

DANIELI ALESSANDRA GATTO

**Avaliação do efeito da Temozolomida sobre o
fenótipo de células dendríticas derivadas de
monócitos *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de SãoPaulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2022

DANIELI ALESSANDRA GATTO

**Avaliação do efeito da Temozolomida
sobre o fenótipo de células
dendríticas derivadas de monócitos
*in vitro.***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação
em Imunologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José
Alexandre M. Barbuto

Versão Original

São Paulo
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Danieli Alessandra Gatto

Título da Dissertação/Tese: Avaliação do efeito da Temozolomida sobre o fenótipo de células dendríticas derivadas de monócitos *in vitro*.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05500-000
Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 22 de abril de 2019.

PARECER 1437/CEPSH

CAAE nº 06379318.4.0000.5467

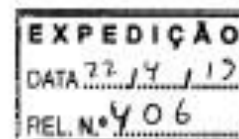
Protocolo CEPSH-ICB nº 1470/19

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, em 09/04/2019, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Avaliação do efeito da Temozolomida sobre o fenótipo de células dendríticas derivadas de monócitos**", dos pesquisadores: **José Alexandre Marzagão Barbuto e Danieli Alessandra Gatto**.

Caberá aos pesquisadores, em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012: 1) elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) conforme modelo constante no site: www2.icb.usp.br/icb/cepsb; 2) desenvolver o projeto conforme metodologia apresentada; 3) manter em arquivo sob sua guarda (impresso ou digital), por até 5 anos após conclusão da pesquisa, toda documentação relacionada a pesquisa; 4) encaminhar os resultados para publicação; 5) justificar ao CEP, via Plataforma Brasil, interrupção do projeto ou a não publicação de resultados; 6) finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **09/04/2020**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



Dedicatória

Dedico este trabalho a todos pacientes com câncer, especialmente aos diagnosticados com Glioblastoma.

A todos os pacientes que aceitaram participar da nossa pesquisa com Imunoterapia e depositaram esperanças em nosso trabalho.

A todas as pessoas que acreditam que a ciência é o caminho para melhorar o desfecho clínico desta doença.

A todos os cientistas que depositam seus esforços na luta contra o câncer

Agradecimentos

A Deus, pela permissão de realizar este projeto que sempre foi um sonho para mim, por me conceder saúde para concluí-lo, por me dar forças para superar todas as dificuldades e obstáculos, conceder sabedoria e entendimento para fazer boas escolhas, dar paciência nos momentos difíceis que eu pensei em desistir, proteção em todos meus caminhos e por entregar amor que foi o combustível para eu chegar até aqui.

A eu mesma, por nunca ter desistido e deixado de acreditar que eu posso ir longe e conquistar meus sonhos, mesmo passando por inúmeras dificuldades, morando longe da universidade e ouvindo palavras desmotivadoras que me fizeram chorar, mas que não foram o suficiente para me fazer desistir.

A minha família, especialmente meu pai, Carlos Gatto, por todo sacrifício, doação, preocupação, ajuda ao longo da minha vida e por ser meu modelo de coragem.

Ao meu orientador Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, que desde o começo me ajudou com os estudos, com o preparo para a prova de imunologia do departamento e pela oportunidade de ser aluna em seu laboratório. Além de ser um excelente cientista, professor e profissional da área, é uma inspiração para mim e para todos que tem a honra de conhecê-lo.

Aos amigos e colegas do laboratório Imunologia de Tumores, em especial os queridos Célia, Renato, Renata e Nataly, no qual eu tenho muito carinho, pois sempre me ajudaram e apoiaram durante a minha trajetória acadêmica e em todos nossos momentos vividos

dentro e fora do laboratório, qual deixaram meus dias mais leves.

Aos amigos e colegas do departamento em especial, Tiago da Silva e Tiago Francisco pela amizade e por toda ajuda que me ofereceram durante esta jornada.

A todos os funcionários do departamento, por manterem o prédio em funcionamento, em especial o pessoal da portaria que sempre me receberam pela manhã com alegria e muitas risadas.

Ao Prof^o. Dr. Carlos Frederico Martins Menck do Laboratório de Reparo de DNA, localizado no Departamento de Microbiologia do ICB-USP, por ter me doado o fármaco Temozolomida, a ferramenta essencial para a realização do meu trabalho e também por ter aceitado participar da minha banca de qualificação de mestrado.

Ao Prof^o Dr. Tiago Medina do Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, por ter aceitado participar da minha banca de qualificação e por ter oferecido a toda a infraestrutura da sala de citometria de fluxo do A.C. Camargo para a continuação dos meus experimentos.

A Clara Maciel Cavalcante do Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, por ter me ajudado com muita paciência e profissionalismo nas leitura das amostras celulares por citometria de fluxo.

A todas as pessoas que me doaram sangue para a realização do meu trabalho, principalmente para obtenção das células dendríticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado,

no qual ajudou para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos que compartilharam comigo momentos de felicidade quando ingressei na pós-graduação, me apoiaram ou me ajudaram de alguma forma a tornar meus dias mais leves durante todos os anos de curso, em especial Priscila, Tatiana, Marcela, Marília, Ana Paula, Quezia, Cibelle, Fabielle, Tamires, Beatriz, Lara, Rafael e André.

A Daiane Rocha, minha amiga, por sempre me apoiar, acreditar em mim e incentivar a realizar este trabalho do começo ao fim, sempre oferecendo o ombro amigo e torcendo pelo meu sucesso.

A Daniela Currol, por me ajudar com muita paciência na leitura, compreensão e correção dos meus textos antes da qualificação.

A todas as pessoas que eu conheci e fiz amizade durante as caronas diárias de Jundiaí/São Paulo, todos foram essenciais para deixar minha viagem mais leve e diminuir o cansaço do dia-a-dia.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho os meus mais sinceros agradecimentos.

'Um dia, o câncer será apenas um signo'

RESUMO

GATTO, D. A. **Avaliação do efeito da Temozolomida sobre o fenótipo de células dendríticas derivadas de monócitos *in vitro***. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências com ênfase em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O glioblastoma (GBM) é o tumor maligno mais frequente do Sistema Nervoso Central, possui um prognóstico ruim, perspectiva de vida abaixo de 15 meses e aumento em sua incidência todos os anos. O tratamento atual consiste em ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterapia com Temozolomida, mesmo assim essa estratégia demonstra-se falha pelo alto índice de reincidência tumoral e baixa sobrevida dos pacientes. Assim, outras abordagens terapêuticas vêm sendo desenvolvidas e, dentre elas, a imunoterapia.

Considerando-se que no GBM, os pacientes recebem, por padrão, tratamento com a Temozolomida, as pesquisas concentram seus esforços na associação da quimioterapia com outras formas de tratamento, especialmente a imunoterapia.

O presente projeto teve como objetivo investigar os efeitos da TMZ sobre o fenótipo das DCs derivadas de monócitos (Mo-DCs), que são usadas em diferentes protocolos de imunoterapia com vacinação de DCs.

Para tanto, a TMZ foi adicionada sobre monócitos (simultaneamente à sua exposição as citocinas que induzem sua diferenciação em DC) ou sobre Mo-DCs imaturas (cinco dias após o início da cultura) e a cultura celular continuou até o sétimo dia para avaliação do seu fenótipo. A expressão de marcadores associados ao poder “imunoestimulador” das DC, CD80, CD86 e CD83 apresentou mudanças sugestivas de maturação de DCs imaturas, quando tratadas com o fármaco. Este efeito maturador da TMZ aparenta ser, inclusive maior que a citocina usualmente usada para induzir a maturação das DC, o TNF- α .

Embora preliminares, também pareceu ocorrer aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células tratadas com TMZ isolada, que acabam causando lesões no DNA e a reparação está relacionada com a

mudança no perfil fenotípico e funcional das DCs, o que seria coerente com dados da literatura e com a atividade aparentemente maturadora da TMZ sobre as DCs imaturas vistas neste trabalho.

Palavras-chaves: Imunoterapia, célula dendrítica, temozolomida, glioblastoma

ABSTRACT

GATTO, D. A. **Evaluation of the effect of Temozolomide on the phenotype of dendritic cells derived from monocytes in vitro**. 2022. Dissertation (Master of Science with an emphasis on Immunology). Institute of Biomedical Sciences. University of São Paulo, São Paulo, 2022.

The Glioblastoma is the most common malignant tumor of the Central Nervous System. Has a bad prognosis, a life expectancy of less than 15 months and increase in its incidence every year.

The current treatment consists of surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy with Temozolomide, even so, this strategy proves to be a failure due to the high rate of tumor recurrence and low patient survival. However, other therapeutic approaches have been developed and among them, immunotherapy. Considering that in GBM, patients receive treatment with Temozolomide by default, research focuses its efforts on the association of chemotherapy with other forms of treatment, especially immunotherapy.

The project aimed to investigate the effects of TMZ on the phenotype of monocyte-derived DCs (Mo-DCs), which are used in different immunotherapy protocols with DC vaccination.

For this, TMZ was added to monocytes (simultaneously with their exposure to cytokines that induce their differentiation into DC) or to immature Mo-DC (five days after the start of estrus culture) and cell culture continued until the seventh day for evaluation. of your phenotype.

The expression of markers associated with the "immunostimulatory" power of DC, CD80, CD86 and CD83 showed changes suggestive of maturation of immature DCs when treated with the drug. This effect of TMZ appears to be even greater than the cytokine usually used to induce DC maturation, TNF- α .

In the preliminaries, there also seemed to be an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) in cells treated with TMZ alone, which end up causing DNA damage and repair is related to the change in the phenotypic and functional profile of DCs, which would be consistent with data from the literature

and with the apparently maturing activity of TMZ on the immature DCs seen in this work.

