $p<0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; & $p<0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

4.5 Efeito do LPS sobre os níveis de expressão de citocinas em estruturas encefálicas na presença de tumor ou em animais mastectomizados.

4.5.1 *Il-1 β*

O tempo desde a injeção de LPS influenciou os níveis de expressão gênica de *Il-1 β* no hipocampo ($F_{1,87}=37,8$, $p<0,001$) e no córtex pré-frontal ($F_{1,87}=60,1$, $p<0,0001$; **Fig. 11A-C**), de forma que os níveis desta citocina foram reduzidos 4 e 24 horas após injeção de LPS.

Tanto o tempo ($F_{1,88}=18,3$, $p<0,0001$) como a presença de tumor ($F_{2,88}=5,5$, $p<0,01$) influenciaram independentemente os níveis de expressão gênica de *Il-1 β* no hipotálamo. Tumor e tempo interagiram sobre a expressão de *Il-1 β* no córtex pré-frontal ($F_{2,87}=3,9$, $p<0,05$). Em contraste à nossa hipótese a priori, as respostas de *Il-1 β* foram reduzidas tanto no hipotálamo ($p<0,05$) quanto no córtex pré-frontal ($p<0,05$) do grupo tumor em relação ao grupo *sham* LPS 4 horas após a injeção. Os níveis de expressão de *Il-1 β* permaneceram significativamente diminuídos no hipotálamo 24 horas após a injeção no grupo tumor em relação ao grupo *sham* LPS ($p<0,05$), enquanto as respostas do grupo mastectomizado permaneceram intermediárias. Finalmente, o desafio com LPS aumentou significativamente os níveis de *Il-1 β* em todas as regiões encefálicas examinadas 4 e 24 horas após a injeção para todos os grupos em relação ao grupo *sham* PBS ($p<0,05$ em todos os casos).

Figura 11. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na expressão de RNAm de *Il-1 β* em regiões encefálicas que regulam o comportamento doentio. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Il-1 β* (A) no hipocampo, (B) hipotálamo e (C) córtex pré-frontal nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado ($n=10-20$ animais/grupo); * $p<0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal (4 ou 24h) por 1-way ANOVA com post hoc de Bonferroni; & $p<0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com post hoc de Bonferroni; + $p<0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por 2-way ANOVA com post hoc de Bonferroni.

4.5.2 *Il-6*

Os níveis de expressão gênica de *Il-6* diminuíram ao longo do tempo desde o tratamento com LPS em todas as regiões encefálicas examinadas ($F_{1,87}=38,3$, $p<0,0001$ em cada região; **Fig. 12A-C**). Ambos, tempo (hipotálamo: $F_{1,84}=48,4$, $p<0,0001$; córtex pré-frontal: $F_{1,87}=70,4$, $p<0,0001$) e presença de tumor (hipotálamo: $F_{2,84}=3,8$, $p<0,05$; córtex pré-frontal: $F_{2,87}=4,9$, $p<0,01$) influenciaram independentemente os níveis de *Il-6* no córtex pré-frontal e hipotálamo, bem como sua interação (hipotálamo: $F_{2,84}=3,6$, $p<0,05$; córtex pré-frontal: $F_{2,87}=4,9$, $p<0,01$). Os níveis de *Il-6* no hipocampo ($U=75$, $p<0,05$) e no córtex pré-frontal ($U=48$, $p<0,005$) estavam diminuídos no grupo tumor 4 horas após a injeção em comparação ao grupo *sham* PBS; tendência semelhante foi observada no hipotálamo ($p=0,06$). A remoção do tumor teve o efeito inverso no hipotálamo: os níveis de *Il-6* estavam maiores no grupo mastectomizado do que no grupo tumor ($U=48$, $p<0,05$), assemelhando-se aos níveis observados no grupo *sham* LPS. Os níveis de *Il-6* no hipocampo permaneceram reduzidos 24 horas após a injeção no grupo tumor em relação ao grupo *sham* LPS ($t_{27}=2,6$, $p<0,05$), enquanto no grupo mastectomizado os níveis de *Il-6* foram comparáveis ao grupo *sham* LPS. Não foram observadas quaisquer diferenças nos níveis de *Il-6* no hipotálamo ou córtex pré-frontal 24 horas após a injeção com LPS/PBS.

O desafio com LPS aumentou significativamente os níveis de *Il-6* em todas as áreas encefálicas analisadas 4 horas após a injeção para todos os grupos em relação ao grupo *sham* PBS ($p<0,05$ em todos os casos). Os níveis de *Il-6* permaneceram elevados no hipocampo 24 horas após a injeção apenas no grupo *sham* LPS ($U=0$, $p<0,001$) em comparação ao grupo *sham* PBS. Os níveis de *Il-6*, tanto no córtex pré-frontal quanto no hipotálamo, retornaram aos níveis basais em todos os grupos 24 horas após a injeção de LPS ($p>0,05$ em todos os casos).

Figura 12. Efeitos de tumores mamários e remoção tumoral na expressão de RNAm de *Il-6* em regiões encefálicas que regulam o comportamento doente. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Il-6* (A) no hipocampo, (B) hipotálamo e (C) córtex pré-frontal nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado ($n=10-20$ animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal (4 ou 24h); # $p < 0,05$ em relação ao grupo tumor na mesma janela temporal (4 ou 24h)) por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; & $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; + $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

4.5.3 *Tnf- α*

Os níveis de expressão gênica de *Tnf- α* no hipocampo foram influenciados independentemente pelo tempo ($F_{1,87}=20,1$, $p < 0,0001$) e presença do tumor ($F_{2,87}=8,4$, $p < 0,0005$; **Fig. 13A**). No hipotálamo, os níveis de *Tnf- α* foram influenciados pela presença do tumor ($F_{2,88}=6,5$, $p < 0,005$; **Fig. 13B**), enquanto o tempo influenciou os níveis corticais de *Tnf- α* ($F_{1,87}=37,5$, $p < 0,0001$; **Fig. 13C**). Nos grupos tumor e mastectomizado foram observadas reduzidas respostas de *Tnf- α* no hipocampo ($F_{2,44}=6,7$, $p < 0,005$) e hipotálamo ($F_{2,41}=7,0$, $p < 0,005$) 4 horas após a injeção em relação ao grupo *sham* LPS, enquanto esta diferença não foi estatisticamente significativa no córtex pré-frontal ($p > 0,05$). As reduções nas respostas de *Tnf- α* hipotalâmicas induzidas por tumor persistiram ($p < 0,05$) 24 horas após injeção de LPS, enquanto no grupo mastectomizado foram comparáveis ao grupo *sham* LPS. Passadas 24 horas do desafio imune os níveis de *Tnf- α* no córtex pré-frontal de todos os grupos foram comparáveis ao do grupo *sham* PBS.

O desafio imune com LPS aumentou significativamente a expressão gênica de *Tnf-α* no hipocampo e no córtex pré-frontal 4 horas após a injeção para todos os grupos em relação ao grupo *sham* PBS ($p < 0,05$ em todos os casos); no hipotálamo, os níveis de *Tnf-α* só aumentaram no grupo *sham* LPS ($U=14,5$, $p < 0,005$). No hipocampo, os níveis de *Tnf-α* permaneceram elevados em todos os grupos 24 horas após a injeção de LPS em relação ao grupo *sham* PBS ($t_{53}=9,0$, $p > 0,005$), enquanto permaneceram elevados no hipotálamo apenas para o grupo *sham* ($U=19$, $p < 0,05$). No córtex pré-frontal os níveis de *Tnf-α* retornaram aos níveis basais em todos os grupos 24 horas após a injeção de LPS ($p > 0,05$ em todos os casos).

Figura 13. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na expressão de RNAm de *Tnf-α* em regiões encefálicas que regulam o comportamento doente. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Tnf-α* (A) no hipocampo, (B) hipotálamo e (C) córtex pré-frontal nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado ($n=10-20$ animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal (4 ou 24h) por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; & $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; + $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

4.5.4 *Cd11b*

Os níveis de expressão gênica de *Cd11b* foram influenciados pelo tempo pós desafio em todas as regiões encefálicas avaliadas (hipocampo: $F_{1,93}=32,3$, $p < 0,0001$; **Fig. 14A**;

hipotálamo: $F_{1,88}=26,2$, $p<0,0001$; **Fig. 14B**; córtex pré-frontal: $F_{1,93}=61,9$, $p<0,0001$; **Fig.14C**). Não foram encontradas diferenças nas respostas de *Cd11b* 4 horas após a injeção de LPS/PBS. Os níveis hipocampais e hipotalâmicos de *Cd11b* foram comparáveis entre todos os grupos tratados com LPS 24 horas após a injeção. No córtex pré-frontal, o grupo tumor apresentou reduzida expressão de *Cd11b* em relação aos animais mastectomizados ($U=101$, $p<0,05$).

O desafio imune não afetou a expressão de *Cd11b* no hipocampo ou hipotálamo 4 horas após a injeção de LPS em relação ao grupo *sham* PBS ($p>0,05$), mas elevou os níveis de *Cd11b* no córtex pré-frontal dos grupos tumor e mastectomizado ($p<0,05$ em ambos os casos). Em contraste, o tratamento com LPS aumentou significativamente a expressão gênica de *Cd11b* em todas as áreas encefálicas analisadas 24 horas após a injeção para todos os grupos em relação ao grupo *sham* PBS ($p<0,05$ em todos os casos).

Figura 14. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na expressão de RNAm de *Cd11b* em regiões encefálicas que regulam o comportamento doente. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Cd11b* (A) no hipocampo, (B) hipotálamo e (C) córtex pré-frontal nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado ($n=10-20$ animais/grupo); * $p<0,05$ em relação aos outros tratamentos na mesma janela temporal (4 ou 24h) por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; & $p<0,05$ em relação ao grupo *sham* PBS por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; + $p<0,05$ em relação ao mesmo grupo 24 horas pós-LPS por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

A relação entre massa tumoral e resposta neuroinflamatória foi investigada através de análises correlacionais para os grupos tumor e mastectomizado. Houve uma correlação positiva entre a massa tumoral e a expressão gênica do marcador microglial *Cd11b* em todas as regiões encefálicas examinadas 4 horas pós-LPS ($p < 0,05$ em cada caso; hipocampo: $r^2 = 0.455$; hipotálamo: $r^2 = 0.491$; córtex pré-frontal: $r^2 = 0.337$; **Fig. 15A**), sugerindo que tumores maiores resultam em maior expressão gênica de *Cd11b*. No grupo mastectomizado, os resultados mostrando que uma maior massa tumoral prévia estava negativamente correlacionada com as respostas de *Tnf-α* e *Cd11b*, semelhantes às respostas do grupo tumor nesta mesma janela temporal, sugerem que a massa tumoral previamente removida pode prever a resolução da neuroinflamação 24 horas pós-LPS. Essa correlação negativa entre massa tumoral e neuroinflamação 24 horas após a injeção de LPS foi estatisticamente significativa para os níveis de *Tnf-α* hipocâmpais e hipotalâmicos e *Cd11b* hipotalâmicos ($p < 0,05$ em cada caso; hipocampo: $r^2 = 0.231$; hipotálamo: $r^2 = 0.253$; córtex pré-frontal: $r^2 = 0.227$; **Fig. 15B**).

A) TUMOR SOMENTE; 4 h pós-LPS

B) MASTECTOMIZADO SOMENTE 24 h pós-LPS

Figura 15. Correlação entre a massa tumoral e a resposta neuroinflamatória após o desafio com LPS. Regressões lineares entre a massa tumoral total e a expressão de mRNA de *Cd11b* cortical e hipocâmpal em camundongos do grupo tumor 4 horas após injeção de LPS (A). Correlação entre a massa tumoral anterior do grupo mastectomizado e a resolução da resposta inflamatória no hipocampo e hipotálamo 24 horas pós-LPS (B).

MATERIAL E MÉTODOS 2

5.1 Animais experimentais

Os camundongos da linhagem Balb/c (n=80), fêmeas, nulíparas de 8 a 9 semanas de idade (Charles River, Wilmington, MA, EUA), foram acomodados em caixas de polipropileno (cinco animais por caixa) e aclimatados ao biotério com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) por uma semana sob um ciclo claro-escuro 14:10 (luzes apagadas às 16h). Água e ração (Harlan 7912) foram providas *ad libitum* durante todo o estudo e ninhos de algodão e cabanas de plástico foram fornecidos para nidificação. Antes e após a indução tumoral os camundongos foram habituados à manipulação duas vezes por semana. Todos os experimentos foram aprovados pelos Comitês Institucionais de Uso e Cuidados com Animais da *Ohio State University* e realizados de acordo com o Guia dos Institutos Nacionais de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NRC, 2011). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de camundongos usados.

5.2 Modelo de indução e remoção de tumor mamário

Os animais foram submetidos à indução e remoção do tumor mamário seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente nos itens 3.3 e 3.4. Brevemente, os camundongos (n=60) foram anestesiados (isoflurano) e inoculados com 5×10^6 células da linhagem 67NR (em matrigel) na quarta almofada mamária, enquanto um subconjunto de animais *sham* foi inoculado com PBS (n=20) e posteriormente recebeu uma cirurgia simulada de remoção tumoral, ao mesmo tempo que o grupo mastectomizado (ver **Fig. 16** para o delineamento experimental). A indução tumoral não foi bem-sucedida em 10 camundongos e eles foram removidos das análises.

Os camundongos designados para o grupo mastectomizado (n=30) foram inoculados com células tumorais 2,5 semanas antes dos demais grupos, de modo que o momento das cirurgias de remoção do tumor correspondeu ao tempo de indução tumor/*sham* dos outros grupos (**Fig. 16**). Remoções completas do tumor foram verificadas na necropsia e os camundongos com tumores recorrentes (n=5) foram removidos do estudo. A massa corporal e as dimensões do tumor foram medidas duas vezes por semana. O diâmetro mais longo do

tumor (A) e o diâmetro perpendicular (B) foram usados para estimar o volume do tumor pela fórmula: $V = A \times B^2/2 \text{ mm}^3$.