Keywords: Immunotherapy, dendritic cell, temozolomide, glioblastoma

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BER	Reparo por excisão de base
CAR-T	Receptor quimérico das células T
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CTLA-4	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DC	Célula dendrítica
DHR	Dihidrorodamina 123
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	Receptor do fator de crescimento da epiderme
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GBM	Glioblastoma
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Monócitos
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano - DR
iDC	Célula dendrítica imatura
IDH1 / 2	Gene isocitrato desidrogenase 1 e 2
IFN-γ	Interferon-gama
IL-4	Interleucina 4
IL-2Rα	Cadeia alfa do receptor da interleucina-2
mDC	Célula Dendrítica Madura
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
Mo-DCs	Célula dendrítica derivada de monócito
mo-mDC	Célula dendrítica madura derivada de monócito
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazólio
NF1	Gene neurofibromatose tipo I
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico

PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDGFRA	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PD-1	Receptor de morte celular programada 1
PD-L1	Ligante 1 de morte celular programada
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
TMZ	Temozolomida
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg	Linfócitos T reguladores

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Capacidade de redução do MTT por células tratadas com diferentes doses de TMZ.
- Figura 2** Efeito do tratamento com TMZ no dia 0 da diferenciação celular, sobre a viabilidade das células marcadas com LIVE/DEAD
- Figura 3** Efeito do tratamento com TMZ no dia 5 da diferenciação celular, sobre a viabilidade das células marcadas com LIVE/DEAD
- Figura 4** Estratégia de análise das células por citometria de fluxo.
- Figura 5** Expressão de CD80 na superfície de Mo-DCs
- Figura 6** Expressão de CD86 na superfície de Mo-DCs.
- Figura 7** Análise da expressão de CD83 na superfície de Mo-DCs
- Figura 8** Estratégia de análise de DHR por citometria de fluxo
- Figura 9** Análise da produção de EROS

SUMÁRIO

Dedicatória.....	4
Agradecimentos.....	5
Resumo.....	9
Lista de abreviaturas.....	13
Lista de Ilustrações.....	14
Introdução.....	18
O Glioblastoma.....	18
Efeito da TMZ sobre o GBM.....	20
A Célula Dendrítica.....	21
Imunoterapia do câncer.....	23
Objetivos.....	26
Materiais e Métodos.....	27
Obtenção de Mo-DC in vitro.....	27
Tratamento das células com TMZ.....	27
Avaliação da toxicidade da TMZ sobre as células em cultura.....	28
Avaliação do fenótipo de membrana de Mo-DC tratadas ou não com TMZ..	28
Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por Mo-DC tratadas ou não com TMZ.....	29
Análise Estatística.....	30
Resultados.....	31
Caracterização das Mo-DCs obtidas em cultura celular.....	31
Concentração de TMZ para tratamento das células.....	32
Toxicidade da TMZ sobre as Mo-DCs.....	34
Efeito da TMZ sobre a expressão de moléculas coestimuladoras por Mo- DC.....	35
- Efeito sobre a expressão de HLA-DR.....	36
- Efeito sobre a expressão de CD80.....	39
- Efeito sobre a expressão de CD86.....	41
- Efeito sobre a expressão de CD83.....	43
Efeito da TMZ sobre a produção de EROS pelas Mo-DCs.....	46
Discussão.....	48

Conclusão.....	54
Referências.....	55

1. INTRODUÇÃO

O Glioblastoma

As neoplasias do sistema nervoso central (SNC) estão associadas a morbidade e mortalidade significativas, o Glioblastoma (GBM) é o tumor do SNC de maior malignidade e letalidade entre todos os gliomas (Thakkar et al., 2014). A incidência do GBM é de aproximadamente 3,2 / 100.000 pessoas e 17.000 novos casos são diagnosticados anualmente no mundo (Ostrom et al., 2014). A doença é mais prevalente em homens do que em mulheres, em brancos em comparação a negros, e a idade média de diagnóstico é de aproximadamente 64 anos (Gittleman et al., 2019; Ostrom et al., 2013). Os sintomas são progressivos ao longo de dias à semanas. Dor de cabeça que é o sintoma mais comum, seguido por convulsões, déficits neurológicos focais e sintomas associados à pressão intracraniana elevada, como náusea, vômito, visão embaçada e estado mental alterado (Urbanska et al., 2014).

O prognóstico é ruim e a média da sobrevida é de 15 meses após o diagnóstico (Stupp et al., 2005) com menos de 10% dos pacientes sobrevivendo por 5 anos ou mais desde o momento do diagnóstico (Ostrom et al., 2018).

O GBM apresenta resistência as terapias citotóxicas, principalmente as suas células tronco (GSCs) que foram reconhecidas como pluripotentes, de divisão lenta, e residentes nos nichos hipóxicos perivasculares do cérebro (Calabrese et al., 2007).

Vários estudos estabeleceram que essas populações heterogêneas de GSCs são a fonte primária de heterogeneidade intratumoral (Herting et al., 2018; Meyer et al., 2014; West & Harsh, 2016) e responsáveis pelos diferentes subtipos transcricionais de tumores que estão associados a resposta do tumor aos tratamentos (Ohgaki & Kleihues, 2013).

Esta neoplasia pode ser classificada em três subtipos de acordo com seu perfil mutacional: pró-neural, clássico e mesenquimal.

O subtipo pró-neural é descrito principalmente por mutações no gene PDGFRA ou no gene IDH1 / 2, tem vasculatura desorganizada e é o de melhor prognóstico clínico. O subtipo clássico é definido pela amplificação / mutação do

gene EGFR; mutações na neurofibromina 1 são encontradas, principalmente, no subtipo mesenquimal, que apresenta um grande número de macrófagos associados ao tumor, pouca vascularização e mais uniforme, com o pior prognóstico clínico (Herting et al., 2018; Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010)

O GBM é caracterizado por crescimento difuso, infiltrativo, com grande plasticidade celular e espacialmente heterogêneo devido aos nichos criados pelos gradientes de hipóxia (Wirsching et al., 2016), na ressonância magnética com contraste, o tumor apresenta realce heterogêneo e necrose central, implicando em um centro altamente vascular, porém hipóxico, com uma periferia relativamente rica em oxigênio (Gill et al., 2014).

Além disso, este tumor é capaz manipular todos os tipos de células ao seu redor, afim de estimular a angiogênese (Jhaveri et al., 2016), suprimir as funções das células imunes (See et al., 2015), alterar a matriz extracelular para facilitar a infiltração do tumor (Pencheva et al., 2017), criando um ambiente propício para o crescimento, sobrevivência ao estresse celular, capacidade de proliferar sob condições restritivas e invasão do tecido.

Infelizmente, os tratamentos atuais não apresentam bons resultados e grandes benefícios clínicos. O padrão-ouro de tratamento atualmente é a cirurgia, seguida de radioterapia e quimioterapia com Temozolomida (TMZ) (Ellsworth et al., 2017). Entretanto, esta estratégia clínica nem sempre apresenta bons resultados, principalmente por ser a ressecção cirúrgica total, raramente executável, e assim permitir que células tumorais restantes no cérebro deem origem a recidiva da doença. Essas células tumorais que terão sido expostas ao estresse da irradiação e da quimioterapia, frequentemente terão adquirido carga mutacional mais alta e se tornado resistentes às terapias que já foram aplicadas (Neilsen et al., 2019; Weiss et al., 2016).

Efeito da TMZ sobre o GBM

O agente alquilante temozolomida (TMZ) é um dos poucos medicamentos antitumorais administrados por via oral e que tem capacidade de passar facilmente pela barreira hematoencefálica (Agarwala & Kirkwood, 2000; J. Zhang et al., 2012). Assim, após a aprovação pela agência Food and Drug Administration (FDA) em 2005, a TMZ se tornou a terapia medicamentosa de primeira linha para tratar o glioblastoma (Stupp et al., 2005).

A TMZ é uma substância lipofílica com baixo peso molecular, com boa absorção por via oral, não necessitando de metabolização hepática, é hidrolisada em pH fisiológico, tem uma rápida eliminação e seus efeitos adversos não são idade-dependente (Friedman et al., 2000).

O fármaco é um agente alquilante que adiciona moléculas de metil na estrutura do DNA, principalmente nas posições O6 e N7 da guanina e N3 da adenina, formando adutos na fita de DNA (Mutter & Stupp, 2006).

As metilações em N7 da guanina e N3 da adenina são equivalentes a aproximadamente 90% do dano no DNA causado pela TMZ. Estes danos são, no entanto, rapidamente corrigidos pelo sistema de reparo por excisão de bases (BER), utilizado para remover e substituir as bases danificadas que distorcem a dupla hélice do DNA e geram consequências fatais a célula (Wallace, 2014). Os outros 10% das lesões são na região O6 da guanina, e representam o efeito biológico mais importante e citotóxico da TMZ (Atkins et al., 2015); para corrigir esse dano ocorre a ativação da enzima de reparo O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), que remove as moléculas de metil adicionadas no DNA e, na insuficiência desse mecanismo, acontece a morte celular por apoptose (Al-Badr & Alodhaib, 2016; Drabløs et al., 2004).

A atividade do gene MGMT é um dos principais mecanismos que contribuem para a sensibilidade ou resistência à TMZ em pacientes com GBM. Os pacientes com as regiões promotoras do gene MGMT hipermetiladas, tem uma atividade enzimática da MGMT reduzida, sendo assim removem sem eficácia os grupos metil da fita de DNA, tornando as células tumorais mais sensíveis ao efeito farmacológico da TMZ. Os pacientes com sobrevida extremamente longa, acima de 4 anos após o diagnóstico, são caracterizados

pela da atividade de MGMT transferase. Já os pacientes com este gene não-metilado, são muito menos responsáveis ao tratamento alquilante (Hegi et al., 2005; Villalva et al., 2012).

Naturalmente, a quimioterapia não age somente no tumor, células não neoplásicas também são alvo da toxicidade grave e, por muitas vezes ocorre o aparecimento de linfopenia e risco aumentado do desenvolvimento de infecções oportunistas (Stepanovic & Nikitovic, 2018)

Recentemente, um outro lado destas ações extra-neoplásicas tem sido reconhecido (Dalglish, 2015; Stojanovska et al., 2019). Já se sabe que alguns agentes quimioterapêuticos, como a TMZ, tem efeitos imunomoduladores benéficos para o sistema imune, como a indução de proliferação de células T efectoras pós quimioterapia em humanos (Campian et al., 2017); diminuição de células T reguladoras (Treg) (Fridlender et al., 2010) e aumento de morte celular imunogênica (Kim et al., 2010), podendo levar a uma maior apresentação cruzada e, portanto, ativação das células T (Karachi et al., 2018). Tais efeitos imunomoduladores da TMZ dependem do momento e da dose administrada e parecem ser promissores para melhorar a resposta de pacientes que recebem imunoterapia (Ouyang et al., 2016), contudo, para o GBM, estudos sobre a combinação da imunoterapia com a TMZ ainda precisam ser desenvolvidos.