5.3 Delineamento experimental 2

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais, de acordo com os protocolos de inoculação e remoção tumoral, bem como a fase do ciclo claro-escuro em que foram avaliados para os parâmetros comportamentais e neuroinflamatórios, conforme descrito na figura abaixo:

Figura 16. Delineamento experimental. O grupo mastectomizado foi submetido à inoculação com as células tumorais da linhagem 67NR na semana 0, mesma janela temporal na qual o grupo *sham* passou por uma cirurgia simulada com inoculação de PBS. O grupo tumor foi submetido à inoculação tumoral na semana 2, mesma janela temporal na qual o grupo mastectomizado foi submetido à remoção cirúrgica do tumor e o grupo *sham* passou por uma cirurgia simulada dessa remoção. O subconjunto neuroinflamação (n=4 animais/grupo) foi submetido à eutanásia e teve seus tecidos coletados no dia 5 após o início das avaliações comportamentais. As medidas comportamentais foram iniciadas na semana 5, sendo que para o teste do campo aberto (CA) os animais foram divididos em 2 dias (n=5 animais/grupo/dia; dias +1-2). No dia +3 foi realizado o teste da alternância espontânea (AE; n=10-12 animais/grupo). No dia +4 foi realizado o teste do reconhecimento do objeto (RO; n=10-12 animais/grupo). Todos os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram seus tecidos coletados no dia +5, nas respectivas fases do ciclo claro-escuro (n=10-12 animais/grupo).

5.4 Análise comportamental

Os comportamentos foram analisados em todos os grupos às 07:00 h ou às 17:00 h (n=10-12 animais/grupo/vez) durante quatro dias consecutivos (2 dias de campo aberto). O escore comportamental para os testes da alternância espontânea e de reconhecimento do objeto foi feito por três pesquisadores cegos ao tratamento.

5.4.1 Campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado em uma arena plástica automatizada (San Diego Instruments, San Diego, CA, EUA) de formato quadrado (16x16) circundada por paredes laterais de 40cm de altura. Inicialmente, cada camundongo foi individualmente colocado na periferia da arena para se mover livremente por um período de 5 minutos, de modo que os animais foram confrontados com a novidade do ambiente e tiveram seu movimento espacial registrado por dezesseis *photobeams* através das duas dimensões da arena. Esta ferramenta foi utilizada para avaliar a atividade locomotora (distância total percorrida), bem como o comportamento do tipo-ansioso, o qual é indicado pelo comportamento de evitar o centro da arena. Uma camada solta de maravalha foi adicionada e as arenas foram limpas com água sanitária a 10% entre os animais.

5.4.2 Teste de alternância espontânea no labirinto em Y

A avaliação da memória espacial de trabalho foi realizada com base em uma versão adaptada do procedimento originalmente desenvolvido por Lalonde, 2002. Neste teste foi utilizado um aparato de acrílico cinza, com 3 braços de comprimentos iguais (40x8x15 cm) formando um labirinto em Y. Os camundongos foram individualmente colocados no centro do aparato e permitidos a explorar todo o labirinto por 3 minutos. Este teste baseia-se na tendência natural dos roedores para explorar metodicamente braços relativamente novos, em lugar dos braços mais recentemente explorados (Lalonde 2002). O comportamento foi gravado por uma câmera suspensa e analisado usando o *software* de rastreamento de vídeo *ANYMaze* (Stoelting Co., San Diego, CA, EUA). Uma alternância foi definida como entradas sucessivas em cada um dos três braços, em qualquer ordem. A percentagem de alternância

espontânea foi calculada como a razão de alterações bem-sucedidas sobre o total de alternâncias possíveis (definido como o número total de entradas nos braços menos dois), multiplicado por 100 (Garcia e Esquivel 2018).

5.4.3 Teste de reconhecimento de objetos

Essa tarefa cognitiva não espacial é mediada pelo córtex temporal e se baseia na preferência dos roedores em investigar objetos novos em detrimento a objetos familiares. Essa tarefa foi realizada conforme previamente descrito por Pyter et al. (2009). Para tal, os animais foram permitidos a investigar 2 objetos idênticos (tubos cônicos verticais de 50 ml cheios de areia) por 10 minutos em uma caixa limpa, e então devolvidos às suas caixas. Três horas depois, os animais foram devolvidos à caixa limpa, na qual um objeto familiar foi substituído por um novo objeto (disco de hóquei). O comportamento investigativo foi pontuado por 5 minutos. Todos os objetos foram limpos com etanol a 70% entre os testes. Os vídeos foram avaliados usando o *software* livre Etholog v. 2.2 (São Paulo, Brasil). O comportamento de investigação foi definido como o comportamento dirigido a objetos com o focinho <1cm do mesmo e movimento de vibrissas. O índice de discriminação do novo objeto (DI) foi calculado como: $(\text{Tempo gasto investigando o objeto novo} - \text{Tempo gasto investigando objeto familiar}) / (\text{Tempo total gasto investigando qualquer objeto}) \times 100$.

5.5 Coleta de tecidos

Os camundongos de todos os grupos foram submetidos à eutanásia um dia após o teste de reconhecimento de objetos durante a fase clara (06:00-11:00 h) ou durante a fase escura (16:00-21:00 h). Cinco animais/grupo/vez foram transcardialmente perfundidos com solução salina após asfixia com CO₂, e as regiões encefálicas relevantes para os comportamentos examinados (hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal) foram imediatamente dissecadas e congeladas em solução estabilizadora de RNA (RNA later® - Qiagen) para posterior avaliação da expressão gênica. Outros grupos de camundongos foram submetidos à eutanásia por decapitação rápida e o sangue do tronco foi recolhido através de

tubos de coleta de sangue revestidos com heparina. Os tumores e baços de todos os animais foram removidos assepticamente e pesados.

5.6 Concentrações plasmáticas da proteína ligadora de LPS (LBP)

A proteína ligadora de LPS (LBP), uma proteína de fase aguda do tipo 1 constitutivamente expressa no fígado, desempenha um papel central na resposta ao LPS, catalisando a monomerização do LPS e sua transferência para a proteína CD14 e lipoproteínas. Desta forma, o LBP aumenta substancialmente a sensibilidade dos monócitos e granulócitos ao LPS, (Hailman et al. 1994). Para a detecção da LBP total no plasma dos animais foi utilizado o kit imunoenzimático LBP ELISA (Hycult Biotech; Cat. No. NHK205-02). O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

5.7 RT-PCR *array* quantitativo

5.7.1 – Genes da resposta imune inata e adaptativa

O RNA total foi extraído do hipocampo e do córtex pré-frontal de cada camundongo usando mini kits Qiagen RNeasy (CA, EUA). As concentrações de RNA foram medidas e as razões 260/280 foram determinadas como 1,8-2,0 (NanoDrop, DE, EUA). A síntese do cDNA foi realizada a partir de 500ng de RNA isolado, utilizando-se o kit *RT² Green qPCR Master Mix* (Cat. No. 330522; SABiosciences/Qiagen, Frederico, MD, EUA). A expressão gênica foi medida utilizando PCR quantitativo em tempo real com os iniciadores (*primers*) específicos para medir 88 genes associados à resposta imunológica inata e adaptativa (SABiosciences/Qiagen; Cat. No. PAMM-052Z) a partir de uma combinação das amostras de tecido do hipocampo e do córtex pré-frontal. A expressão gênica foi normalizada usando a média geométrica de um painel de genes controle incluindo β -actina (*Actb*), β -2 microglobulina (*B2m*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), β -glucuronidase (*Gusb*) e proteína do choque térmico HSP 90-beta (*Hsp90ab1*). A expressão gênica relativa das amostras individuais foi calculada pelo método comparativo de C_T ($2^{-\Delta C_T}$).

5.7.2 Genes relacionados ao controle do ciclo circadiano

O RNA total foi extraído do hipotálamo de cada camundongo usando mini kits Qiagen RNeasy (CA, EUA). As concentrações de RNA foram medidas e as razões 260/280 foram determinadas como 1,8-2,0 (NanoDrop, DE, EUA). A síntese do cDNA foi realizada a partir de 500ng de RNA isolado, utilizando-se o kit *RT² Green qPCR Master Mix* (Cat. No. 330522; SABiosciences/Qiagen, Frederico, MD, EUA). A expressão gênica foi medida utilizando PCR quantitativo em tempo real com os iniciadores (*primers*) específicos para medir 84 genes chave na regulação dos ritmos circadianos (SABiosciences/Qiagen; Cat. No. PAMM-153Z) a partir de amostras do hipotálamo conforme descrito no item 5.7.1.

5.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de duas-vias (tumor e fase do ciclo claro-escuro) seguidas por teste *post-hoc* de *Bonferroni* usando o *software Statview* versão 5.0.1 (Scientific Computing, Cary, NC, EUA) quando variância era normal. O teste não paramétrico de *Mann-Whitney U* foi usado quando a variância não foi distribuída normalmente. As correlações de *Pearson* foram usadas para avaliar as relações entre as variáveis. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$ e foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

RESULTADOS 2

6.1 Avaliação comportamental

6.1.1 Campo aberto

No teste do campo aberto, todos os grupos testados durante a fase escura se moveram mais do que aqueles testados durante a fase clara ($F_{1,58}=60,7$, $p<0,0001$; **Fig. 17A**); a presença de tumor também afetou a atividade global de forma independente ($F_{2,58}=3,5$, $p<0,05$). De fato, os grupos tumor e mastectomizado se moveram significativamente menos que o grupo *sham* ($F_{2,26}=6,1$, $p<0,01$; $p<0,05$ em relação ao grupo tumor em ambos os casos; **Fig. 17A**), revelando um perfil comportamental semelhante à fadiga. Essa redução na locomoção foi observada principalmente durante a fase escura, na qual o grupo mastectomizado se moveu menos que o grupo *sham* ($p<0,05$). Foi observado um aumento na tendência central no campo aberto durante a fase escura ($F_{1,58}=19,3$, $p<0,0001$) em relação à fase clara, principalmente nos grupos *sham* ($p<0,05$) e mastectomizado ($p<0,001$), mas não no grupo tumor ($p>0,05$).

Figura 17. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral no comportamento do tipo ansioso e na fadiga nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média $\pm$ SEM; (A) Distância total percorrida no teste de campo aberto. (B) Percentual do tempo gasto explorando o centro da arena, ($n = 10-12$ animais/grupo); * $p<0,05$ em relação grupo *sham* na mesma fase do ciclo claro-escuro por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; # $p<0,05$ em relação à fase clara por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

6.1.2 Teste de alternância espontânea no labirinto em Y

No teste de alternância espontânea, tanto a fase do ciclo claro-escuro ($F_{1,57}=38,8$, $p<0,0001$) quanto a presença de tumor ($F_{2,57}=5,1$, $p<0,01$) influenciaram independentemente a distância total percorrida. O efeito do tumor sobre a atividade no labirinto Y ($F_{2,28}=7,4$, $p<0,01$) foi observado especificamente durante a fase escura, na qual ambos os grupos tumor e mastectomizado percorreram uma distância menor do que o grupo *sham* ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente), demonstrando a interferência do efeito motor induzido pelo tumor neste modelo. Durante a fase clara, o grupo tumor tendeu a se mover por distâncias menores que o grupo *sham* ($p=0,06$), enquanto o grupo mastectomizado apresentou uma locomoção comparável à do grupo *sham*. As diferenças na distância total percorrida relacionadas à fase do ciclo claro-escuro foram determinadas pelos grupos *sham* e tumor ($p<0,005$ em ambos os casos), enquanto o grupo mastectomizado não aumentou sua atividade durante a fase escura (ativa; $p>0,05$). Os camundongos apresentaram maior porcentagem de alternância espontânea correta durante a fase escura (ativa) em comparação com a fase clara ($F_{1,57}=9,5$, $p<0,005$). Essa melhora na alternância espontânea durante a fase escura foi observada primariamente no grupo tumor ($p<0,05$) e em menor extensão no grupo *sham* ($p=0,06$, enquanto o grupo mastectomizado falhou em demonstrar uma diferença na performance de alternância espontânea ($p>0,05$) entre as fases do ciclo claro-escuro.

Figura 18. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral no desempenho cognitivo no teste de aprendizado e memória espacial avaliados através do comportamento de alternância espontânea no labirinto em Y nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média $\pm$ SEM; (A) Distância total percorrida (m), (B) porcentagem de alternações espontâneas ($n = 10-12$ animais/grupo); * $p<0,05$ em relação aos outros grupos na mesma fase do ciclo claro-escuro por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; # $p<0,05$ em relação à fase clara por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

6.1.3 Teste de reconhecimento de novos objetos

Durante a fase escura, a presença de tumor modulou o índice de discriminação (**Fig. 19A**; $F_{2,27}=7,0$, $p<0,005$) de forma que os grupos tumor e mastectomizado investigaram o novo objeto por mais tempo em relação ao objeto familiar do que o grupo *sham* ($p<0,05$ e $p<0,005$, respectivamente). O tempo total de investigação absoluta foi elevado na fase escura em relação à fase clara (**Fig. 19B**; $F_{1,50}=10,1$, $p<0,005$), impulsionado pelos grupos *sham* e mastectomizado ($p<0,05$ em ambos os casos), mas não pelo grupo tumor ($p>0,05$). Além disso, a variabilidade no índice de discriminação foi impulsionada primariamente por alterações na investigação do objeto familiar (**Fig. 19C**; $F_{2,50}=9,2$, $p<0,0005$) e não do objeto novo (**Fig. 19D**). Os objetos familiares foram globalmente mais investigados na fase escura ($F_{2,31}=10,7$, $p<0,005$), como observado apenas no grupo *sham* ($p<0,005$ em relação aos grupos tumor e mastectomizado). A investigação do objeto novo também foi maior durante a fase escura (**Fig. 19D**; $F_{1,50}=8,5$, $p<0,01$), mas essa diferença foi impulsionada principalmente pelo grupo mastectomizado ($p<0,05$).

Figura 19. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral no desempenho cognitivo no teste de reconhecimento do objeto nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média±SEM; (A) Índice total de discriminação, (B) investigação total (segundos), (C) investigação do objeto familiar (segundos), (D) investigação do novo objeto (segundos); * $p < 0,05$ em relação aos outros grupos na mesma fase do ciclo claro-escuro por 1-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni; # $p < 0,05$ em relação à fase clara por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni ($n = 10-12$ animais/grupo).

6.2 Concentrações plasmáticas da proteína ligante de LPS (LBP)

Os níveis plasmáticos de LBP estavam elevados no grupo tumor em relação aos grupos *sham* e mastectomizado, independentemente da fase do ciclo claro-escuro (**Fig. 20**; $F_{2,28}=8,7$, $p < 0,005$). Os tumores aumentaram a expressão de LBP durante a fase clara em relação ao grupo *sham* ($p < 0,05$) e na fase escura em relação ao grupo mastectomizado ($p < 0,05$).

Figura 20. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral nos níveis de LBP nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média $\pm$ SEM dos níveis de LBP (ng/ml) circulantes no plasma nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado nas fases clara e escura, respectivamente (n=10-12 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*; # $p < 0,05$ grupo tumor em relação ao mastectomizado por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

6.3 Perfil de expressão de genes da resposta imune inata e adaptativa

6.3.1 Perfil global de expressão gênica

Para determinar se a presença e/ou remoção de tumor influencia a expressão de genes inflamatórios nas diferentes fases do ciclo claro-escuro, foi avaliada a expressão gênica global de 88 mediadores das respostas imune inata (receptores de reconhecimento padrão, citocinas), imune adaptativa (marcadores de ativação de células T, bem como da resposta imune do padrão T *helper* (Th)1, Th2, Th17, T reg) e da imunidade humoral (sistema complemento). De maneira geral, o perfil de expressão gênica no encéfalo dos grupos tumor e mastectomizado revelou genes diferencialmente expressos em ambas as fases do ciclo claro-escuro em relação ao grupo *sham* (**Fig. 21**). Alguns genes foram regulados positivamente apenas durante a fase escura (**Fig. 22**), dentre eles *Il-1 α* , o gene que codifica a lisozima M (LysM) *Lyz2*, um marcador de células progenitoras mielóides, expresso na micróglia e recentemente identificado em elevados níveis em neurônios do córtex motor e do cerebelo,

embora seu papel funcional nestas células permaneça desconhecido (Orthgiess et al. 2016; Blank e Prinz 2016).

Figura 21. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na expressão de genes da resposta imune inata e adaptativa nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Análise da expressão gênica integrada gerada pela análise de dados do RT² PCR Array (SABiosciences, EUA). O clustergrama cria um mapa de calor com dendrogramas indicando os genes que são corregulados entre os grupos *sham*, tumor e mastectomizado. A saturação de cor reflete a magnitude da mudança na expressão gênica. Os genes regulados positivamente e negativamente estão representados em vermelho e verde, respectivamente. O eixo x indica os grupos (control: *sham*/claro; 1: tumor/claro; 2: mastectomizado/claro; 3: *sham*/escuro; 4: tumor/escuro e 5 mastectomizado/escuro) e o eixo y indica os genes. As setas representam os genes nos quais foram observadas diferenças significativas por 2-way ANOVA entre os grupos tumorais ou fases do ciclo claro-escuro em relação ao grupo *sham* ($p < 0,05$); ($n=3-4$ animais/grupo); as setas hachuradas representam genes nos quais foram observadas diferenças significativas por 2-way ANOVA, mas com um grande número de amostras indeterminadas requerendo assim futuras confirmações. O clustergrama representado foi feito em <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com.br/pcr/arrayanalysis.php>.

6.3.2 Efeitos da presença ou remoção tumoral sobre a expressão de genes inflamatórios no cérebro observados durante as fases clara e escura

A presença de tumores influenciou a expressão gênica global de *Il-1 α* (**Fig. 22A**; $F_{2,16}=5,1$, $p < 0,05$) e *Il1r1* (**Fig. 22B**; $F_{2,16}=6,1$, $p < 0,05$), as quais foram impulsionadas por medidas feitas durante a fase escura, na qual o grupo tumor apresentou maior expressão de *Il-1 α* do que o grupo *sham* ($p < 0,05$) e *Il1r1* em relação aos grupos *sham* e tumor ($p < 0,05$, em ambos os casos). Os tumores também interagiram com a fase do ciclo claro-escuro ($F_{2,16}=5,3$, $p < 0,05$), influenciando a expressão gênica global de *Lyz2* ($F_{2,16}=4,7$, $p < 0,05$) durante a fase escura em relação ao grupo *sham* (**Fig. 22C**; $p < 0,005$). A presença de tumores (**Fig. 22D**; $F_{2,16}=7,8$, $p < 0,005$) e a interação entre esta e a fase do ciclo claro-escuro ($F_{2,16}=4,5$, $p < 0,05$) modularam a expressão do gene *Rorc* no cérebro, de modo que na fase escura a remoção do tumor aumentou a expressão de *Rorc* em relação aos grupos *sham* e tumor ($p < 0,005$ e $p < 0,01$, respectivamente). A expressão de *Icam1* aumentou (**Fig. 22E**; $F_{2,16}=22,3$, $p < 0,0001$) no cérebro do grupo tumor em relação aos grupos *sham* ($p < 0,005$ durante ambas as fases) e mastectomizado ($p < 0,005$ durante a fase clara e $p < 0,001$ durante a fase escura) independentemente da fase do ciclo claro-escuro.

Figura 22. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral nos níveis de expressão de genes inflamatórios nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Il-1 α* (A), *Il1r1* (B), *Lyz2* (C), *Rorc* (D) e *Icam1* (E) no cérebro (macerado de hipocampo e córtex pré-frontal) nos grupos sham, tumor e mastectomizado nas diferentes fases do ciclo claro-escuro (n=3-4 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham; ou # $p < 0,05$ em relação ao grupo mastectomizado por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

6.3.3 Tumores induzem perda do ritmo circadiano de expressão de *Cd4* e *Myd88*

A expressão cerebral de *Myd88* (Fig. 23A; $F_{1,16}=7,4$, $p < 0,05$) e *Cd4* (Fig. 23B; $F_{1,14}=10,9$, $p < 0,01$) diferiu em relação à fase do ciclo claro-escuro no grupo sham, enquanto nos grupos tumor e mastectomizado essas diferenças circadianas foram perdidas ($p > 0,05$ em todos os casos). A interação entre tumores e a fase do ciclo claro-escuro (*Cd4* Fig. 23B; $F_{2,14}=9,9$, $p < 0,01$) reduziram a expressão gênica de *Cd4* nos grupos tumor ($p < 0,05$) e mastectomizado ($p < 0,005$ em relação ao grupo sham). Por fim, o padrão de expressão foi único, uma vez que tumor e a fase do ciclo claro-escuro interagiram ($F_{2,13}=9,5$, $p < 0,01$) de modo que os grupos tumor e mastectomizado exibiram um padrão circadiano oposto ao do grupo sham, em relação ao padrão de expressão gênica de C3, a qual foi diminuída por tumores e pela remoção tumoral durante a fase clara (Fig. 23C; $p < 0,05$, em ambos os casos) e aumentada durante a fase escura ($p < 0,05$ em ambos os casos), exibindo um ritmo circadiano inverso em relação ao grupo sham.

Figura 23. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na ritmicidade de expressão de genes inflamatórios no cérebro. Média ± SEM da expressão gênica quantitativa de *Myd88* (A), *Cd4* (B) e *C3* (C) no cérebro (macerado de hipocampo e córtex pré-frontal) nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=3-4 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*; & $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo na fase clara; # $p < 0,05$ mastectomizado em relação aos grupos *sham* e tumor por 2-way ANOVA com *post hoc* de Bonferroni.

6.4 Perfil de expressão de genes de controle do relógio circadiano

6.4.1 Perfil global de expressão gênica

Uma vez que a resposta imune apresenta um padrão temporal regulado pelos genes do relógio (Curtis et al. 2014), foi avaliado se a presença ou a remoção do tumor alteram a ritmicidade destes genes no hipotálamo. Para tal, foi avaliada a expressão gênica global de 84 genes que regulam ou são regulados por ritmos circadianos nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. O clustergrama (**Fig. 24**) mostrou genes regulados positivamente (em vermelho) e negativamente (em verde) no hipotálamo comparado aos demais grupos. Notavelmente, os grupos tumor e mastectomizado apresentaram níveis alterados em uma série de genes que regulam ou são regulados pelos relógios biológicos, tais como *Alas1*, *Mat2a* e *Nlrd2* (**Fig. 25**).

Figura 24. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral sobre a expressão de genes que regulam ou são regulados pelos relógios biológicos nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Análise da expressão gênica integrada gerada pela análise de dados do RT² PCR Array (SABiosciences, EUA). O clustergrama cria um mapa de calor com dendrogramas indicando os genes que são corregulados entre os grupos sham, tumor e mastectomizado. A saturação de cor reflete a magnitude da mudança na expressão gênica. Os genes regulados positivamente e negativamente estão representados em vermelho e verde, respectivamente. O eixo x indica os grupos (*control*: sham/claro; 1: tumor/claro; 2: mastectomizado/claro; 3: sham/escuro; 4: tumor/escuro e 5 mastectomizado/escuro) e o eixo y indica os genes (n=4 animais/grupo). As setas representam os genes nos quais foram observadas diferenças significativas por 2-way ANOVA entre os grupos tumorais ou fases do ciclo claro-escuro em relação ao grupo *sham* ($p < 0,05$); as setas hachuradas representam genes nos quais foram observadas diferenças significativas por 2-way ANOVA, mas com um grande número de amostras indeterminadas requerendo assim futuras confirmações. O clustergrama representado foi feito em <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com.br/pcr/arrayanalysis.php>.

6.4.1.2 Efeitos da presença ou remoção tumoral sobre a expressão de genes relacionados aos ritmos biológicos no hipotálamo

A expressão de *Alas1* diminuiu (**Fig. 25A**; $F_{2,18}=5,4$, $p < 0,05$) no hipotálamo do grupo tumor em relação aos grupos *sham* ($p < 0,05$ durante a fase escura) e/ou mastectomizado ($p < 0,05$ durante a fase clara). A fase do ciclo claro-escuro (**Fig. 25B**; $F_{1,18}=6,7$, $p < 0,05$) influenciou a expressão gênica de *Aanat* no grupo tumor, de modo que esta estava aumentada durante a fase escura em relação ao grupo *sham* ($p < 0,05$). Em contrapartida, a remoção tumoral diminuiu os níveis de expressão de *Camk2b* (**Fig. 25C**; $F_{2,17}=8,6$, $p < 0,005$), *Nr1d2* (**Fig. 25F**; $F_{2,16}=13,4$, $p < 0,0005$) e *Prkar1a* (**Fig. 25G**; $F_{2,16}=9,8$, $p < 0,005$) em relação aos grupos *sham* e tumor ($p < 0,05$ para *Camk2b* e *Prkar1a*; $p < 0,001$ para *Nr1d2*) somente durante a fase escura.

Os tumores também aumentaram a expressão gênica de *Irf1* (**Fig. 25D**; $F_{2,17}=5,0$, $p < 0,05$) em relação aos grupos *sham* e mastectomizado ($p < 0,05$, em ambos os casos) somente durante a fase escura. A remoção tumoral diminuiu os níveis de expressão de *Mat2a* (**Fig. 25E**; $F_{2,17}=4,7$, $p < 0,05$) em relação aos grupos *sham* e tumor ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) somente durante a fase escura. Da mesma forma, os tumores diminuíram a expressão de *Prkar2a* (**Fig. 25H**; $F_{2,18}=4,0$, $p < 0,05$) durante a fase escura em relação ao grupo *sham* ($p < 0,05$, em ambos os casos), a qual tendeu a permanecer diminuída ($p = 0,06$) após a remoção tumoral. Em contrapartida, a remoção tumoral diminuiu a expressão de *Sp1* e *Tef* (*Sp1*: **Fig. 25I**; $F_{2,18}=4,3$, $p < 0,05$; *Tef*: **Fig. 25J**; $F_{2,18}=4,5$, $p < 0,05$) em relação ao grupo tumor, enquanto elevou a expressão de *Tgfb1* (**Fig. 25K**; $F_{2,18}=4,3$, $p < 0,05$) em relação ao grupo *sham*.

Figura 25. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral nos níveis de expressão de genes relacionados aos ritmos biológicos nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Alas1* (A), *Aanat* (B), *Camk2b* (C), *Irf1* (D), *Mat2a* (E), *Nr1d2* (F), *Prkar1a* (G), *Prkar2a* (H), *Sp1* (I), *Tef* (J), e *Tgfb1* (K) no hipotálamo dos grupos sham, tumor e mastectomizado nas diferentes fases do ciclo claro-escuro (n=3-4 animais/grupo); * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham; ou # $p < 0,05$ em relação ao grupo mastectomizado; & $p < 0,05$ tumor em relação aos grupos sham e mastectomizado por 2-way ANOVA com post hoc de Bonferroni.

6.4.1.4 Tumores não alteram o padrão de expressão dos genes do relógio no hipotálamo

Não foram observadas diferenças na expressão hipotalâmica dos genes do relógio *Clock*, *Arntl*, *Per1*, *Per 2* e *Per3* entre as fases do ciclo claro-escuro (Fig. 26 A- E; $p > 0,05$).

Figura 26. Efeitos de tumores mamários e da remoção tumoral na sincronização da expressão de genes que regulam os ritmos biológicos no hipotálamo. Média $\pm$ SEM da expressão gênica quantitativa de *Clock* (A), *Arntl* (B) *Per1* (C), *Per2* (D) e *Per3* (E) no hipotálamo nos grupos *sham*, tumor e mastectomizado (n=3-4 animais/grupo); $p>0,05$ em todos os casos por 2-way-ANOVA.