A Célula Dendrítica

As células dendríticas (DC) são células apresentadoras de antígenos profissionais (APC) e as mais potentes em ativar os linfócitos T (Banchereau et al., 2000). As DC encontram-se na maioria dos tecidos num estado imaturo, capturando e processando constantemente os antígenos ali presentes. As DC imaturas (iDC) possuem uma alta capacidade endocítica, baixa expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), coestimuladoras (incluindo CD80, CD86, CD83 e CD40) e baixa capacidade de ativação dos linfócitos T (Sallusto & Lanzavecchi, 1994).

Para a ativação da resposta imune adaptativa, é necessário a ativação/maturação das DC, o que ocorre a partir da detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) ou de padrões moleculares

associados ao dano (DAMP), por receptores de reconhecimento de padrões (PRR), ou da ação de citocinas pro-inflamatórias (Mellman & Steinman, 2001). Em tumores, células tumorais lesadas pela quimioterapia, podem liberar moléculas que são reconhecidas como DAMP pelas DC, induzindo, assim, sua maturação (Zitvogel et al., 2011)

As DC maduras (mDC) apresentam menor capacidade de fagocitose, maior expressão de moléculas de MHC e de moléculas co-estimuladoras (Guermonprez et al., 2002).

A apresentação de peptídeos derivados de antígenos exógenos pelas mDC é preferencialmente realizada através de moléculas de MHC de classe II aos linfócitos T CD4+. Todavia, também pode ocorrer apresentação de antígenos exógenos via moléculas de MHC de classe I, e a linfócitos T CD8+, através de um fenômeno chamado de apresentação cruzada (Joffre et al., 2012; Jung et al., 2002). Isto permite o desencadear de respostas contra antígenos intracelulares de outros tipos celulares, sendo um processo essencial para respostas imunes contra células tumorais e, também, contra vários vírus (McDonnell et al., 2010; van Mierlo et al., 2004).

A DC também é conhecida por ter um papel importante na indução da tolerância a antígenos próprios (Lewis & Reizis, 2012). Estes, apresentados no contexto da apresentação cruzada e na ausência de moléculas co-estimuladoras induzem, por diferentes mecanismos, um estado de tolerância ao próprio. Tais mecanismos, são muitas vezes “explorados” pelas neoplasias para permitir seu escape ao controle imunitário (Dhodapkar et al., 2008; McDonnell et al., 2010; Sotomayor et al., 2001)

Estudos do nosso laboratório mostram que as DC geradas *in vitro*, a partir de monócitos (Mo-DCs) do sangue de pacientes com câncer, frequentemente possuem um fenótipo típico de iDC e têm um viés em direção à indução de células Treg (Neves et al., 2005; Ramos et al., 2012) que tem papel central, muitas vezes, na falha do sistema imunológico em eliminar ou controlar tumores (Campanelli et al., 2006).

Em outro estudo do nosso grupo, observou-se que em um paciente com carcinoma de células renais cromóforo depois da ressecção tumoral, houve uma

recuperação funcional das Mo-DCs a partir de uma expressão diminuída de PD-L1, gerando aumento na capacidade de estimular a proliferação de células T, juntamente com a expressão de IL-2R α e a produção de IFN- γ . Três meses após a cirurgia, as Mo-DCs do paciente exibiam propriedades funcionais semelhantes às dos controles saudáveis, sugerindo que a presença do tumor era a causa da função Mo-DCs enviesada no paciente (Clavijo-Salomon et al., 2014).

Assim, considerando o papel biológico das DC e sua “disfunção” em pacientes com neoplasias, o estudo deste tipo celular pode abrir, e tem aberto, espaço para novas abordagens terapêuticas contra o câncer.

Imunoterapia do câncer

Como avanço científico no tratamento do câncer, pode-se citar a introdução da imunoterapia. Esta forma de tratamento é fruto de décadas de investigação sobre os mecanismos de interação entre o câncer e o sistema imune, e tem o potencial de gerar uma resposta boa e duradoura contra a doença (Coventry et al., 2015).

As estratégias de imunoterapia contra o câncer têm como objetivo estimular respostas imunes inatas ou adaptativas contra células malignas. Durante a última década, os regimes de imunoterapia tiveram notável progresso clínico em pacientes com câncer, particularmente aqueles com tumores sólidos, superando os sinais imunossupressores presentes no microambiente tumoral (Gotwals et al., 2017; Pham et al., 2018; Topalian et al., 2015)

O recente sucesso clínico com interferência nos “*checkpoints*” imunológicos. Usando anticorpos bloqueadores para o “antígeno-4 do linfócito T citotóxico” (CTLA-4) e “morte programada-1” (PD-1), ou das células T com receptores de antígeno quiméricos (CAR-T) representam o resultado de muitos estudos e demonstram o grande potencial do sistema imune contra as neoplasias (Cousin-Frankel, 2013)

Apesar desses grandes avanços, o uso clínico da imunoterapia enfrenta vários desafios relacionados à eficácia e segurança. Com relação à eficácia, aproximadamente 20 a 30% dos pacientes respondem ao tratamento com os

anticorpos bloqueadores dos *checkpoints* imunológicos. E em relação à segurança, o tratamento pode induzir efeitos colaterais autoimunes, levando a ataques a tecidos saudáveis e efeitos adversos potencialmente letais (Comont et al., 2020; Sato et al., 2019; Wang et al., 2019). Por outro lado, a terapia com células CAR-T é baseada em receptores de antígenos quiméricos e sintéticos que redirecionam as células T para os antígenos de superfície das células tumorais, com a finalidade de suprimir o crescimento do tumor e estabelecer imunidade a longo prazo. Porém ainda não se mostraram eficazes contra tumores sólidos, impondo um grande limite à sua utilização (Servais, 2016).

Dentre todas as formas de imunoterapia, a de interesse para este trabalho é a vacinação com DCs, que utiliza Mo-DCs obtidas a partir de doadores saudáveis, fundidas com células tumorais do paciente, permitindo preservar os antígenos de superfície dos dois tipos celulares e assim possibilitar que as DCs apresentem de forma eficaz antígenos tumorais (Barbuto et al., 2004). Esta estratégia também elimina a necessidade de similaridade de MHC entre as células do receptor e doador das DCs a fusão dos dois tipos celulares provê as moléculas de MHC do paciente para a apresentação autóloga e as do doador podem ocasionar o efeito alogênico, que potencializa e melhora a resposta antitumoral, induzindo a expressão de citocinas por populações de linfócitos T CD4+ alo-reativas (Elfenbein et al., 1974)

Em nosso laboratório, DCs alogênicas fundidas com células tumorais autólogas, foram utilizadas para vacinação em um estudo com pacientes com melanoma ou câncer renal metastático e 71% dos pacientes participantes mostraram estabilidade da doença com duração de até 19 meses após vacinação (Barbuto et al., 2004).

Do outro lado, as imunoterapias eram tradicionalmente consideradas irrelevantes para doenças do SNC, o cérebro era visto como um órgão com privilégio imunológico devido à barreira hematoencefálica, mas esse paradigma mudou à medida que um número crescente de estudos demonstrou a interferência entre células imunes sistêmicas e residentes no SNC. Assim, novas estratégias terapêuticas com ferramentas do sistema imunológico estão sendo

buscadas para melhorar a sobrevida e o quadro clínico desses pacientes (Lim et al., 2018; Preusser et al., 2015).

Nos dias de hoje, há estudos de imunoterapia à base de vacinação com DC que apresentaram melhora na sobrevida mediana dos pacientes com GBM, em um deles a vacinação é feita com células dendríticas autólogas pulsadas com lisados tumorais (Liau et al., 2018), e o outro com DC autólogas pulsadas com múltiplos antígenos associados a tumor (Phuphanich et al., 2013).

Todavia, conforme apresentado acima, o problema do uso das DC autólogas é a sua alteração funcional em pacientes com câncer. Sendo assim, estudos com DC alogênicas fusionadas com células tumorais para o tratamento do GBM podem ser uma boa opção.

No entanto, pacientes em tratamento de GBM precisam de medidas urgentes para desacelerar o avanço da doença e para conseguir isso, intervenções imunológicas podem não ser as ideais, devido à cinética da resposta imune, mas podem ser vantajosas em combinação com os tratamentos já utilizados. Neste contexto, a combinação com a TMZ, que é o fármaco de escolha nesta doença, parece atraente. A TMZ demonstrou ter propriedades imunomoduladoras benéficas, dependendo da dose, tempo e forma de administração (Karachi et al., 2018; Neyns et al., 2010). Porém, a literatura ainda é escassa nesta linha de estudos, principalmente no que concerne aos efeitos da TMZ sobre as DC, e este trabalho pretende contribuir para a avaliação dos mesmos, e, eventualmente, poder ajudar a definir a melhor forma de combinação da TMZ com a vacinação de células dendríticas em pacientes portadores de GBM.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito direto da TMZ sobre o fenótipo de membrana de Mo-DCs *in vitro*.

Para isto, foram avaliados os efeitos do tratamento com TMZ sobre monócitos e iDC. Em cada condição as Mo-DCs, obtidas após o tratamento e cultura, foram avaliadas quanto à: viabilidade; expressão das moléculas HLA-DR, CD80, CD86 e CD83.

Foi acrescentado durante o trabalho a avaliação da produção de EROS pelas iDC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de Mo-DC *in vitro*

Sangue periférico foi coletado de doadores saudáveis e as células mononucleares (PBMCs) foram separadas por centrifugação sobre Ficoll-Paque. As PBMCs foram adicionadas a frascos de cultura de células em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de uma solução de penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/mL) (R-10). As células foram incubadas por 2 horas em estufa, em atmosfera saturada de água, com 5% de CO₂, a 37°C. Depois da incubação as células não aderentes foram removidas e as células aderentes foram cultivadas em meio R-10 suplementado com fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (50 ng/mL) PeproTech e interleucina 4 (IL-4) (50 ng/ml) Peprotech (dia 0). Após 5 dias (dia 5), as células receberam estímulo de maturação com o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (50 ng/ml) e as células maduras (mo-mDC) foram obtidas 48 horas após a ativação.

3.2 Tratamento das células com TMZ

A dose de TMZ de 40 µM, usada *in vitro* foi determinada em ensaios de padronização desenhados a partir de dados da literatura, que descreve, em pacientes submetidos a tratamento com o fármaco, uma concentração plasmática da TMZ, entre 50 µM a 80 µM (Brada et al., 1999; Joel et al., 1997; Strik et al., 2012), com concentrações no tecido cerebral entre 9 µM a 19 µM e no glioma entre 15 µM a 34 µM (Rosso et al., 2009); *in vitro*, sobre células tronco tumorais de GBM, doses sub-letais de TMZ foram descritas como entre 5 µM e 15 µM (Beier et al., 2008, 2012).