DISCUSSÃO

Embora o número de sobreviventes ao câncer de mama tenha aumentado exponencialmente nas últimas décadas, os mecanismos subjacentes às alterações neuroimunoendócrinas e comportamentais que persistem após a experiência de câncer permanecem desconhecidos (Santos e Pyter 2018). Neste trabalho investigamos primeiramente se tumores periféricos influenciam a resposta inflamatória periférica e central, bem como a resposta neuroendócrina e o comportamento doentio frente a um desafio imune com LPS. Ainda, se a remoção cirúrgica do tumor é suficiente para reverter as alterações no eixo neuroimune. Investigamos também se tumores periféricos por si só alteram comportamentos relacionados à fadiga e ansiedade, bem como funções cognitivas e neuroinflamação, nas diferentes fases do ciclo claro-escuro. Por fim, investigamos se a remoção cirúrgica do tumor é suficiente para reverter as possíveis alterações observadas.

Neste trabalho foi utilizado um modelo animal que busca mimetizar os efeitos do câncer de mama em pacientes durante o desenvolvimento tumoral e também em sobreviventes, após a remoção completa do tumor. Até o momento, modelos de sobrevivência livre de recorrência tumoral são escassos, embora sejam fundamentais para o entendimento dos mecanismos pelos quais alterações imunes e comportamentais persistem mesmo após um tratamento antitumoral bem-sucedido (Pyter et al. 2017).

Na primeira parte do presente estudo foi demonstrado que tumores mamários periféricos atenuam consistentemente a expressão gênica de *Il-1 β* , *Il-6* e *Tnf- α* no hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal, bem como o comportamento doentio (febre/hipotermia e letargia), em resposta a um desafio imune periférico com LPS. Estas alterações persistiram parcialmente após a remoção do tumor. Estes achados corroboram observações prévias de que a remoção tumoral reverte apenas parcialmente as consequências inflamatórias e fisiológicas induzidas por tumores em condições basais neste modelo (Pyter et al. 2017). Embora estudos anteriores relatem que tumores periféricos exacerbam respostas inflamatórias periféricas e centrais, como perda de peso e letargia após a injeção de LPS (Pyter et al. 2014; Vichaya et al. 2017), os dados conflitantes apresentados aqui indicam que o tipo de tumor, espécie e cepa do modelo animal modulam significativamente estas respostas. Devido a essa discrepância em relação aos achados prévios, os presentes achados foram derivados de quatro experimentos balanceados, validando a repetitividade significativa dos resultados. Não obstante, a literatura científica básica sobre como tumores periféricos são capazes de influenciar as respostas imunes adaptativas periféricas e centrais permanece relativamente escassa e conflitante.

Apesar da reduzida resposta de citocinas inflamatórias no grupo tumor, a injeção de LPS induziu anorexia e diminuiu a massa corporal na mesma extensão em todos os grupos (*sham*, tumor e mastectomizado). Um estudo recente implica vias inflamatórias não canônicas como principais moduladores da anorexia e da perda de massa corporal induzida por LPS, bem como por caquexia, em um modelo de câncer de pâncreas (Burfeind et al. 2018). Neste trabalho, a deleção genética de molécula adaptadora indutora de interferon β contendo o domínio TIR (TRIF), que responde à ativação de receptores do tipo *toll*, diminui a ativação microglial e atenua as mudanças no comportamento doentio. Assim, os mediadores inflamatórios canônicos examinados neste estudo podem ser menos importantes para esses comportamentos de doença-específicos. Não obstante, trabalhos anteriores usando diferentes abordagens para avaliar a sinalização neuroinflamatória demonstram que a supressão da neuroinflamação não evita a diminuição da massa corporal ou a anorexia induzida por LPS após o desafio imune (Saavedra, Navarro, e Torner 2018). Sendo assim, a sensibilidade das ferramentas utilizadas para medir esses comportamentos é uma limitação que deve ser considerada, uma vez que a medição manual da ingestão de alimentos pode omitir pequenos pedaços de ração que eventualmente caiam na gaiola e se misturem à maravalha.

Em contraste, no presente estudo os tumores modularam significativamente a termorregulação minuto a minuto, bem como a atividade locomotora após o desafio imune com LPS. Notavelmente, os tumores alteraram a temperatura corporal antes e depois do desafio imune agudo em relação ao grupo *sham*. As elevações observadas na temperatura corporal basal do grupo tumor são comparáveis a achados anteriores em outros modelos de tumores em roedores e em pacientes com câncer (Roche et al. 2014; Oudart et al. 2000; Komarzynski et al. 2018) e podem, na verdade, refletir uma ruptura no ritmo circadiano da termorregulação subjacente ao desenvolvimento tumoral. Embora vários estudos tenham demonstrado que tumores diminuem a amplitude do ritmo circadiano da temperatura corporal, os resultados neste campo são controversos, de modo que alguns tumores [sarcoma Walker 256, carcinoma induzido pelo carcinógeno 3-methylcholanthrene (MCA)] diminuem (Smith e Kluger 1993; Kampschmidt and Upchurch 1970), enquanto outros (sarcoma de Yoshida) aumentam a temperatura corporal em ratos (Oudart et al. 2000). No presente estudo, a remoção do tumor reverteu a ruptura na regulação da temperatura corporal induzida pelo tumor mamário sob condições basais, mas somente durante a fase clara (inativa). Assim, a biologia do tumor mamário pode ter efeitos duradouros sobre as vias homeostáticas, que

persistem mesmo após a remoção (Mann et al. 2012; Vincent et al. 2014; Carpenter et al. 2001, 2004) completa do tumor. Diminuições na amplitude dos ritmos circadianos de atividade em repouso e da temperatura corporal estão associados à reduzida sobrevida em pacientes com câncer (Roche et al. 2014). Além disso, entre os sobreviventes de câncer de mama, os sintomas de desconforto térmico, como ondas de calor e sudorese noturna, são altamente prevalentes (65–85%) (Mann et al. 2012; Vincent et al. 2014; Carpenter et al. 2001, 2004), embora as terapias contra o câncer também contribuam para essas mudanças termorreguladoras (Vincent et al. 2014). No entanto, estudos que avaliam as alterações nestes ritmos circadianos em pacientes oncológicos são relativamente escassos e caracterizados por notáveis diferenças entre estes pacientes (Komarzynski et al. 2018).

A resposta termorreguladora induzida por LPS em roedores é multifásica e envolve fases febris e hipotérmicas, com distintos mecanismos fisiológicos (Oka et al. 2003). Camundongos com tumor exibiram uma fase inicial de febre, mas falharam em montar uma resposta hipotérmica adequada durante a fase escura (ativa) do ciclo claro-escuro. A resposta neuroinflamatória suprimida pode ter contribuído para este prejuízo na resposta termorreguladora ao desafio com LPS, uma vez que as citocinas pró-inflamatórias centrais (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) regulam tanto a febre quanto a hipotermia induzidas por LPS (Tollner et al. 2000; Eskilsson et al. 2014). Por exemplo, a administração central de IL-6 restaura a resposta termorreguladora ao desafio com LPS ou IL-1 em camundongos deficientes em IL-6 (Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V 1996). Nossos achados referentes à insuficiente resposta imune e comportamental no grupo tumor são semelhantes à prejudicada resposta (resposta termorreguladora reprimida e diminuição de citocinas pró-inflamatórias) observada em ratos com colite diante um desafio imune com LPS (Boissé et al. 2003). Em conjunto, estas evidências indicam que a inflamação crônica periférica, como a induzida por tumores ou colite, pode causar uma inibição compensatória nas respostas neuroinflamatórias subsequentes por meio das vias de sinalização inflamatória humorais ou neurais (Boissé et al. 2003). Além disso, essas perturbações do ritmo circadiano não apenas influenciam os ritmos basais da temperatura corporal, mas também as respostas termorreguladoras aos desafios, uma vez que a indução de arritmia circadiana exacerba a neuroinflamação induzida por LPS e o comportamento doentio em camundongos (Castanon-Cervantes et al. 2010a; Fonken, Weil, e Nelson 2013), indicando que o sistema imune inato é dependente de ritmos circadianos intactos, os quais podem ser interrompidos por tumores. No grupo mastectomizado, a resposta

febril ao desafio imune com LPS permaneceu parcialmente prejudicada apenas durante a fase clara. Similarmente, a resposta neuroinflamatória permaneceu apenas parcialmente prejudicada após a remoção do tumor. De fato, esses resultados sugerem que tumores induzem uma ruptura da ritmicidade circadiana que persiste, embora parcialmente, após a remoção tumoral e justificam uma investigação mais aprofundada. Estas alterações persistentes indicam o potencial para a biologia tumoral deixar uma marca duradoura nas vias centrais que regulam o comportamento doentio.

A moderada ruptura na resposta termorreguladora dos camundongos do grupo tumor e mastectomizado foi acompanhada por substanciais reduções nos níveis hipocâmpais e hipotalâmicos de *Tnf- α* 4 horas após a injeção de LPS em relação grupo *sham*. De fato, em um modelo animal de caquexia induzida por câncer, o tratamento com anti-TNF reverte parcialmente a redução na temperatura corporal induzida pelo tumor (Smith e Kluger 1993). Usando um paradigma diferente para avaliar a neuroinflamação, outro estudo encontrou uma redução semelhante nos níveis hipotalâmicos de TNF- α induzida por drogas psicotrópicas e uma atenuação na hipotermia induzida por LPS em ratos (Nassar, Sharon-Granit, e Azab 2016). No presente estudo, no entanto, a diminuição nos níveis de *Tnf- α* foi associada a mudanças ligeiramente diferentes nas respostas de temperatura corporal ao LPS, dependendo se o tumor estava presente ou foi previamente removido e, portanto, pode não ser um mediador direto. Não obstante, as complexas interações entre os demais mediadores alterados entre os grupos tumor e mastectomizado, tais como *Il-6*, *Il-1 β* e corticosterona, poderiam influenciar a resposta termorreguladora diferentemente entre ambos os grupos.

De fato, existem evidências indicando que várias vias são críticas para a homeostase da temperatura corporal, febre e respostas hipotérmicas em camundongos imunodeficientes (Natarajan, Northrop, e Yamamoto 2015; Oka et al. 2003; Boissé et al. 2003). Especificamente, as vias neuroendócrinas, como o eixo HHA, e os sistemas neurotransmissores, modulam vários aspectos de ambas as respostas (Nakamura 2011). No presente estudo, foram observadas elevadas concentrações plasmáticas de corticosterona no grupo tumor em relação aos grupos *sham* e mastectomizado 24 horas após o desafio imune. Essa recuperação alterada na resposta da corticosterona ao LPS pode, portanto, estar relacionada às coincidentes mudanças observadas no comportamento doentio no grupo tumor. De fato, o estresse crônico imprevisível em ratos aumenta a temperatura corporal basal e a resposta hipotérmica a um desafio na sala fria, em relação aos controles livres de estresse. A

inibição farmacológica da síntese de corticosterona reverte esse aumento da resposta termorreguladora ao frio, embora não atenua a elevação da temperatura corporal basal (Natarajan, Northrop, e Yamamoto 2015).

A injeção de LPS induziu letargia em todos os grupos em relação ao grupo *sham* PBS. No entanto, a reduzida magnitude dessa letargia induzida por LPS no grupo tumor, em comparação aos grupos *sham* e mastectomizado tratados com LPS, é consistente com a atenuação observada nas respostas termorreguladora e neuroinflamatória (Liu et al. 2016) nestes grupos. De fato, a administração central de um inibidor de caspase-1 em ratos, a qual reduz significativamente os níveis encefálicos de IL-1 β (córtex pré-frontal, hipotálamo e hipocampo), atenua a letargia induzida por LPS (Harden et al. 2011). Nossos dados contrastam com trabalhos anteriores que mostram déficits exacerbados na atividade locomotora em camundongos portadores de tumores de cabeça e pescoço relacionados ao vírus do papiloma humano (HPV) 24 horas após um desafio imune com LPS (Vichaya et al. 2017). Essas discrepâncias podem, no entanto, refletir diferenças relacionadas ao modelo tumoral e métodos utilizados. No presente estudo, a redução na amplitude da letargia observada nos camundongos do grupo tumor pode ter sido influenciada pelos níveis de corticosterona, que permaneceram elevados nestes animais 24 horas após o desafio imune, uma vez que deficiências na função do receptor glicocorticoide exacerbam a letargia, bem como a resposta termorreguladora e a neuroinflamação induzidas por LPS (Silverman et al. 2013) em camundongos. A remoção do tumor reverteu esse efeito na letargia induzida por LPS. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais tumores alteram as respostas termorreguladoras e de atividade, bem como para caracterizar as consequências dessas alterações na resposta imune e comportamental durante a sobrevida dos pacientes oncológicos frente a uma infecção.

Enquanto estudos prévios sugerem que os tumores periféricos podem estimular a micróglia e exacerbar as respostas neuroinflamatórias aos desafios imunes periféricos inatos subsequentes (Vichaya et al. 2017; Pyter et al. 2014), nossos dados indicam que alguns modelos de tumor periférico atenuam a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS no encéfalo, sugerindo redução da resposta da micróglia. Além disso, no presente estudo a massa tumoral correlacionou-se positivamente com a expressão do gene microglial *Cd11b* no tecido cerebral coletado 4 horas após a injeção de LPS no grupo tumor, embora os valores absolutos deste marcador não fossem estatisticamente diferentes entre os

grupos nesta janela temporal. Esta correlação consistente entre várias regiões do encéfalo sugere uma relação potencial entre a ativação/número inicial microglial e a carga tumoral. Além disso, a massa tumoral removida dos camundongos mastectomizados correlacionou-se negativamente os níveis de *Tnf-α* e *Cd11b* 24 horas após a injeção de LPS, indicando que massas tumorais anteriores maiores estão correlacionadas a respostas neuroinflamatórias mais semelhantes às observadas em camundongos com tumores (atenuadas 24 horas pós-injeção de LPS). De acordo com estas evidências em modelos experimentais, o exame histopatológico do tumor cirurgicamente removido de sobreviventes de câncer de mama pode ajudar a identificar vias de sinalização inflamatórias alteradas e comportamento associado durante o período de sobrevivência.