A partir do processo de obtenção das Mo-DCs, o fármaco foi acrescentado aos monócitos (dia 0) permanecendo por 7 dias em cultura, às Mo-DCs imaturas (dia 5) permanecendo por 2 dias em cultura e às Mo-DCs maduras (dia 7) permanecendo por 1 dia em cultura. Após, o fim do período de cultura celular as células foram submetidas ao ensaio de MTT.

3.3 Avaliação da toxicidade da TMZ sobre as células em cultura

Após o processo de obtenção das PBMCs, as células foram plaqueadas na densidade de 10^5 células/poço em placas de 96 poços com fundo U, As células não aderentes foram descartadas e as células aderentes ficaram na placa para a diferenciação celular. As células foram cultivadas com TMZ em concentrações de 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, ou 60 μ M, acrescentadas no dia 0, dia 5 ou dia 7 da diferenciação celular. Após o fim do período de cultura e diferenciação celular, foi adicionado 10 μ L de MTT a 5 mg/mL em cada poço e a placa foi incubada por 3 h. A placa foi então centrifugada a 240 g por 10 minutos, o meio foi removido e os cristais de formazam diluídos em 100 μ L de DMSO. Neste experimento, os valores de absorbância obtidos dos poços controle, ou seja, expostas somente ao meio com o veículo, representam 100% de viabilidade celular. A citotoxicidade foi determinada pelo cálculo estimado da concentração do IC₅₀, a partir da curva dose-resposta de cada fármaco, após cálculo de viabilidade celular através das densidades ópticas obtidas utilizando o leitor de microplacas (VERSAmaxTunableMicroplate Reader, Molecular Devices, CA, EUA) em comprimento de onda de 538 nm.

3.4 Avaliação do fenótipo de membrana de Mo-DC tratadas ou não com TMZ

Após 7 dias de cultura celular as Mo-DCs foram retiradas da placa com a solução contendo salina tamponada com fosfato (PBS) 2 mM de EDTA, em seguida foram lavadas somente PBS, e centrifugadas por 10 minutos a 300g em um tubo cônico. Após este processo os anticorpos específicos para as moléculas de interesse, foram adicionados nos tubos e incubados por 20 minutos a 4°C no escuro. Depois da incubação, os tubos foram centrifugados novamente e as células marcadas foram fixadas com 200 μ L de paraformaldeído a 1% para a posterior leitura. A aquisição foi feita em citômetro (FACSCanto II: Becton & Dickinson) e a análise no programa FlowJo v10, (Becton Dickinson).

Molécula	Clone	Isotipo	Fluorocromo/ Marca
CD11c	B-Ly6	IgG1, k	FITC / Bd Biocienses
HLA-DR	G46-6/L243	IgG2,k/ IgG2,k	APCH7 / Bd Biocienses
CD80	L307.4	IgG1,k	PE / Bd Biocienses
CD83	BHB15e	IgG1,k	PeCy5 / Bd Biocienses
CD86	2331 (FUN-1)	IgG1,k	APC / Bd Biocienses

3.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por Mo-DC tratadas ou não com TMZ

Por meio da conversão da molécula não fluorescente Dihidrorodamina 123 (DHR) em molécula fluorescente (rhodamine-123) analisamos a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). A DHR penetra nas células e na presença de H₂O₂ é oxidada convertendo-se em rhodamine-123, composto químico excitável a um comprimento de onda de 488 nm, emissor de fluorescência a 515 nm e detectável por citometria de fluxo.

Para esta análise, as Mo-DCs foram obtidas de sangue periférico e cultivadas até o quinto dia da diferenciação celular, posteriormente receberam TNF- α (50 ng/ml) e/ou TMZ (40 μ M) e foram incubados em estufa saturada de água com 5% de CO₂, a 37°C por 4 horas, em seguida as células foram retiradas da placa com solução de PBS e 2mM de EDTA, lavadas e centrifugadas a 300g durante 10 minutos. Após a centrifugação, foram adicionados 100 μ l de PBS em todos os tubos e adicionada a solução de DHR (Sigma Aldrich catálogo D-1054), na concentração final de 250 mg/ml, e os anticorpos anti-CD11c e anti-HLA-DR para identificação das DCs (exceto os não marcados). Após a incubação de 20 minutos no escuro em temperatura a 4° C, as amostras foram ressuspensas em 500 μ l de PBS e centrifugadas a 300g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspendido em 300 μ l de PBS para a posterior análise por citometria de fluxo com o equipamento Pop Attune - Thermo Fisher. Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência (MFI).

3.6 Análise Estatística

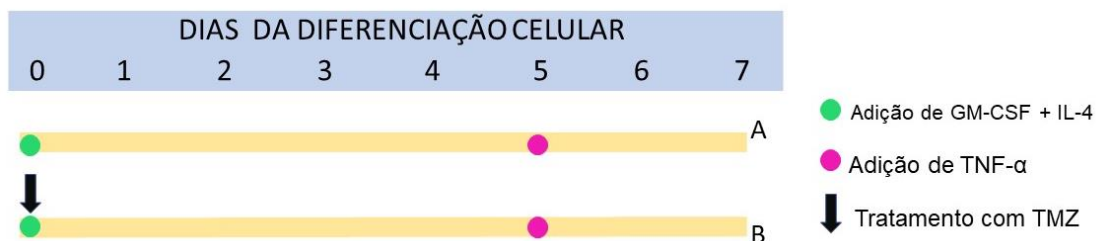
Todos os resultados foram testados para normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Testes paramétricos foram utilizados apenas quando as amostras passavam no teste de normalidade ($p > 0,05$, portanto a distribuição da amostra não era considerada estatisticamente diferente da distribuição normal. Para a análise estatística entre dois grupos foi utilizado o teste T e para análise de diferentes grupos foi utilizado o teste de variância ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o nível descritivo foi menor do que 5%, ou seja, o valor de p foi menor ou igual a 0,05 nos resultados analisados. A análise estatística e os gráficos apresentados foram gerados com auxílio do software GraphPad Prisma versão 7 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das Mo-DCs obtidas em cultura celular

As DC derivadas de monócitos do sangue apresentam expressão das moléculas CD11c e HLA-DR, e moléculas coestimuladoras, como CD80, CD86 apresentam sua expressão aumentada quando as DC passam do estado imaturo para maduro e, as células maduras, CD83. Portanto, nossa primeira abordagem foi averiguar a expressão dessas moléculas nas células originadas ao final da cultura de diferenciação de monócitos, em cada um dos grupos, experimentais e controles, conforme os esquemas abaixo. Observamos que não houve mudanças na morfologia da célula, os padrões de tamanho e granulosidade apresentaram característica típica.

Esquema de tratamento no dia 0 da diferenciação celular

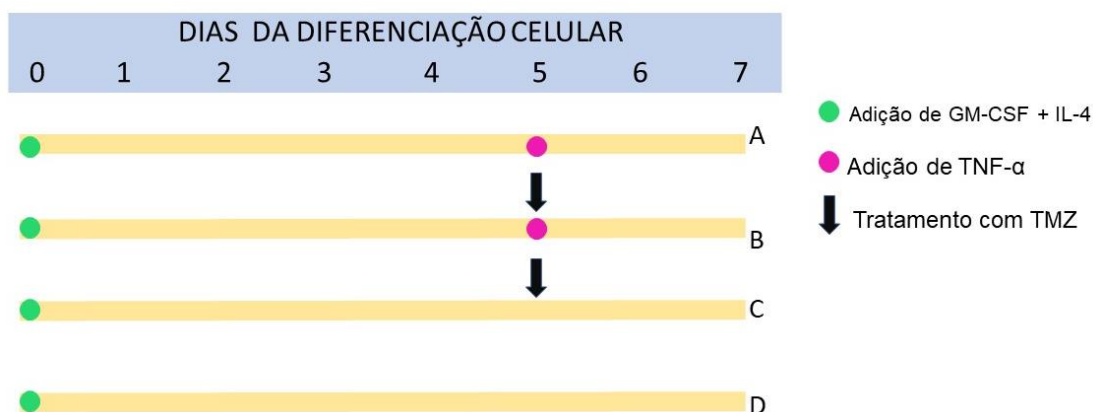


Tratamento com TMZ no dia 0 da diferenciação celular.

(A) Grupo controle negativo: estas células receberam apenas os estímulos de GM-CSF e IL-4 para a diferenciação dos monócitos em iDC, em seguida adicionou-se TNF- α no 5º dia para ativar o processo de maturação das iDC e a cultura seguiu até o 7º dia.

(B) Efeito da TMZ nos monócitos: no dia 0 os monócitos receberam GM-CSF e IL-4, simultaneamente foi adicionado TMZ, no 5º dia adicionou-se TNF- α para ativar o processo de maturação das iDC e a cultura seguiu até o 7º dia.

Esquema de tratamento no dia 5 da diferenciação celular



Tratamento com TMZ no dia 5 da diferenciação celular.

(A) Controle negativo 1: estas células receberam apenas os estímulos de GM-CSF e IL-4 para a diferenciação dos monócitos em iDC, em seguida adicionou-se TNF- α no 5º dia para ativar o processo de maturação das iDC e a cultura seguiu até o dia 7.

(B) Efeito da TMZ sobre a iDC: estas células receberam os estímulos de GM-CSF e IL-4 para a diferenciação dos monócitos em iDC, no dia 5 adicionou-se TNF- α para ativar o processo de maturação das iDC e TMZ simultaneamente, a cultura seguiu até o dia 7.

(C) Controle negativo 2: estas células receberam os estímulos de GM-CSF e IL-4 para a diferenciação dos monócitos em iDC, no dia 5 adicionou-se apenas TMZ e a cultura seguiu até o dia 7.

(D) Controle negativo 3: estas células receberam apenas os estímulos de GM-CSF e IL-4 para a diferenciação dos monócitos em iDC e a cultura celular seguiu até o dia 7.