Em sobreviventes de câncer de mama, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes expostas ao estresse agudo (Jaremka et al. 2014) e leucócitos de sobreviventes fatigados (Bower et al. 2007) exibem maiores respostas pró-inflamatórias (IL-6 e IL -1 β) após um desafio imune *ex vivo* com LPS, em relação às respostas das células dos respectivos controles dos sobreviventes de câncer. As concentrações circulantes de cortisol também se correlacionam positivamente com a resposta pró-inflamatória *ex vivo* (Bower et al. 2007). Esses estudos indicam que subpopulações de sobreviventes de câncer de mama com comorbidades comportamentais produzem respostas inflamatórias distintas quando desafiadas imunologicamente, provavelmente devido à modulação por vias neuroendócrinas relacionadas ao estresse, como o eixo HHA. De maneira comparável, no presente estudo utilizando estimulação com LPS *in vivo*, os tumores atenuaram a recuperação periférica (24 horas após a injeção) dos níveis plasmáticos de IL-6 e CXCL1. No entanto, a remoção do tumor reverteu essas alterações tardias induzidas por tumores nas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que os tratamentos antitumorais ou o estresse podem contribuir para as alterações nos níveis de mediadores inflamatórios circulantes observadas em sobreviventes de câncer. Respostas de desafio imune *in vivo* semelhantes não estão atualmente disponíveis para comparação direta em populações de câncer.

Além disso, o modelo tumoral utilizado no presente estudo é não-metastático e não induziu comportamento doentio ou caquexia durante o desenvolvimento tumoral, o que poderia ter confundido a avaliação da resposta ao desafio imunológico. Baseado nos achados anteriores sugerindo que os tumores mamários induzem uma perda duradoura no ritmo da temperatura corporal basal, na segunda etapa deste trabalho foram investigadas as

consequências da experiência tumoral sobre o padrão temporal de expressão de genes envolvidos nas respostas imunes inata e adaptativa no cérebro (hipocampo e córtex pré-frontal), bem como na expressão de genes do relógio no hipotálamo. Foi investigado ainda se a experiência tumoral modula comportamentos do tipo ansioso e alterações cognitivas de maneira distinta entre as fases clara e escura.

Embora não tenham sido observadas alterações na atividade locomotora basal dos grupos tumor e mastectomizado no primeiro coorte deste estudo, os tumores induziram um perfil comportamental semelhante à fadiga durante a fase escura (ativa), como demonstrado pela redução da locomoção nos testes do campo aberto e da alternância espontânea, corroborando dados da literatura utilizando outros modelos experimentais de câncer, nos quais a incidência de fadiga em repouso associada ao aumento de marcadores inflamatórios centrais e/ou periféricos foi observada (Norden et al. 2015; Lamkin et al. 2011). A remoção tumoral não reverteu a redução na locomoção induzida pelo tumor, sugerindo um potencial de tumores em induzir, por si só, mudanças duradouras em vias centrais que regulam comportamentos como a fadiga, um sintoma altamente debilitante e prevalente entre sobreviventes de câncer de mama (Bower 2014; Wang 2008). Não obstante, uma avaliação mais detalhada deste parâmetro comportamental (avaliando-se o exercício voluntário em gaiolas com *running wheels*, bem como parâmetros musculares), é necessária para uma adequada caracterização desta comorbidade neste modelo. Embora o comportamento do tipo ansioso não tenha sido observado no presente estudo, um trabalho recente (Pyter et al. 2017) utilizando o mesmo modelo de sobrevivência avaliou este perfil comportamental por meio de múltiplas ferramentas e demonstrou que a remoção tumoral não apenas não reverte a ansiedade induzida por tumor, mas a amplifica, de modo que os animais mastectomizados exibem níveis de comportamento do tipo ansioso ainda maiores que os animais com tumores intactos. Por fim, embora a literatura aponte para o potencial de tumores periféricos induzirem deficiências cognitivas (Pyter et al. 2010; Yang et al. 2014), no presente estudo não foram identificadas alterações induzidas por tumores nestes parâmetros. Ademais, os grupos tumor e mastectomizado exibiram melhores performances em tarefas cognitivas durante a fase escura, de modo que uma investigação mais aprofundada destes parâmetros se faz necessária neste modelo.

Uma extensa literatura sugere um papel causal para a inflamação associada ao desenvolvimento tumoral na indução de neuroinflamação e comorbidades neuropsiquiátricas

(Lebeña A, Vegas O, Gómez-Lázaro E, Arregi A, Garmendia L, Beitia G 2014; Armaiz-pena et al. 2013; Bower 2014; Bower e Lamkin 2013; Burfeind et al. 2018; Collado-Hidalgo et al. 2006, 2008, Miranda et al. 2014, 2017; Pyter 2016; Pyter et al. 2010, 2009; Vichaya et al. 2017; Yang et al. 2014). Não obstante, o mecanismo pelo qual a inflamação se propaga do tumor para o SNC, induzindo alterações comportamentais, permanece desconhecido. Notavelmente, no presente estudo, a análise de PCR *array* revelou que tumores induzem um aumento na expressão gênica cerebral de alguns mediadores inflamatórios, tais como *Il-1 α* , *Il1r1*, *Lyz2*, e *Icam1*, além de alterar a ritmicidade de expressão de *C3* e abolir a ritmicidade de expressão de *Myd88* e *Cd4*. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes do relógio *Clock*, *Arntl*, *Per1*, *Per2* e *Per3*. Não obstante, foi observada uma reduzida expressão de genes regulados pelos ritmos circadianos no hipotálamo do grupo tumor, tais como *Alas1* e *Prkar2a*, durante a fase escura, consistente com a perda do padrão temporal de expressão de mediadores inflamatórios.

A remoção tumoral, em contrapartida, diminuiu a expressão de inúmeros genes do relógio central, tais como *Camk2b*, *Mat2a*, *Nr1d2*, *Prkar1*, *Sp1* e *Tef*. Embora seja sabido que a ritmicidade circadiana é fundamental para a homeostase do sistema imune, os efeitos da dessincronização destes ritmos sobre a função imunológica permanecem pobremente esclarecidos. Inúmeros mediadores imunológicos estão sob a regulação dos relógios centrais, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, CCL2 e IFN- γ (Curtis et al. 2014) e evidências indicam que o sistema imunológico e os relógios endógenos se influenciam mutuamente. Ainda, macrófagos apresentam ritmos endógenos de atividade fagocítica e sensibilidade a LPS (Keller et al. 2009). Notavelmente, foram observados elevados níveis circulantes de LBP em ambas as fases do ciclo claro-escuro no grupo tumor e a remoção tumoral não apenas reverteu, como diminuiu os níveis desta proteína no grupo mastectomizado em relação ao grupo *sham* durante a fase escura. Dado que o LBP aumenta a sensibilidade de monócitos ao LPS (Schumann 2011), os elevados níveis circulantes observados no grupo tumor poderiam, pelo menos em parte, justificar o atraso observado no retorno aos níveis basais de citocinas circulantes, como IL-6 e CXCL1, após o desafio com LPS no grupo tumor. No entanto, este aumento é contraditório à supressão da resposta neuroinflamatória, bem como do comportamento doentio observado neste grupo. Além disso, o ensaio utilizado mede apenas os níveis de proteína livre, o que não significa que o aumento nos níveis de LBP reflète de fato um aumento na sensibilidade ao LPS. Embora o aumento observado na expressão gênica

de mediadores neuroinflamatórios sugira uma possível exacerbação da resposta inflamatória diante de um desafio imune subsequente, os tumores atenuaram a resposta neuroinflamatória ao desafio imune com LPS no primeiro coorte do presente trabalho, contrariando nossa hipótese inicial de que a experiência tumoral exacerbaria a resposta inflamatória a um desafio imune subsequente, como anteriormente demonstrado na literatura (Pyter et al. 2014). Por fim, evidências sugerem que o IFN- β localmente produzido no cérebro é capaz de limitar a intensidade da resposta neuroinflamatória da micróglia, além de fazer o *clearance* dos debris de mielina em modelos de encefalomielite experimental (Prinz et al. 2008; Kocur et al. 2015), de modo que a deleção do receptor de interferons do tipo 1 leva a uma exacerbada e deletéria resposta neuroinflamatória. No segundo coorte, os tumores induziram um aumento na expressão de *Irf1* no hipotálamo, além de uma tendência ao aumento *Ifnb1* no córtex pré-frontal e hipocampo (como apontado no clustergrama) em ambas as fases do ciclo claro-escuro, os quais poderiam contribuir para a supressão da resposta neuroinflamatória ao desafio com LPS. Futuras investigações dos níveis proteicos dos mediadores alterados no presente trabalho em ambas as condições (repouso e desafio imune), bem como a avaliação das células responsáveis por estas mudanças podem contribuir para esclarecer os mecanismos por trás da diferença observada entre as duas condições.

A secreção noturna do hormônio melatonina pela glândula pineal, o qual apresenta uma oscilação circadiana regulada pelo SCN, desempenha um papel chave na regulação endógena da temperatura corporal, induzindo sua redução durante a noite (Kräuchi et al. 2006; Cagnacci et al. 1997). Além disso, evidências provenientes de ciência básica e clínica sugerem que a melatonina pode apresentar um papel protetor em pacientes com câncer de mama, embora os mecanismos subjacentes não estejam completamente claros (Grant SG, Melan MA, Latimer JJ 2015). A melatonina pode atuar por meio de receptores acoplados à proteína G - MT1 (codificado por *Mtnr1a*) e MT2 (codificado por *Mtnr1b*), ou vias dependentes de estrogênio, reduzindo a formação de radicais livres, a proliferação celular e a metástase (Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS 2006). Curiosamente, no presente trabalho, além de elevar os níveis de expressão gênica da enzima Arylalkylamine N-acetyltransferase (*Aanat*), a qual é taxa-limitante na síntese de melatonina, os tumores elevaram a temperatura corporal durante ambas as fases do ciclo claro-escuro. Este aumento poderia refletir uma resposta compensatória para a manutenção da homeostase termal, embora o aumento na transcrição da enzima não necessariamente aumenta a síntese deste hormônio.

Ademais, os níveis de melatonina não foram medidos no presente estudo, de modo que futuras investigações poderiam esclarecer qual a relevância deste hormônio nas alterações na termorregulação induzidas por tumor neste modelo.

Tomados em conjunto, nossos achados demonstram que tumores diminuem a amplitude do padrão temporal da temperatura corporal basal, abolem o padrão temporal de expressão de alguns mediadores inflamatórios no encéfalo em condições basais, bem como atenuam as respostas neuroinflamatórias e de comportamento doentio a um subsequente desafio imune com LPS. Algumas alterações persistem mesmo após a remoção do tumor. Embora vários estudos corroborem a hipótese de que tumores sólidos periféricos são suficientes para induzir alterações comportamentais e neuroinflamatórias em modelos tumorais em roedores (Schrepf, Lutgendorf, e Pyter 2015), os mecanismos pelos quais os tumores influenciam esses processos, bem como os mecanismos fisiológicos e consequências comportamentais, parecem ser diferentes entre os modelos e/ou condições experimentais. O comportamento doentio é uma estratégia importante para a sobrevivência frente a doenças infecciosas, e ambas as respostas neuroinflamatórias exacerbadas ou diminuídas podem ser mal-adaptativas. Assim, nossos dados sugerem que pacientes com câncer e sobreviventes podem estar predispostos a respostas de defesa prejudicadas do hospedeiro contra doenças ou desafios secundários (como cirurgias, infecções ou mesmo estressores). Uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes a essas complexas alterações induzidas por tumores pode fornecer informações sobre alvos terapêuticos e tratamentos alternativos que permitam uma melhoria na saúde e qualidade de vida para os sobreviventes de câncer.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que:

1) O carcinoma mamário experimental influencia a resposta imune na periferia e no sistema nervoso central, atenuando consistentemente a resposta neuroinflamatória e o comportamento doente ao desafio com lipopolissacarídeo;

2) a remoção cirúrgica completa do tumor primário (mastectomia) parcialmente reverte as mudanças neuroinflamatórias e comportamentais induzidas pelo tumor;

3) os tumores mamários diminuem a amplitude do padrão temporal da resposta termorreguladora, mantendo a temperatura corporal elevada em ambas as fases do ciclo claro-escuro;

4) as alterações na termorregulação basal persistem parcialmente após a remoção do tumor, mantendo a temperatura corporal dos animais mastectomizados elevada durante a fase escura;

5) o tumor mamário é capaz de induzir alterações comportamentais semelhantes à fadiga e aumentar a expressão de mediadores inflamatórios no cérebro, como *Il-1α*, *Il-1r1*, *Lyz2* e *Icam1*;

6) algumas destas alterações são dependentes das fases do ciclo claro-escuro;

7) os tumores aumentam a expressão gênica de *Aanat* no hipotálamo, além de abolir a ritmicidade de expressão de genes ligados às respostas imunes no cérebro, tais como *C3* e *Cd4*;

8) a remoção tumoral abole a ritmicidade de expressão gênica cerebral de *Myd88*, diminui a expressão hipotalâmica de inúmeros genes chave na regulação do ciclo circadiano, além de aumentar os níveis centrais de *Rorc* e *Tgfb1*.

Nossos resultados indicam que a experiência tumoral induz alterações duradouras na sinalização neuroimune funcional, as quais podem, além de afetar a resposta inflamatória e comportamental a desafios imunes subsequentes, contribuir para a persistência de comorbidades neuropsiquiátricas nos sobreviventes de câncer.

Limitações

Dentre as limitações enfrentadas no presente trabalho destacam-se:

- O uso de camundongos da cepa Balb/c que por vezes dificulta a análise de alguns parâmetros imunológicos (pela falta de camundongos “*knock out*” para genes específicos da resposta imune) e comportamentais;
- Os mediadores inflamatórios foram avaliados por meio de qPCR ou RT² PCR *array*, de modo que os níveis de mRNA podem não refletir os níveis proteicos destes mediadores, fazendo com que uma futura avaliação dos mediadores alterados seja feita para confirmar os presentes resultados;
- Para uma futura avaliação dos ritmos circadianos (e não apenas padrões temporais de dia versus noite) da temperatura corporal, locomoção, bem como da resposta inflamatória, é necessária a amostragem em diferentes horários do dia (pelo menos quatro pontos) e por um período de tempo mais longo.

Dificuldades encontradas

O nosso projeto de pesquisa original era relacionado à avaliação da influência do tratamento antitumoral com fosfoetanolamina sobre o eixo neuroimunoendócrino durante a carcinogênese de cólon experimental. Enfrentamos inúmeros desafios ao longo destes anos, uma vez que o carcinógeno utilizado para indução tumoral (metil-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidina - MNNG; *Sigma-Aldrich*) no modelo em uso no laboratório foi descontinuado pela Sigma e o produto vendido pelo novo fornecedor (*Chem Service*) mostrou-se ineficiente para indução tumoral, levando somente à formação de lesões pré-neoplásicas e inviabilizando a avaliação do efeito antitumoral da fosfoetanolamina. A fosfoetanolamina utilizada nos projetos do nosso grupo de pesquisa era sintetizada pelo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice, do Instituto de Química de São Carlos/USP. Após toda a polêmica nacional acerca deste composto e as evidências de inúmeros estudos sobre a sua ineficácia, os experimentos foram interrompidos e o projeto foi alterado.

No novo projeto, passamos a avaliar o efeito do tratamento anti-tumoral com canabidiol sobre o eixo neuroimunendócrino no carcinoma mamário experimental. Para tal, contamos com a colaboração do laboratório do Prof. Dr. João Santana que, por meio da Dra. Luciana Benevides, nos cedeu as linhagens de tumor mamário (4T-1 e 67NR) e o treinamento para a inoculação cirúrgica do tumor. Além disso, contamos com a colaboração do laboratório do Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, por meio da co-orientação feita pela Dra. Sabrina Francesca Lisboa, a qual participou da idealização de ambos os projetos, bem como forneceu toda a estrutura para a realização dos experimentos. A idealização deste novo projeto nos permitiu a colaboração internacional com o laboratório da Prof^a. Dr^a. Leah M. Pyter. Dadas as dificuldades em levar o fármaco para o exterior, foi elaborado o presente trabalho, no qual foi avaliado o efeito do carcinoma mamário experimental sobre o eixo neuroimune em repouso e após o desafio com LPS. O projeto sobre a avaliação do efeito antitumoral do canabidiol continuará a ser desenvolvido pelo grupo, dados os excelentes resultados obtidos pelo tratamento de diferentes linhagens tumorais *in vitro*.

Trabalhos Futuros

Em andamento:

- Avaliação da ativação da micróglia e astrócitos após desafio imune com LPS no hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal por imuno-histoquímica para Iba1 (do inglês, *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*) e GFAP (do inglês, *Glial Fibrillar Acid Protein*);
- Avaliação do tráfego de células mieloides para o encéfalo após desafio imune com LPS por imuno-histoquímica para CD45 e VCAM1 (do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*).

REFERÊNCIAS

-
-
- Ahles, Tim A, Andrew J Saykin, Brenna C McDonald, Charlotte Furstenberg, Bernard F.Cole, Brett S.Hanscom, Tamsin J.Mulrooney, Gary N.Schwartz, e Peter A Aufman. 2008. "Cognitive function in breast cancer patients prior to adjuvant treatment". *Breast Cancer Res Treat* 110 (1): 143–52. doi:10.1007/s10549-007-9686-5.Cognitive.
- Allemani, Claudia, Tomohiro Matsuda, Veronica Di Carlo, Rhea Harewood, Melissa Matz, Maja Nikšić, Audrey Bonaventure, et al. 2018. "Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries". *The Lancet* 391 (10125): 1023–75. doi:10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
- Armaiz-pena, Guillermo N, Steve W Cole, Susan K Lutgendorf, e Anil K Sood. 2013. "Neuroendocrine influences on cancer progression". *Brain Behavior and Immunity* 30: S19–25. doi:10.1016/j.bbi.2012.06.005.
- Aschoff, Jürgen. 1983. "Circadian control of body temperature". *Journal of Thermal Biology*. doi:10.1016/0306-4565(83)90094-3.
- Azpiroz, A., Z. De Miguel, E. Fano, e O. Vegas. 2008. "Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice". *Brain, Behavior, and Immunity* 22 (5): 690–98. doi:10.1016/j.bbi.2007.10.007.
- Balkwill, Fran, e Alberto Mantovani. 2001. "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *The Lancet* 357 (9255): 539–45. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
- Blakeman, Victoria, Jack L. Williams, Qing-Jun Meng, e Charles H. Streuli. 2016. "Circadian clocks and breast cancer". *Breast Cancer Research* 18 (1). Breast Cancer Research: 89. doi:10.1186/s13058-016-0743-z.
- Blank, Thomas, e Marco Prinz. 2016. "CatacLysMic specificity when targeting myeloid cells?" *European Journal of Immunology* 46 (6): 1340–42. doi:10.1002/eji.201646437.
- Boissé, Lysa, Marja D Van Sickle, Keith a Sharkey, e Quentin J Pittman. 2003.

- “Compromised neuroimmune status in rats with experimental colitis.” *The Journal of physiology* 548 (Pt 3): 929–39. doi:10.1113/jphysiol.2002.034546.
- Bower, Julianne E. 2011. “Behavioral symptoms in breast cancer patients and survivors: Fatigue, insomnia, depression, and cognitive disturbance”. *Journal of Clinical Oncology* 26 (5): 768–77. doi:10.1200/JCO.2007.14.3248.Behavioral.
- . 2014. “Cancer-related fatigue—mechanisms, risk factors, and treatments”. *Nature Reviews Clinical Oncology* 11 (10). Nature Publishing Group: 597–609. doi:10.1038/nrclinonc.2014.127.
- Bower, Julianne E., Patricia A. Ganz, Najib Aziz, Richard Olmstead, Michael R. Irwin, e Steve W. Cole. 2007. “Inflammatory responses to psychological stress in fatigued breast cancer survivors: Relationship to glucocorticoids”. *Brain, Behavior, and Immunity* 21 (3): 251–58. doi:10.1016/j.bbi.2006.08.001.
- Bower, Julianne E., Patricia A. Ganz, Sally S. Dickerson, Laura Petersen, Najib Aziz, e John L. Fahey. 2005. “Diurnal cortisol rhythm and fatigue in breast cancer survivors”. *Psychoneuroendocrinology* 30 (1): 92–100. doi:10.1016/j.psyneuen.2004.06.003.
- Bower, Julianne E., e Donald M. Lamkin. 2013. “Inflammation and cancer-related fatigue: Mechanisms, contributing factors, and treatment implications”. *Brain, Behavior, and Immunity* 30 (SUPPL.): S48–57. doi:10.1016/j.bbi.2012.06.011.
- Brown, E Sherwood, e Patricia A. Chandler. 2001. “Mood and Cognitive Changes During Systemic Corticosteroid Therapy.” *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry* 3 (1): 17–21. doi:10.4088/PCC.v03n0104.
- Buhr, Ethan D., e Joseph S. Takahashi. 2013. “Molecular components of the mammalian circadian clock”. *Handbook of Experimental Pharmacology* 217 (217): 3–27. doi:10.1007/978-3-642-25950-0-1.
- Burfeind, Kevin G, Xinxia Zhu, Peter R Levasseur, Katherine A Michaelis, Mason A Norgard, e Daniel L Marks. 2018. “TRIF is a key inflammatory mediator of acute sickness behavior and cancer cachexia”. *Brain, Behavior, and Immunity*, n° January (maio). Elsevier: 0–1. doi:10.1016/j.bbi.2018.05.021.
- Cagnacci, Angelo, Kurt Kräuchi, Anna Wirz-Justice, e Annibale Volpe. 1997. “Homeostatic

- versus Circadian Effects of Melatonin on Core Body Temperature in Humans”. *Journal of Biological Rhythms* 12 (6): 509–17. doi:10.1177/074873049701200604.
- Candido, Juliana, e Thorsten Hagemann. 2013. “Cancer-Related Inflammation”. *Journal of Clinical Immunology* 33 (S1): 79–84. doi:10.1007/s10875-012-9847-0.
- Capuron, Lucile, e Robert Dantzer. 2003. “Cytokines and depression: The need for a new paradigm”. *Brain, Behavior, and Immunity* 17 (1 SUPPL.): 119–24. doi:10.1016/S0889-1591(02)00078-8.
- Carpenter, J. S., J. M. Gilchrist, K. Chen, S. Gautam, e R. R. Freedman. 2004. “Hot flashes, core body temperature, and metabolic parameters in breast cancer survivors”. *Menopause* 11 (4): 375–81. doi:10.1097/01.GME.0000113848.74835.1A.
- Carpenter, J S, S Gautam, R R Freedman, e M Andrykowski. 2001. “Circadian rhythm of objectively recorded hot flashes in postmenopausal breast cancer survivors”. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society* 8 (3): 181–88. doi:10.1097/00042192-200105000-00007.
- Castanon-Cervantes, O., M. Wu, J. C. Ehlen, K. Paul, K. L. Gamble, R. L. Johnson, R. C. Besing, M. Menaker, A. T. Gewirtz, e A. J. Davidson. 2010a. “Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption”. *The Journal of Immunology* 185 (10): 5796–5805. doi:10.4049/jimmunol.1001026.
- Castanon-Cervantes, O., M. Wu, J.C. Ehlen, K. Paul, K.L. Gamble, R.L. Johnson, R.C. Besing, M. Menaker, A.T. Gewirtz, e A.J. Davidson. 2010b. “Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption”. *Journal of Immunology* 185 (10). doi:10.4049/jimmunol.1001026.
- Castren, E, V Voikar, e T Rantamaki. 2007. “Role of neurotrophic factors in depression”. *Current Opinion in Pharmacology* 7 (1): 18–21. doi:10.1016/j.coph.2006.08.009.
- Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V, Bartfai T. 1996. “Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice.” *Journal of Experimental Medicine* 183 (1): 311–16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8551238>.
- Cimprich, Bernadine, Patricia Reuter-Lorenz, James Nelson, Patricia M. Clark, Barbara

- Therrien, Daniel Normolle, Marc G. Berman, et al. 2010. “Prechemotherapy alterations in brain function in women with breast cancer”. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 32 (3): 324–31. doi:10.1080/13803390903032537.
- Collado-Hidalgo, Alicia, Julianne E. Bower, Patricia A. Ganz, Steve W. Cole, e Michael R. Irwin. 2006. “Inflammatory biomarkers for persistent fatigue in breast cancer survivors”. *Clinical Cancer Research* 12 (9): 2759–66. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2398.
- Collado-Hidalgo, Alicia, Julianne E. Bower, Patricia A. Ganz, Michael R. Irwin, e Steve W. Cole. 2008. “Cytokine gene polymorphisms and fatigue in breast cancer survivors: Early findings”. *Brain, Behavior, and Immunity* 22 (8): 1197–1200. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.009.
- Curtis, Anne M., Marina M. Bellet, Paolo Sassone-Corsi, e Luke A.J. O’Neill. 2014. “Circadian Clock Proteins and Immunity”. *Immunity* 40 (2). Elsevier Inc.: 178–86. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.002.
- Czeh, B., T. Michaelis, T. Watanabe, J. Frahm, G. de Biurrun, M. van Kampen, A. Bartolomucci, e E. Fuchs. 2001. “Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (22): 12796–801. doi:10.1073/pnas.211427898.
- Dantzer, Robert, Mary W. Meagher, e Charles S. Cleeland. 2012. “Translational approaches to treatment-induced symptoms in cancer patients”. *Nature Reviews Clinical Oncology* 9 (7): 414–26. doi:10.1038/nrclinonc.2012.88.
- Davies, Eleri Lloyd. 2016. “Breast cancer”. *Medicine* 44 (1). Elsevier Ltd: 42–46. doi:10.1016/j.mpmed.2015.10.002.
- Diamond, Mark S., Michelle Kinder, Hirokazu Matsushita, Mona Mashayekhi, Gavin P. Dunn, Jessica M. Archambault, Hsiaoju Lee, et al. 2011. “Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors”. *The Journal of Experimental Medicine* 208 (10): 1989–2003. doi:10.1084/jem.20101158.
- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, e Robert D. Schreiber. 2002. “Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape”. *Nature*

Immunology 3 (11): 991–98. doi:10.1038/ni1102-991.