4.2 Concentração de TMZ para tratamento das células

As concentrações de TMZ encontradas em pacientes com GBM já são conhecidas e descritas na literatura, variando de acordo com a dose administrada. Buscando utilizar concentrações semelhantes às encontradas, de acordo com a literatura, no plasma, tecido cerebral e gliomas em pacientes, experimentos iniciais foram realizados com as concentrações de 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M e 60 μ M. O fármaco foi acrescentado aos monócitos (dia 0) permanecendo por 7 dias em cultura, às Mo-DCs imaturas (dia 5) permanecendo por 2 dias em cultura e às Mo-DCs imaturas (dia 7) permanecendo por 1 dia em cultura.

Na concentração de 10 μ M, a TMZ não teve efeitos citotóxicos claros sobre as células, mas as doses 20 μ M, 40 μ M e 60 μ M que representam concentrações próximas ao descrito na literatura em pacientes, tiveram efeitos dose-dependentes (Figura 1). Dentre estas, a concentração de 40 μ M resultou

em viabilidade de aproximadamente 80% das DC quando foram tratadas no dia 0 (Figura 1. A), dia 5 (Figura 1. B) e dia 7 (Figura 1. C), se destacando por apresentar maior “estabilidade” na proporção de células vivas, independentemente do momento de administração.

Por ser esta dose semelhante à concentração encontrada em pacientes, e ter gerado os resultados mais reprodutíveis nos vários experimentos, ela foi escolhida para uso nos próximos ensaios.

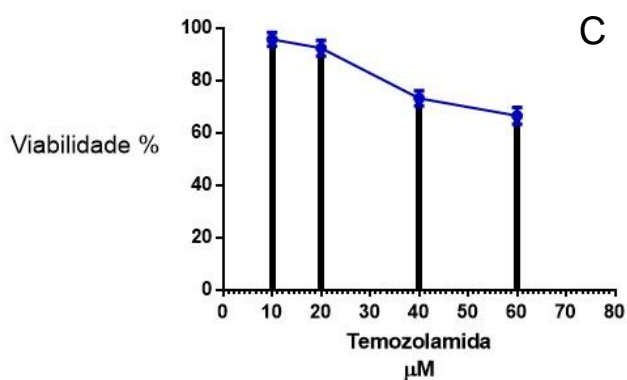
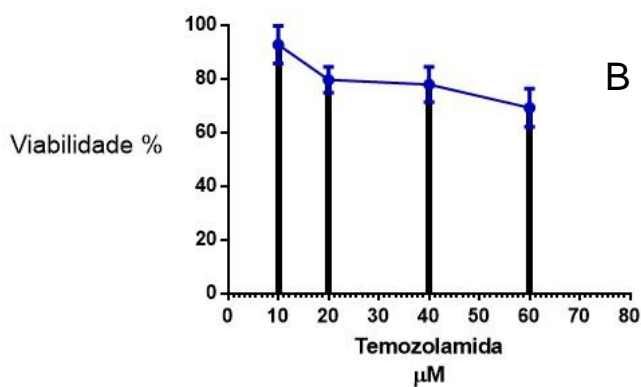
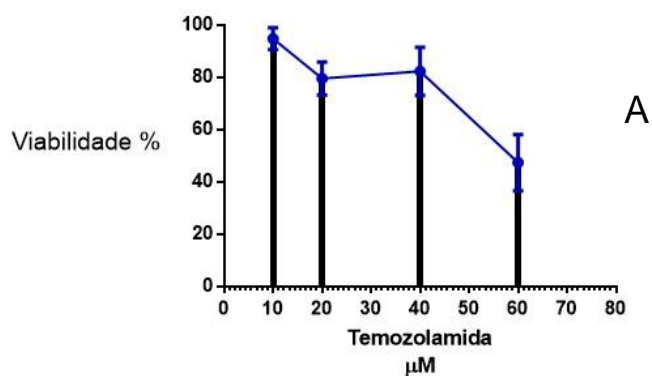


Figura 1: Capacidade de redução do MTT por células tratadas com diferentes doses de TMZ.

Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4 e no 5º dia da diferenciação celular foram submetidas ao estímulo de maturação com TNF- α e seguiram em cultura por 7 ou 8 dias. (A) A TMZ foi adicionada em diferentes concentrações (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M ou 60 μ M) sobre os monócitos no dia 0. A cultura celular foi mantida até o sétimo dia. (B) A TMZ foi adicionada em diferentes concentrações (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M ou 60 μ M) sobre as iDC no dia 5. A cultura celular foi mantida até o sétimo dia. (C) A TMZ foi adicionada em diferentes concentrações (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M ou 60 μ M) sobre as mDC no dia 7. A cultura celular foi mantida até o oitavo dia.

4.3 Toxicidade da TMZ sobre as Mo-DCs

Após determinação da concentração do fármaco, foi verificado se o tratamento modificaria o rendimento final da cultura, e a viabilidade dessas células foi avaliada também por citometria de fluxo a partir da marcação por corante Live/Dead. Esse corante penetra nas membranas celulares danificadas e reage com os grupos de amins no citoplasma e emitem fluorescência.

Os grupos de amins da superfície celular de células integras também reagem com esse corante, mas emitem menos fluorescência devido à quantidade de amins ali ser muito menor. Sendo assim, este ensaio permite a distinção de células vivas e mortas (Perfetto et al., 2006).

Pode-se observar que nos grupos experimentais com tratamento (Figura 2 e 3), não houve mudança da proporção de células vivas, ao contrário do que foi observado nos ensaios com MTT que apresentou aproximadamente 20% de células mortas, com o tratamento de 40 μ M de TMZ.

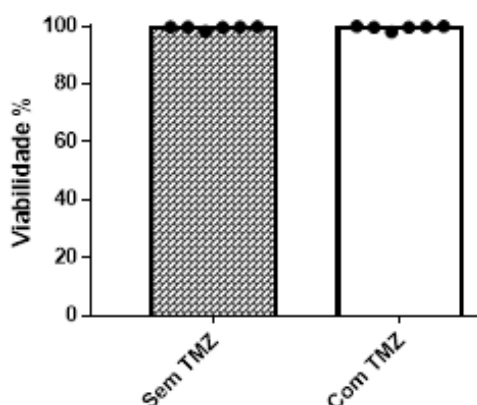


Figura 2: Efeito do tratamento com TMZ no dia 0 da diferenciação celular, sobre a viabilidade das células marcadas com LIVE/DEAD

Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4, e no 5º dia de cultura foram submetidas ao estímulo de maturação com TNF- α (conforme o esquema de tratamento no dia 0 da página 17) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7. Um grupo de células foi tratado com TMZ no dia 0 da cultura e outro grupo não recebeu o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador LIVE/DEAD por 20 min e analisada a viabilidade celular por citometria de fluxo. n=6 A análise da viabilidade foi avaliada por FlowJo e os dados obtidos analisados no software GraphPad Prism 7, empregando o teste t-Student. P>0,05.

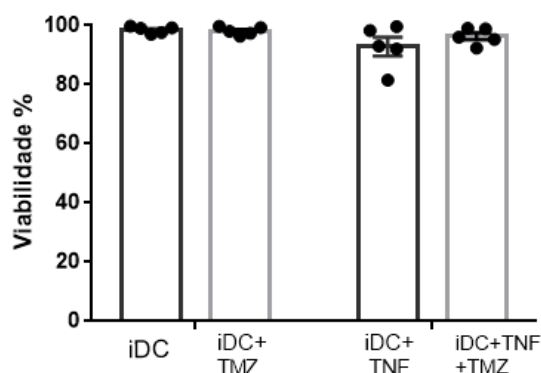


Figura 3: Efeito do tratamento com TMZ no dia 5 da diferenciação celular, sobre a viabilidade das células marcadas com LIVE/DEAD

Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4, no 5º dia de cultura alguns grupos foram submetidos ao estímulo de maturação com TNF- α e outros grupos não receberam o estímulo (conforme o esquema de tratamento no dia 5 na página 18) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7. Dois grupos de células foram tratados com TMZ no dia 5 da cultura e os outros grupos não receberam o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador LIVE/DEAD por 20 min e analisada a viabilidade celular por citometria de fluxo. n=5. A análise da viabilidade foi avaliada por FlowJo e os dados obtidos analisados no software GraphPad Prism 7, empregando o teste t-Student. P>0,05.

4.4 Efeito da TMZ sobre a expressão de moléculas coestimuladoras por Mo-DCs.

A população de Mo-DCs a ser estudada foi caracterizada a partir da realização de gates, a população foi selecionada com tamanho e granulosidade referente a tais células e, em seguida, foram excluídos os doublets e selecionadas as células que não foram marcadas com o reagente Live/Dead, ou seja, as células viáveis, em seguida, foram selecionadas as células duplo positivas para as moléculas CD11c e HLA-DR e, dentro desta população foram analisadas as células positivas para as moléculas CD80, CD86 e CD83 (Figura 4). Investigamos em seguida se a TMZ afeta a diferenciação das Mo-DCs

(acréscimo da TMZ no início da cultura – dia 0) e o processo de maturação (acréscimo no dia 5). A ativação ou maturação de DC pode ser caracterizada, entre outros fatores, pelo aumento da expressão de CD80, CD86 e CD83. Diante disso, o objetivo foi avaliar a expressão dessas moléculas na população de células em cultura, caracterizadas como células CD11c+ HLA-DR+.

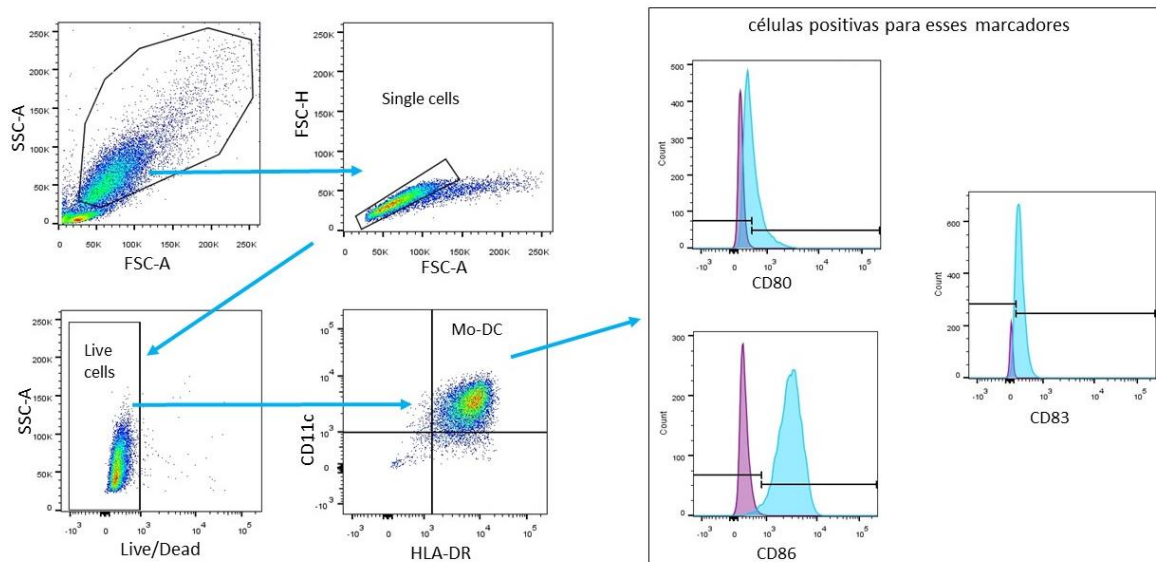


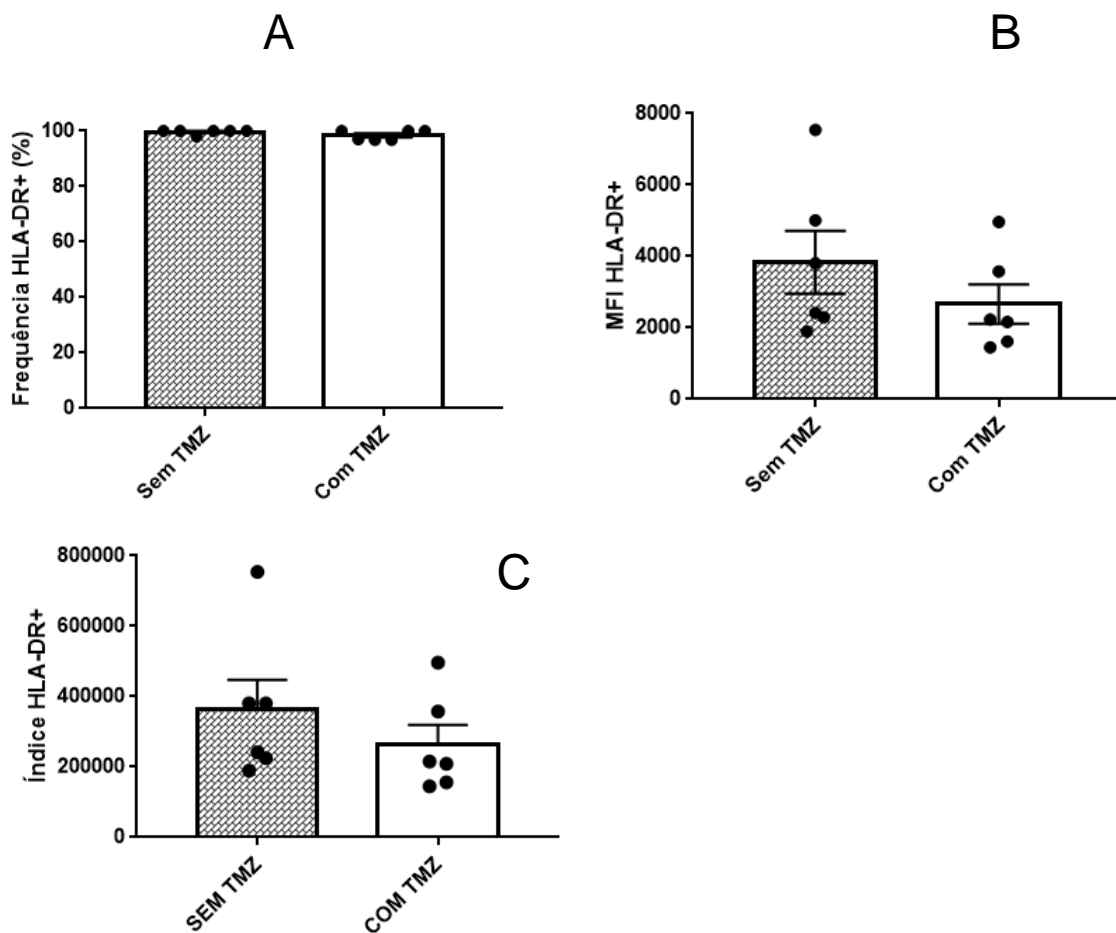
Figura 4: Estratégia de análise das células por citometria de fluxo.

Dot-plots de tamanho por granulosidade (SSC x FSC) indicando o gate para a seleção de monócitos, altura por tamanho de área (FSC-H x FSC-A) indicando single cells, o marcador de viabilidade (SSC-A x Live/Dead) indicando o gate para células vivas, CD11c por HLA-DR indicando gate de células duplo positivas para esses marcadores, histogramas de CD80+ / CD86+ / CD83+ representando as populações de células negativas (roxo) e positivas (azul) para esses marcadores.

- Efeito sobre a expressão de HLA-DR

No sangue humano periférico as células CD11c+, de maneira geral, são classificadas como de origem mielóide (Grouard et al., 1997) e a molécula de classe II, HLA-DR, codificada pelo MHC, está relacionada a apresentação de peptídeos exógenos por APC aos linfócitos TCD4+. A detecção dessas duas moléculas em nossos ensaios e as características morfológicas típicas das DC, confirmam que a diferenciação do monócito com GM-CSF e IL-4 produziu uma Mo-DCs, uma vez que as DC apresentam constitutivamente estes dois marcadores (Banchereau et al., 2000).

Observamos que o tratamento no dia 0 da diferenciação celular, aparentemente, a TMZ não alterou a frequência de células HLA-DR+ (Figura 4. A), porém reduziu a intensidade de expressão nas células, como avaliado pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI) (Figura 4. B). Para integrar estas duas medidas, utilizou-se um “índice” de expressão em que a frequência de células positivas é multiplicada pela mediana da Intensidade de expressão. O gráfico deste índice sugere que, de fato, o tratamento com TMZ desde o início da cultura, pode diminuir a expressão de HLA-DR pelas células (Figura 4. C). Já quando o tratamento foi realizado no dia 05 da diferenciação celular, não ocorreu nenhuma mudança perceptível na expressão de HLA-DR pelas células – nem em frequência, nem em intensidade de marcação (Figura 4. D-F). É necessário notar que as mudanças descritas são apenas sugeridas pelos dados, uma vez que a análise estatística não as detectou como significantes



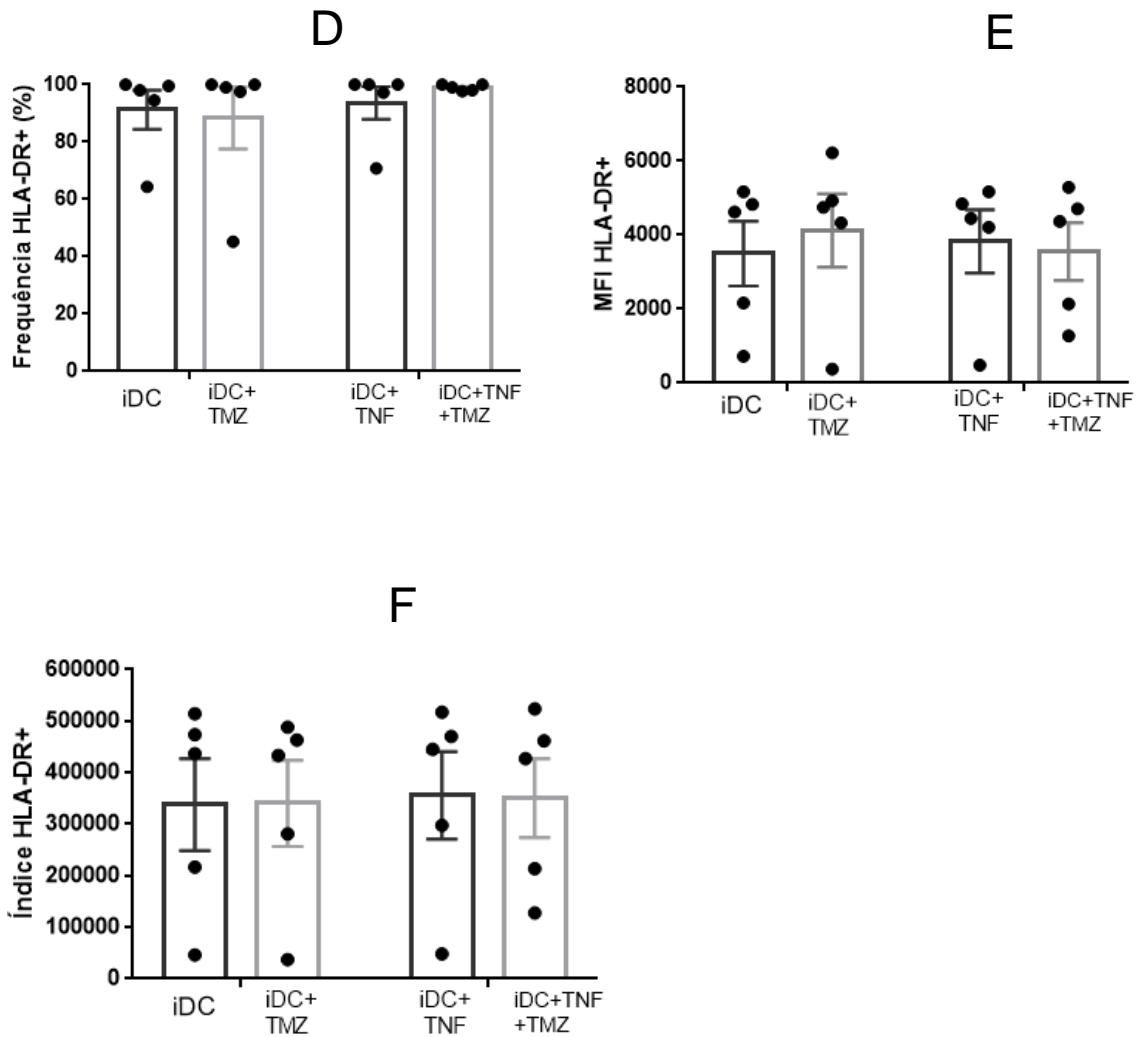


Figura 4: Expressão de HLA-DR na superfície de Mo-DCs.

A, B e C: Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4 e no 5º dia de cultura foram submetidas ao estímulo de maturação com TNF- α (conforme o esquema de tratamento no dia 0 na página 17) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7.