- Duric, Vanja, Sarah Clayton, Mai Lan Leong, e Li Lian Yuan. 2016. “Comorbidity Factors and Brain Mechanisms Linking Chronic Stress and Systemic Illness”. *Neural Plasticity* 2016. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2016/5460732.
- Eskilsson, A., E. Mirrasekhian, S. Dufour, M. Schwaninger, D. Engblom, e A. Blomqvist. 2014. “Immune-Induced Fever Is Mediated by IL-6 Receptors on Brain Endothelial Cells Coupled to STAT3-Dependent Induction of Brain Endothelial Prostaglandin Synthesis”. *Journal of Neuroscience* 34 (48): 15957–61. doi:10.1523/JNEUROSCI.3520-14.2014.
- Felger, J. C., e F. E. Lotrich. 2013. “Inflammatory cytokines in depression: Neurobiological mechanisms and therapeutic implications”. *Neuroscience* 246. IBRO: 199–229. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.060.
- Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, e Freddie Bray. 2015. “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012”. *Int. J. Cancer* 136: E359-386. doi:10.1002/ijc.29210.
- Filipski, Elisabeth, Verdun M King, XiaoMei Li, Teresa G Granda, Marie-Christine Mormont, XuHui Liu, Bruno Claustrat, Michael H Hastings, e Francis Lévi. 2002. “Host circadian clock as a control point in tumor progression.” *Journal of the National Cancer Institute* 94 (9): 690–97. doi:10.1093/jnci/94.9.690.
- Fonken, Laura K., Zachary M. Weil, e Randy J. Nelson. 2013. “Mice exposed to dim light at night exaggerate inflammatory responses to lipopolysaccharide”. *Brain, Behavior, and Immunity* 34. Elsevier Inc.: 159–63. doi:10.1016/j.bbi.2013.08.011.
- Gabrilovich, Dmitry I., e Srinivas Nagaraj. 2009. “Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system”. *Nature Reviews Immunology* 9 (3): 162–74. doi:10.1038/nri2506.
- Garcia, Yenela, e Nashelly Esquivel. 2018. “Comparison of the Response of Male BALB/c and C57BL/6 Mice in Behavioral Tasks to Evaluate Cognitive Function”. *Behavioral Sciences* 8 (1): 14. doi:10.3390/bs8010014.
- Giannetti, Paolo, Marios Politis, Paul Su, Federico Turkheimer, Omar Malik, Shiva

- Keihaninejad, Kit Wu, Richard Reynolds, Richard Nicholas, e Paola Piccini. 2014. “Microglia activation in multiple sclerosis black holes predicts outcome in progressive patients: An in vivo [(11)C](R)-PK11195-PET pilot study”. *Neurobiology of Disease* 65. Elsevier Inc.: 203–10. doi:10.1016/j.nbd.2014.01.018.
- Grant SG, Melan MA, Latimer JJ, Witt-Enderby PA. 2015. “Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives”, 1–18. doi:10.1017/S1462399409000982.
- Grivennikov, Sergei I., Florian R. Greten, e Michael Karin. 2010. “Immunity, Inflammation, and Cancer”. *Cell* 140 (6). Elsevier Inc.: 883–99. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
- Guo, Dong kai, Yao Zhu, Hong yang Sun, Xing yun Xu, Shun Zhang, Zong bing Hao, Guang hui Wang, Chen chen Mu, e Hai gang Ren. 2018. “Pharmacological activation of REV-ERB α represses LPS-induced microglial activation through the NF- κ B pathway”. *Acta Pharmacologica Sinica*, n° June. Springer US: 1–9. doi:10.1038/s41401-018-0064-0.
- Hailman, E, Henri S Lichenstein, Mark M Wurfel, David S Miller, David A Johnson, Michael Kelley, Leigh A Busse, Mark M Zukowski, e Samuel D Wright. 1994. “Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14.” *The Journal of experimental medicine* 179 (1): 269–77. doi:10.1084/jem.179.1.269.
- Hanahan, Douglas, e Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The Next Generation”. *Cell* 144 (5). Elsevier Inc.: 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hanke, Mark L., e Tammy Kielian. 2011. “Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential”. *Clinical Science* 121 (9): 367–87. doi:10.1042/CS20110164.
- Harden, Lois M., Irné du Plessis, Joachim Roth, Lisa C. Loram, Stephen Poole, e Helen P. Laburn. 2011. “Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 β and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior”. *Psychoneuroendocrinology* 36 (5): 608–22. doi:10.1016/j.psyneuen.2010.09.003.
- Herman, Francis J., e Giulio Maria Pasinetti. 2018. “Principles of inflammasome priming and inhibition: Implications for psychiatric disorders”. *Brain, Behavior, and Immunity*, n°

May. doi:10.1016/j.bbi.2018.06.010.

- Hermelink, Kerstin, Varinka Voigt, Judith Kaste, Franziska Neufeld, Rachel Wuerstlein, Markus Bühner, Karin Münzel, et al. 2015. “Elucidating Pretreatment Cognitive Impairment in Breast Cancer Patients: The Impact of Cancer-Related Post-Traumatic Stress”. *Journal of the National Cancer Institute* 107 (7). doi:10.1093/jnci/djv099.
- Hernandez, María Eugenia, Danelia Mendieta, Mayra Pérez-Tapia, Rafael Bojalil, Iris Estrada-Garcia, Sergio Estrada-Parra, e Lenin Pavón. 2013. “Effect of selective serotonin reuptake inhibitors and immunomodulator on cytokines levels: An alternative therapy for patients with major depressive disorder”. *Clinical and Developmental Immunology* 2013. doi:10.1155/2013/267871.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2018. *Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2018*. <http://www.inca.gov.br>.
- Jaremka, Lisa M., Rebecca R. Andridge, Christopher P. Fagundes, Catherine M. Alfano, Stephen P. Povoski, Adele M. Lipari, Doreen M. Agnese, et al. 2014. “Pain, depression, and fatigue: Loneliness as a longitudinal risk factor.” *Health Psychology* 33 (9): 948–57. doi:10.1037/a0034012.
- Judd, Lewis L., Pamela J. Schettler, E. Sherwood Brown, Owen M. Wolkowitz, Esther M. Sternberg, Bruce G. Bender, Karen Bulloch, et al. 2014. “Adverse consequences of glucocorticoid medication: Psychological, cognitive, and behavioral effects”. *American Journal of Psychiatry* 171 (10): 1045–51. doi:10.1176/appi.ajp.2014.13091264.
- Kalsbeek, A., R. van der Spek, J. Lei, E. Endert, R. M. Buijs, e E. Fliers. 2012. “Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis”. *Molecular and Cellular Endocrinology* 349 (1): 20–29. doi:10.1016/j.mce.2011.06.042.
- Kampschmidt and Upchurch. 1970. “Daily variation of body temperature, liver catalase activity, and plasma iron concentration in normal and tumor-bearing rats”. *Proc Soc Exp Biol Med*. 134: 527–29.
- Keller, Maren, Jeannine Mazuch, Ute Abraham, Gina D. Eom, Erik D. Herzog, Hans-Dieter Volk, Achim Kramer, e Bert Maier. 2009. “A circadian clock in macrophages controls

- inflammatory immune responses”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (50): 21407–12. doi:10.1073/pnas.0906361106.
- Kesler, Shelli R., Marjorie Adams, Melissa Packer, Vikram Rao, Ashley M. Henneghan, Douglas W. Blayney, e Oxana Palesh. 2017. “Disrupted brain network functional dynamics and hyper-correlation of structural and functional connectome topology in patients with breast cancer prior to treatment”. *Brain and Behavior* 7 (3): 1–10. doi:10.1002/brb3.643.
- Koch, C. E., B. Leinweber, B. C. Drenth, C. Blaum, e H. Oster. 2017. “Interaction between circadian rhythms and stress”. *Neurobiology of Stress* 6. The Authors: 57–67. doi:10.1016/j.ynstr.2016.09.001.
- Kocur, Magdalena, Reiner Schneider, Ann Kathrin Pulm, Jens Bauer, Sonja Kropp, Michael Gliem, Jens Ingwersen, et al. 2015. “IFN β secreted by microglia mediates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity”. *Acta neuropathologica communications* 3: 20. doi:10.1186/s40478-015-0192-4.
- Koebel, Catherine M., William Vermi, Jeremy B. Swann, Nadeen Zerafa, Scott J. Rodig, Lloyd J. Old, Mark J. Smyth, e Robert D. Schreiber. 2007. “Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state”. *Nature* 450 (7171): 903–7. doi:10.1038/nature06309.
- Komarzynski, Sandra, Qi Huang, Pasquale F Innominato, Monique Maurice, Alexandre Arbaud, Jacques Beau, Mohamed Bouchahda, et al. 2018. “Inter-subject differences in circadian coordination captured in real time in healthy and cancerous individual persons during their daily routine using a mobile internet platform”. *Journal of Medical Internet Research* 44 (0): 1–44. doi:10.2196/jmir.9779.
- Kräuchi, Kurt, Christian Cajochen, Mona Pache, Josef Flammer, e Anna Wirz-Justice. 2006. “Thermoregulatory effects of melatonin in relation to sleepiness”. *Chronobiology International* 23 (1–2): 475–84. doi:10.1080/07420520500545854.
- Kreisel, T, M G Frank, T Licht, R Reshef, M V Baratta, S F Maier, e R Yirmiya. 2013. “Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis”. *Molecular Psychiatry* 19 (6). Nature Publishing Group: 699–709. doi:10.1038/mp.2013.155.

- Lalonde, Robert. 2002. "The neurobiological basis of spontaneous alternation". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26 (1): 91–104. doi:10.1016/S0149-7634(01)00041-0.
- Lamkin, Donald M., Susan K. Lutgendorf, David Lubaroff, Anil K. Sood, Terry G. Beltz, e Alan Kim Johnson. 2011. "Cancer induces inflammation and depressive-like behavior in the mouse: Modulation by social housing". *Brain, Behavior, and Immunity* 25 (3). Elsevier Inc.: 555–64. doi:10.1016/j.bbi.2010.12.010.
- Lamkin, Donald M., Erica K. Sloan, Ami J. Patel, Beverley S. Chiang, Matthew A. Pimentel, Jeffrey C Y Ma, Jesusa M. Arevalo, Kouki Morizono, e Steve W. Cole. 2012. "Chronic stress enhances progression of acute lymphoblastic leukemia via β -adrenergic signaling". *Brain, Behavior, and Immunity* 26 (4). Elsevier Inc.: 635–41. doi:10.1016/j.bbi.2012.01.013.
- Lebeña A, Vegas O, Gómez-Lázaro E, Arregi A, Garmendia L, Beitia G, Azpiroz A. 2014. "Melanoma tumors alter proinflammatory cytokine production and monoamine brain function, and induce depressive-like behavior in male mice". *Behavioural Brain Research* 272: 83–92. doi:10.1016/j.bbr.2014.06.045.
- Lee, E. Y. H. P., e W. J. Muller. 2010. "Oncogenes and Tumor Suppressor Genes". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (10): a003236–a003236. doi:10.1101/cshperspect.a003236.
- Liu, Xiaoyu, Daniel P. Nemeth, Andrew J. Tarr, Natalya Belevych, Zunera W. Syed, Yufen Wang, Ahmad S. Ismail, et al. 2016. "Euflammation attenuates peripheral inflammation-induced neuroinflammation and mitigates immune-to-brain signaling". *Brain, Behavior, and Immunity* 54. Elsevier Inc.: 140–48. doi:10.1016/j.bbi.2016.01.018.
- Long, Eric O., e Sumati Rajagopalan. 2002. "Stress Signals Activate Natural Killer Cells: Figure 1." *The Journal of Experimental Medicine* 196 (11): 1399–1402. doi:10.1084/jem.20021747.
- Maass, S. W.M.C., C. Roorda, A. J. Berendsen, P. F.M. Verhaak, e G. H. De Bock. 2015. "The prevalence of long-term symptoms of depression and anxiety after breast cancer treatment: A systematic review". *Maturitas* 82 (1). Elsevier Ireland Ltd: 100–108. doi:10.1016/j.maturitas.2015.04.010.

- Maes, Michael, Michael Berk, Lisa Goehler, Cai Song, George Anderson, Piotr Gałeczki, e Brian Leonard. 2012. "Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways". *BMC Medicine* 10: 1–19. doi:10.1186/1741-7015-10-66.
- Mann, E., M. J. Smith, J. Hellier, J. A. Balabanovic, H. Hamed, E. A. Grunfeld, e M. S. Hunter. 2012. "Cognitive behavioural treatment for women who have menopausal symptoms after breast cancer treatment (MENOS 1): A randomised controlled trial". *The Lancet Oncology* 13 (3). Elsevier Ltd: 309–18. doi:10.1016/S1470-2045(11)70364-3.
- McAfoose, J., e B. T. Baune. 2009. "Evidence for a cytokine model of cognitive function". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33 (3): 355–66. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.10.005.
- Miller, Andrew H., e Charles L. Raison. 2016. "The role of inflammation in depression: From evolutionary imperative to modern treatment target". *Nature Reviews Immunology* 16 (1). Nature Publishing Group: 22–34. doi:10.1038/nri.2015.5.
- Miller, B. H., E. L. McDearmon, S. Panda, K. R. Hayes, J. Zhang, J. L. Andrews, M. P. Antoch, et al. 2007. "Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (9): 3342–47. doi:10.1073/pnas.0611724104.
- Miller, F. R., D. Medina, e G. H. Heppner. 1981. "Preferential Growth of Mammary Tumors in Intact Mammary Fatpads". *Cancer Research* 41 (10): 3863–67.
- Miller, F R, B E Miller, e G H Heppner. 1983. "Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability." *Invasion & metastasis* 3 (1): 22–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6677618>.
- Miranda, D. O., E. Anatriello, L.R. Azevedo, J.F.C. Cordeiro, F. M. Peria, M. Flória-Santos, e G. Pereira-da-Silva. 2017. "Elevated serum levels of proinflammatory cytokines potentially correlate with depression and anxiety in colorectal cancer patients in different stages of the antitumor therapy". *Cytokine*, nº December 2016. Elsevier: 0–1. doi:10.1016/j.cyto.2017.09.030.