Um grupo de células foi tratado com TMZ no dia 0 da cultura celular e o outro grupo não recebeu o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador anti-HLA-DR por 20 min, em seguida lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. n=6. Análise estatística: Test T-Student pareado

- A- Frequência de células positivas para HLA-DR.
- B- Mediana da intensidade de fluorescência de células positivas para HLA-DR.
- C- Índice de expressão para HLA-DR

D, E e F: Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4, no 5º dia de cultura alguns grupos foram submetidos ao estímulo de maturação com TNF-

α e outros grupos não receberam o estímulo (conforme o esquema de tratamento no dia 5 na página 18) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7.

Dois grupos de células foram tratados com TMZ no dia 5 da cultura celular e os outros não receberam o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador anti-HLA-DR por 20 min, em seguida lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. n=5. Análise estatística: one-way ANOVA

D-Frequência de células positivas para HLA-DR.

E-Mediana da intensidade de fluorescência de células positivas para HLA-DR.

F- Índice de expressão HLA-DR

- Efeito sobre a expressão de CD80

Observamos que o tratamento no dia 0 da diferenciação celular, aparentemente, a TMZ não alterou a frequência de células CD80+ (Figura 5. A), porém induziu um leve aumento na intensidade de expressão nas células, como avaliado pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI) (Figura 5. B). Para integrar estas duas medidas, utilizou-se um “índice” de expressão em que a frequência de células positivas é multiplicada pela mediana da Intensidade de expressão.

Índice de expressão = (Frequência de células positivas) x (Mediana da Intensidade de expressão)

O gráfico deste índice sugere que, de fato, o tratamento com TMZ desde o início da cultura, não apresentou grandes alterações na expressão de CD80 pelas células (Figura 5. C). Já quando o tratamento foi realizado no dia 05 da diferenciação celular, a TMZ foi capaz de estimular a maturação das iDC, pois os grupos que receberam o fármaco “iDC+TMZ” e “iDC+TNF+TMZ” apresentaram valores maiores de frequência de células positivas, MFI e índice de expressão (Figura 5. D, E e F), quando comparado aos grupos que não receberam TMZ (iDC e iDC+TNF). Desta maneira, parece que o quimioterápico possui um efeito maturador maior que o TNF- α , quando se trata da molécula CD80, principalmente para o grupo que recebeu apenas o a TMZ (iDC+TMZ) em comparação com o grupo que recebeu tanto o fármaco quanto o TNF- α (iDC+TNF- α +TMZ).

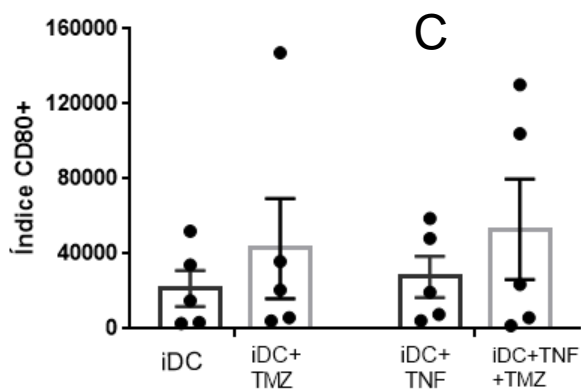
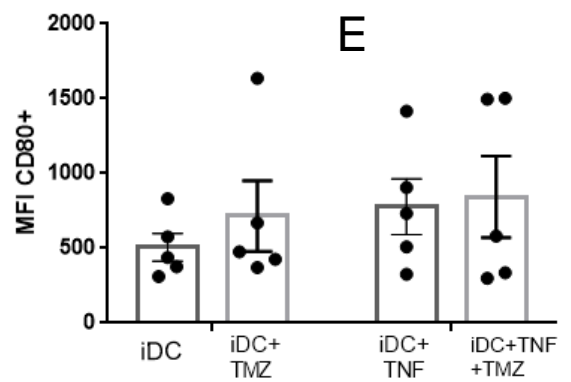
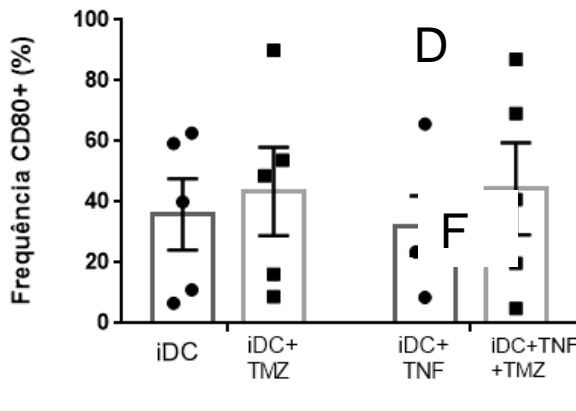
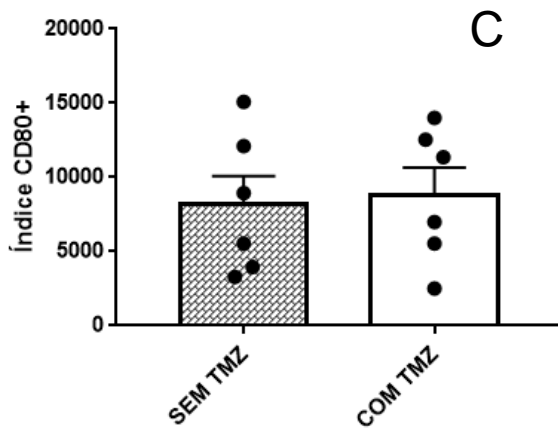
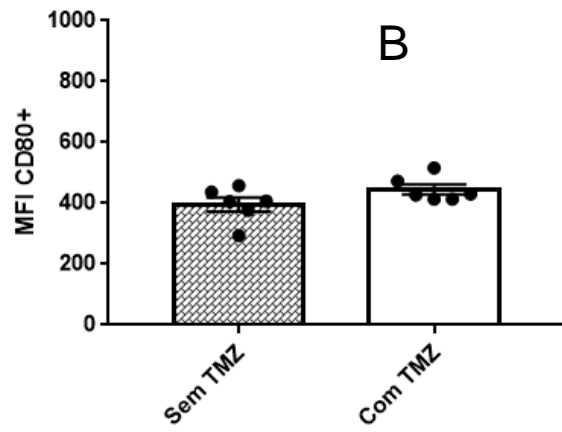
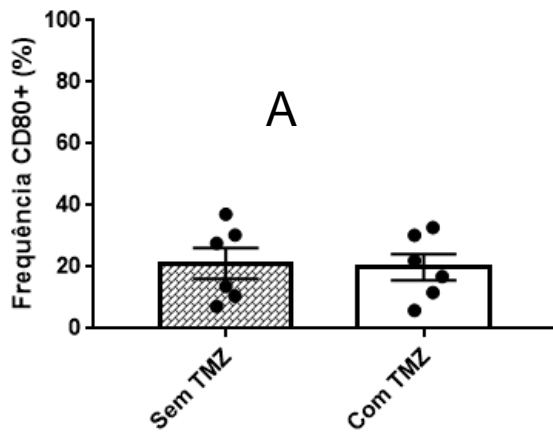


Figura 5: Expressão de CD80 na superfície de Mo-DCs.

A, B e C: Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4 e no 5º dia de cultura foram submetidas ao estímulo de maturação com TNF- α (conforme o esquema de tratamento no dia 0 na página 17) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7.

Um grupo de células foi tratado com TMZ no dia 0 da cultura celular e o outro grupo não recebeu o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador anti-CD80 por 20 min, em seguida lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. n=6. Análise estatística: Test T-Student pareado

A-Frequência de células positivas para CD80.

B-Mediana da intensidade de fluorescência de células positivas para CD80.

C - Índice de expressão para CD80.

D, E e F: Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4, no 5º dia de cultura alguns grupos foram submetidos ao estímulo de maturação com TNF- α e outros grupos não receberam o estímulo (conforme o esquema de tratamento no dia 5 na página 18) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7.

Dois grupos de células foram tratados com TMZ no dia 5 da cultura celular e os outros não receberam o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador anti-CD80 por 20 min, em seguida lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. n=5. Análise estatística: one-way ANOVA

D-Frequência de células positivas para CD80.

E-Mediana da intensidade de fluorescência de células positivas para CD80.

F- Índice de expressão para CD80.