- Miranda, D. O., T. A. S. Lima, L. R. Azevedo, O. Feres, J.J.R. Rocha, e G. Pereira-Da-Silva. 2014. "Proinflammatory Cytokines Correlate with Depression and Anxiety in Colorectal Cancer Patients". *BioMed Research International* 2014: 1–5. doi:10.1155/2014/739650.
- Mittal, Deepak, Matthew M Gubin, Robert D Schreiber, e Mark J Smyth. 2015. "New insights into cancer immunoediting and its three component phases- elimination, quilibrium and escape". *Current opinion in immunology* 27: 16–25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004.New.
- Mojic, Marija, Kazuyoshi Takeda, e Yoshihiro Hayakawa. 2018. "The dark side of IFN- γ : Its role in promoting cancer immunoevasion". *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1): 1–13. doi:10.3390/ijms19010089.
- Nakamura, Kazuhiro. 2011. "Central circuitries for body temperature regulation and fever". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301 (5): R1207–28. doi:10.1152/ajpregu.00109.2011.
- Nassar, Ahmad, Yael Sharon-Granit, e Abed N. Azab. 2016. "Psychotropic drugs attenuate lipopolysaccharide-induced hypothermia by altering hypothalamic levels of inflammatory mediators in rats". *Neuroscience Letters* 626. Elsevier Ireland Ltd: 59–67. doi:10.1016/j.neulet.2016.05.019.
- Natarajan, Reka, Nicole A. Northrop, e Bryan K. Yamamoto. 2015. "Protracted effects of chronic stress on serotonin-dependent thermoregulation". *Stress* 18 (6): 668–76. doi:10.3109/10253890.2015.1087502.
- Nguyen, K. D., S. J. Fentress, Y. Qiu, K. Yun, J. S. Cox, e A. Chawla. 2013. "Circadian Gene Bmal1 Regulates Diurnal Oscillations of Ly6Chi Inflammatory Monocytes". *Science* 341 (6153): 1483–88. doi:10.1126/science.1240636.
- Nishida, Akira, Kazue Hisaoka, Hidenobu Zensho, Yousuke Uchitomi, Shigeru Morinobu, e Shigeto Yamawaki. 2002. "Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders". *International Immunopharmacology* 2 (12): 1619–26. doi:10.1016/S1567-5769(02)00190-X.
- Norden, Diana M., Sabahattin Bicer, Yvonne Clark, Runfeng Jing, Christopher J. Henry, Loren E. Wold, Peter J. Reiser, Jonathan P. Godbout, e Donna O. McCarthy. 2015. "Tumor growth increases neuroinflammation, fatigue and depressive-like behavior prior

- to alterations in muscle function”. *Brain, Behavior, and Immunity* 43 (janeiro). Elsevier Inc.: 76–85. doi:10.1016/j.bbi.2014.07.013.
- Oka, Takakazu, Kae Oka, Takuya Kobayashi, Yukihiro Sugimoto, Atsushi Ichikawa, Fumitaka Ushikubi, Shuh Narumiya, e Clifford B. Saper. 2003. “Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors”. *Journal of Physiology* 551 (3): 945–54. doi:10.1113/jphysiol.2003.048140.
- Orthgiess, Johannes, Martin Gericke, Kerstin Immig, Angela Schulz, Johannes Hirrlinger, Ingo Bechmann, e Jens Eilers. 2016. “Neurons exhibit Lys2 promoter activity in vivo: Implications for using LysM-Cre mice in myeloid cell research”. *European Journal of Immunology* 46 (6): 1529–32. doi:10.1002/eji.201546108.
- Oudart, H, a Malan, Y Le Maho, e a Geloën. 2000. “Day–night pattern of energy expenditure and body temperature in cachectic tumour-bearing rats”. *British Journal of Cancer* 83 (8): 1055–60. doi:10.1054/bjoc.1999.1469.
- Ownby, Raymond L. 2010. “Neuroinflammation and cognitive aging”. *Current Psychiatry Reports* 12 (1): 39–45. doi:10.1007/s11920-009-0082-1.
- Pimplikar, Sanjay W. 2014. “Neuroinflammation in Alzheimer’s disease: From pathogenesis to a therapeutic target”. *Journal of Clinical Immunology* 34 (SUPPL. 1): 64–69. doi:10.1007/s10875-014-0032-5.
- Prinz, Marco, Hauke Schmidt, Alexander Mildner, Klaus Peter Knobloch, Uwe Karsten Hanisch, Jenni Raasch, Doron Merkler, et al. 2008. “Distinct and Nonredundant In Vivo Functions of IFNAR on Myeloid Cells Limit Autoimmunity in the Central Nervous System”. *Immunity* 28 (5): 675–86. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.011.
- Provenzano, Elena, Gary A. Ulaner, e Suet Feung Chin. 2018. “Molecular Classification of Breast Cancer”. *PET Clinics*. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.cpet.2018.02.004.
- Pyter, Leah M. 2016. “The influence of cancer on endocrine, immune, and behavioral stress responses”. *Physiology and Behavior* 166. Elsevier Inc.: 4–13. doi:10.1016/j.physbeh.2015.09.031.
- Pyter, Leah M., Sally F. Cochrane, Rebecca L. Ouwenga, Priyesh N. Patel, Vanessa Pineros, e Brian J. Prendergast. 2010. “Mammary tumors induce select cognitive impairments”.

- Brain, Behavior, and Immunity* 24 (6). Elsevier Inc.: 903–7. doi:10.1016/j.bbi.2010.02.004.
- Pyter, Leah M., Sarah El Mouatassim Bih, Husain Sattar, e Brian J. Prendergast. 2014. “Peripheral tumors alter neuroinflammatory responses to lipopolysaccharide in female rats”. *Brain Research* 1552. Elsevier: 55–63. doi:10.1016/j.brainres.2014.01.012.
- Pyter, Leah M., Lorena P. Suarez-Kelly, William E. Carson, Jasskiran Kaur, Joshua Bellisario, e Savannah R. Bever. 2017. “Novel rodent model of breast cancer survival with persistent anxiety-like behavior and inflammation”. *Behavioural Brain Research* 330 (April). Elsevier: 108–17. doi:10.1016/j.bbr.2017.05.011.
- Pyter, Leah M, Vanessa Pinerros, Jerome A Galang, Martha K McClintock, e Brian J Prendergast. 2009. “Peripheral tumors induce depressive-like behaviors and cytokine production and alter hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (22): 9069–74. doi:10.1073/pnas.0811949106.
- Quan, Ning. 2014. “In-depth conversation: Spectrum and kinetics of neuroimmune afferent pathways”. *Brain, Behavior, and Immunity* 40. Elsevier Inc.: 1–8. doi:10.1016/j.bbi.2014.02.006.
- Raison, Charles L., e Andrew H. Miller. 2003. “Depression in Cancer : New Developments Regarding Diagnosis and Treatment”. *Biological Psychiatry* 54 (3): 283–94. doi:10.1016/S0006-3223(03)00413-X.
- Reid-Arndt, S A, C Hsieh, e M C Perry. 2010. “Neuropsychological functioning and quality of life during the first year after completing chemotherapy for breast cancer”. *Psychooncology* 19 (1099–1611 (Electronic)): 535–44. doi:10.1002/pon.1581.Neuropsychological.
- Reilly, Eimear O., Andrea Tirincci, Susan E. Logue, e Eva Szegezdi. 2016. “The janus face of death receptor signaling during tumor immunoediting”. *Frontiers in Immunology* 7 (OCT): 1–14. doi:10.3389/fimmu.2016.00446.
- Roche, Véronique Pasquale, Ali Mohamad-Djafari, Pasquale Fabio Innominato, Abdoulaye Karaboué, Alexander Gorbach, e Francis Albert Lévi. 2014. “Thoracic surface

- temperature rhythms as circadian biomarkers for cancer chronotherapy”. *Chronobiology International* 31 (3): 409–20. doi:10.3109/07420528.2013.864301.
- Saavedra, Luis Miguel, Bertha Fenton Navarro, e Luz Torner. 2018. “Early life stress activates glial cells in the hippocampus but attenuates cytokine secretion in response to an immune challenge in rat pups”. *NeuroImmunoModulation* 24 (4–5): 242–55. doi:10.1159/000485383.
- Santos, Jessica C, e Leah M Pyter. 2018. “Neuroimmunology of Behavioral Comorbidities Associated with Cancer and Cancer Treatments”. *Front. Immunol* 9 (9). doi:10.3389/fimmu.2018.01195.
- Schmitt, Clemens A. 2003. “Senescence, apoptosis and therapy — cutting the lifelines of cancer”. *Nature Reviews Cancer* 3 (4): 286–95. doi:10.1038/nrc1044.
- Schreiber, Robert D. 2014. “Cancer Immunoediting : Integrating Suppression and Promotion” 1565 (2011): 1565–71. doi:10.1126/science.1203486.
- Schrepf, Andrew, Susan K. Lutgendorf, e Leah M. Pyter. 2015. “Pre-treatment effects of peripheral tumors on brain and behavior: Neuroinflammatory mechanisms in humans and rodents”. *Brain, Behavior, and Immunity* 49. Elsevier Inc.: 1–17. doi:10.1016/j.bbi.2015.04.010.
- Schumann, Ralf R. 2011. “Old and new findings on lipopolysaccharide- binding protein : a soluble pattern-recognition molecule”, 989–93. doi:10.1042/BST0390989.
- Sephton, Sandra E., Firdaus S. Dhabhar, Alex S. Keuroghlian, Janine Giese-Davis, Bruce S. McEwen, Alexei C. Ionan, e David Spiegel. 2009. “Depression, cortisol, and suppressed cell-mediated immunity in metastatic breast cancer”. *Brain, Behavior, and Immunity* 23 (8): 1148–55. doi:10.1016/j.bbi.2009.07.007.
- Shankaran, Vijay, Hiroaki Ikeda, Allen T. Bruce, J. Michael White, Paul E. Swanson, Lloyd J. Old, e Robert D. Schreiber. 2001. “IFN γ , and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity”. *Nature* 410 (6832): 1107–11. doi:10.1038/35074122.
- Silver, Adam C., Alvaro Arjona, Michael E. Hughes, Michael N. Nitabach, e Erol Fikrig. 2012. “Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B

- cells". *Brain, Behavior, and Immunity* 26 (3). Elsevier Inc.: 407–13. doi:10.1016/j.bbi.2011.10.001.
- Silverman, M. N., P. Mukhopadhyay, E. Belyavskaya, L. H. Tonelli, B. D. Revenis, J. H. Doran, B. E. Ballard, J. Tam, P. Pacher, e E. M. Sternberg. 2013. "Glucocorticoid receptor dimerization is required for proper recovery of LPS-induced inflammation, sickness behavior and metabolism in mice". *Molecular Psychiatry* 18 (9). Nature Publishing Group: 1006–17. doi:10.1038/mp.2012.131.
- Singhal, Gaurav, Emily J. Jaehne, Frances Corrigan, Catherine Toben, e Bernhard T. Baune. 2014. "Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review". *Frontiers in Neuroscience* 8 (SEP): 1–22. doi:10.3389/fnins.2014.00315.
- Smith, B K, e M J Kluger. 1993. "Anti-TNF-alpha antibodies normalized body temperature and enhanced food intake in tumor-bearing rats." *The American journal of physiology* 265 (3 Pt 2): R615-9. <http://ajpregu.physiology.org/content/265/3/R615.abstract>.
- Tollner, B, J Roth, B Storr, D Martin, K Voigt, e E Zeisberger. 2000. "The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide". *Pflugers Arch* 440 (6): 925–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11041560.
- Vichaya, Elisabeth G., Daniel W. Vermeer, Diana L. Christian, Jessica M. Molkenhine, Kathy A. Mason, John H. Lee, e Robert Dantzer. 2017. "Neuroimmune mechanisms of behavioral alterations in a syngeneic murine model of human papilloma virus-related head and neck cancer". *Psychoneuroendocrinology* 79. Elsevier Ltd: 59–66. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.02.006.
- Vin-Raviv, Neomi, Grace Clarke Hillyer, Dawn L. Hershman, Sandro Galea, Nicole Leoce, Dana H. Bovbjerg, Lawrence H. Kushi, et al. 2013. "Racial disparities in posttraumatic stress after diagnosis of localized breast cancer: The BQUAL study". *Journal of the National Cancer Institute* 105 (8): 563–72. doi:10.1093/jnci/djt024.
- Vincent, A. J., S. Ranasinha, P. Sayakhot, D. Mansfield, e H. J. Teede. 2014. "Sleep difficulty mediates effects of vasomotor symptoms on mood in younger breast cancer survivors". *Climacteric* 17 (5): 598–604. doi:10.3109/13697137.2014.900745.

- Volden, Paul A, e Suzanne D Conzen. 2013. “The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression”. *Brain Behavior and Immunity* 30: S26–31. doi:10.1016/j.bbi.2012.10.022.
- Walker, A. K., A. Kavelaars, C. J. Heijnen, e R. Dantzer. 2013. “Neuroinflammation and Comorbidity of Pain and Depression”. *Pharmacological Reviews* 66 (1): 80–101. doi:10.1124/pr.113.008144.
- Wang, Xin Shelley. 2008. “Pathophysiology of Cancer-Related Fatigue”. *Clinical Journal of Oncology Nursing* 12 (Figure 1): 11–20. doi:10.1188/08.CJON.S2.11-20.
- Wefel, Jeffrey S., Shelli R. Kesler, Kyle R. Noll, e Sanne B. Schagen. 2015. “Clinical characteristics, pathophysiology, and management of noncentral nervous system cancer-related cognitive impairment in adults”. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65 (2): 123–38. doi:10.3322/caac.21258.
- Wefel, Jeffrey S., Renato Lenzi, Richard L. Theriault, Robert N. Davis, e Christina A. Meyers. 2004. “The cognitive sequelae of standard-dose adjuvant chemotherapy in women with breast carcinoma: Results of a prospective, randomized, longitudinal trial”. *Cancer* 100 (11): 2292–99. doi:10.1002/cncr.20272.
- Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS, Davis VL. 2006. “Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors : potential clinical uses in the prevention of osteoporosis , cancer and as an adjuvant therapy”, 297–305. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00369.x.
- Wulff, Katharina, Kate Porcheret, Emma Cussans, e Russell G. Foster. 2009. “Sleep and circadian rhythm disturbances: multiple genes and multiple phenotypes”. *Current Opinion in Genetics and Development*. doi:10.1016/j.gde.2009.03.007.
- Yang, Miyoung, Juhwan Kim, Joong Sun Kim, Sung Ho Kim, Jong Choon Kim, Man Jong Kang, Uhee Jung, Taekyun Shin, Hongbing Wang, e Changjong Moon. 2014. “Hippocampal dysfunctions in tumor-bearing mice”. *Brain, Behavior, and Immunity* 36. Elsevier Inc.: 147–55. doi:10.1016/j.bbi.2013.10.022.