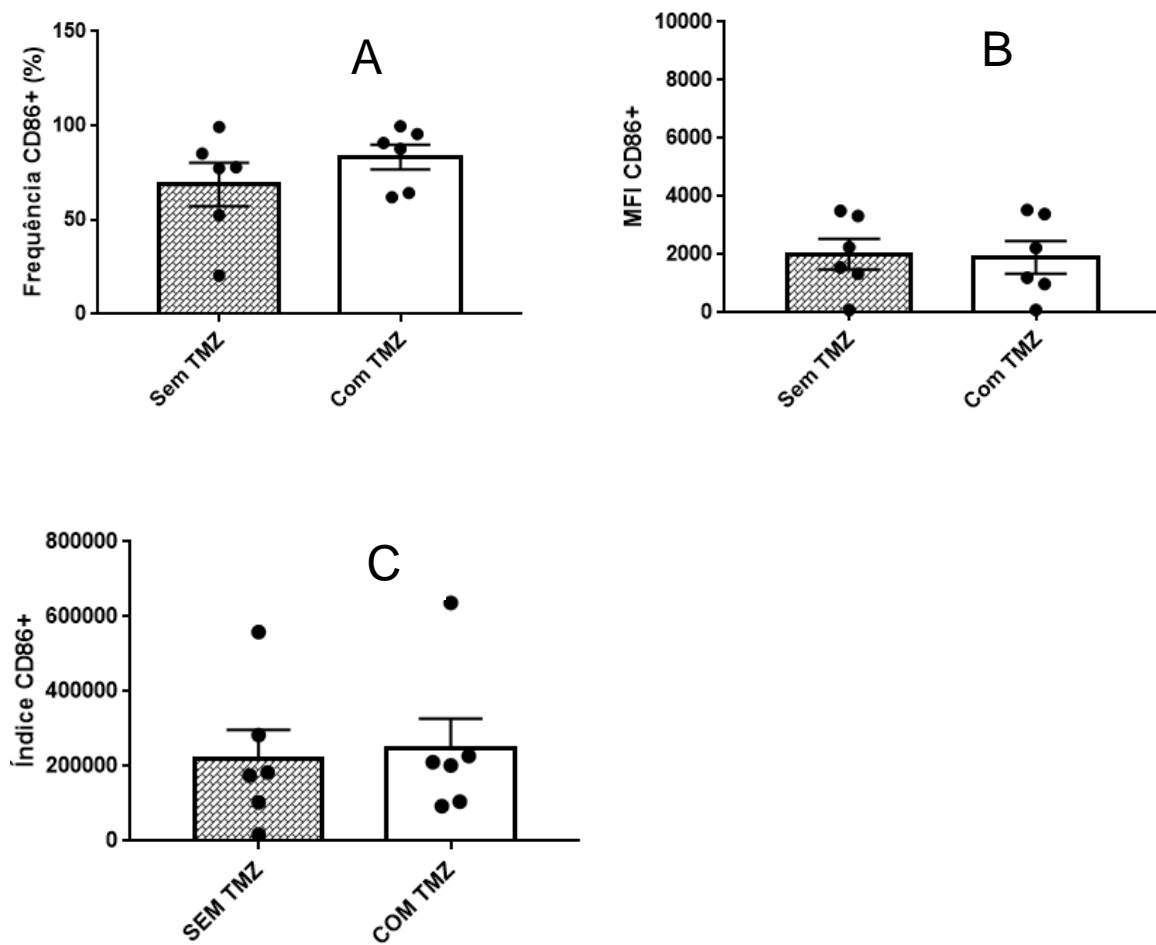
- Efeito sobre a expressão de CD86

A análise da expressão da molécula CD86 com o tratamento no dia 0 da diferenciação celular, mostra que a frequência e o índice de expressão das células positivas para esse marcador, foi um pouco maior no grupo que recebeu tratamento “com TMZ” em comparação com o grupo “sem TMZ” (Figura 6. A e C), porém o MFI da expressão de CD86 não apresentou alterações (Figura 6. B).

Por outro lado, o tratamento no dia 5, o grupo “iDC+TNF+TMZ” apresentou a frequência de células expressando CD86 um pouco maior em comparação com o controle “iDC+TNF” (Figura 6. D), e o grupo “iDC” apresentou uma taxa bem maior que o grupo “iDC+TMZ”. A MFI de CD86 mostrou praticamente igual entre os grupos “iDC+TNF” e “iDC+TNF+TMZ”, mas o grupo

“iDC+TMZ” apresentou maior expressão dessa molécula em comparação ao seu controle “iDC” (Figura 6. E), o índice de células positivas para CD86 também apresentou maior expressão no grupo iDC+TMZ comparando com seu controle “iDC” (Figura 6. F).

Assim sendo, a TMZ administrada sozinha, apresentou um maior potencial de maturação das DC, do que quando as células receberam TNF- α e TMZ associados em relação a CD86.



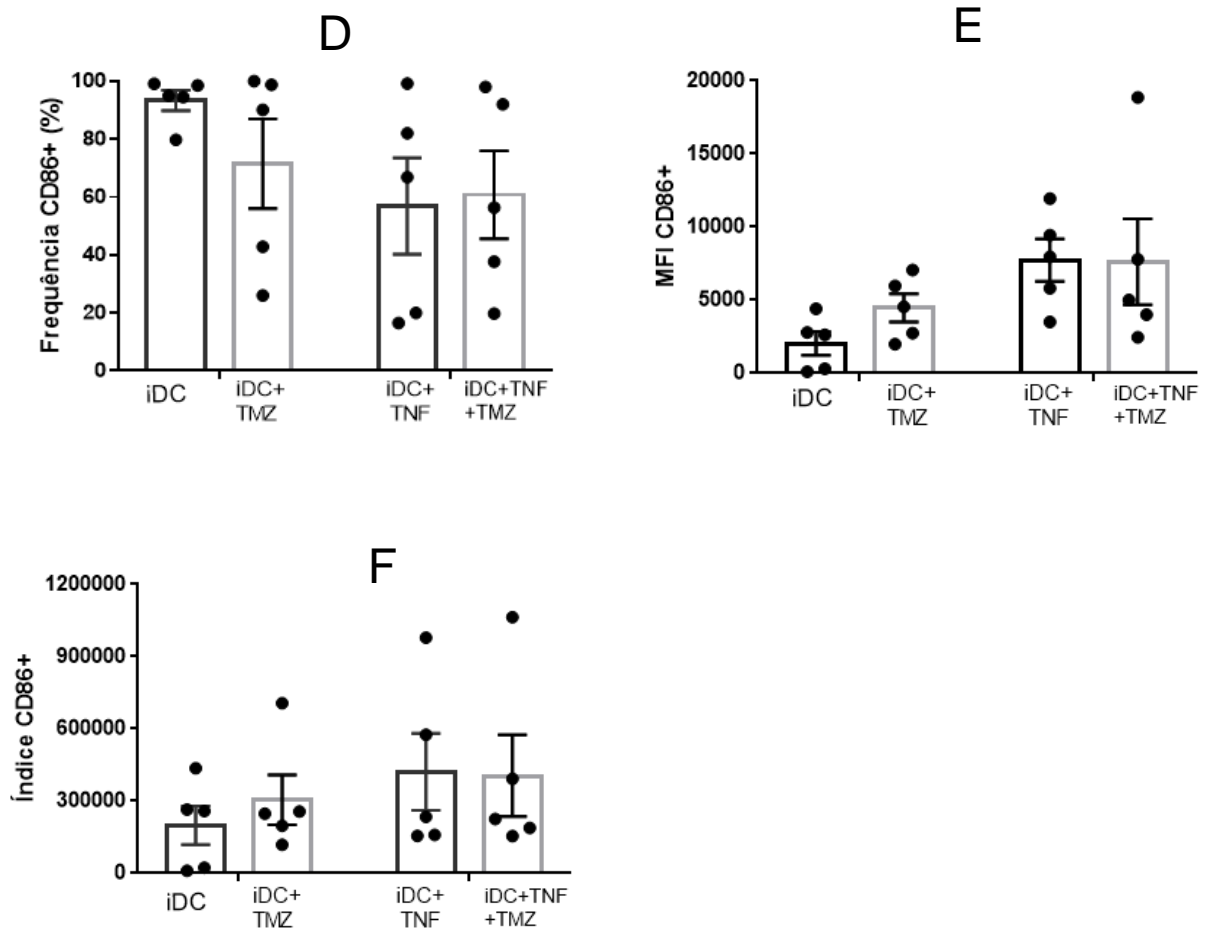


Figura 6: Expressão de CD86 na superfície de Mo-DCs

A, B e C: Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4 e no 5º dia de cultura foram submetidas ao estímulo de maturação com TNF- α (conforme o esquema de tratamento no dia 0 na página 17) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7.

Um grupo de células foi tratado com TMZ no dia 0 da cultura celular e o outro grupo não recebeu o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador anti-CD86 por 20 min, em seguida lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. n=6.

Análise estatística: Test T-Student pareado

A-Frequência de células positivas para CD86.

B-Mediana da intensidade de fluorescência de células positivas para CD86.

C- Índice de expressão para CD86.

D, E e F: Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4, no 5º dia de cultura alguns grupos foram submetidos ao estímulo de maturação com TNF- α e outros grupos não receberam o estímulo (conforme o esquema de tratamento no dia 5 na página 18) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7.

Dois grupos de células foram tratados com TMZ no dia 5 da cultura celular e os outros não receberam o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador anti-CD86 por 20 min, em seguida lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. n=5. Análise estatística: one-way ANOVA.

D-Frequência de células positivas para CD86.

E-Mediana da intensidade de fluorescência de células positivas para CD86.

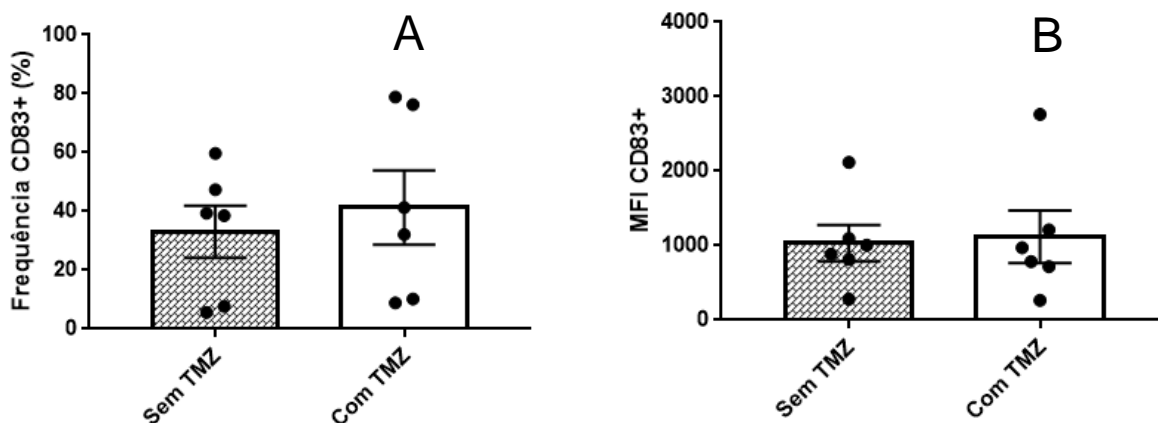
F- Índice de expressão para CD86.

-Efeito sobre a expressão de CD83

A molécula CD83 é um marcador bem caracterizado da transição fenotípica de DC imaturas para maduras. Sua presença na membrana está correlacionada com um estado de maior capacidade de ativação do sistema imune (Bates et al., 2015; Kruse et al., 2000).

Em nossos resultados, observamos que a molécula CD83 aumentou a frequência nas células positivas com o tratamento do dia 0 (Figura 7. A), no entanto, o gráfico da MFI não apresentou alteração com a TMZ entre os grupos “sem TMZ” e “com TMZ” (Figura 7. B), o índice de expressão para esse marcador também não teve grandes alterações (Figura 7. C).

Já com o tratamento no dia 5, as taxas de frequência foram muito parecidas entre os grupos, com apenas um leve aumento no grupo “iDC+TNF+TMZ” (Figura 7. D). A MFI mostrou-se maior entre o grupo “iDC+TMZ” comparando com o grupo “iDC” e com um leve aumento nas células que receberam só TNF em comparação ao grupo que recebeu TNF e TMZ (Figura 7. E). O índice de expressão apresentou taxas maiores nos grupos que receberam TMZ em comparação com os grupos que não receberam o fármaco (Figura 7. F) Sendo assim, para esta molécula parece que a TMZ também parece influenciar na maturação celular, melhorando esta condição.



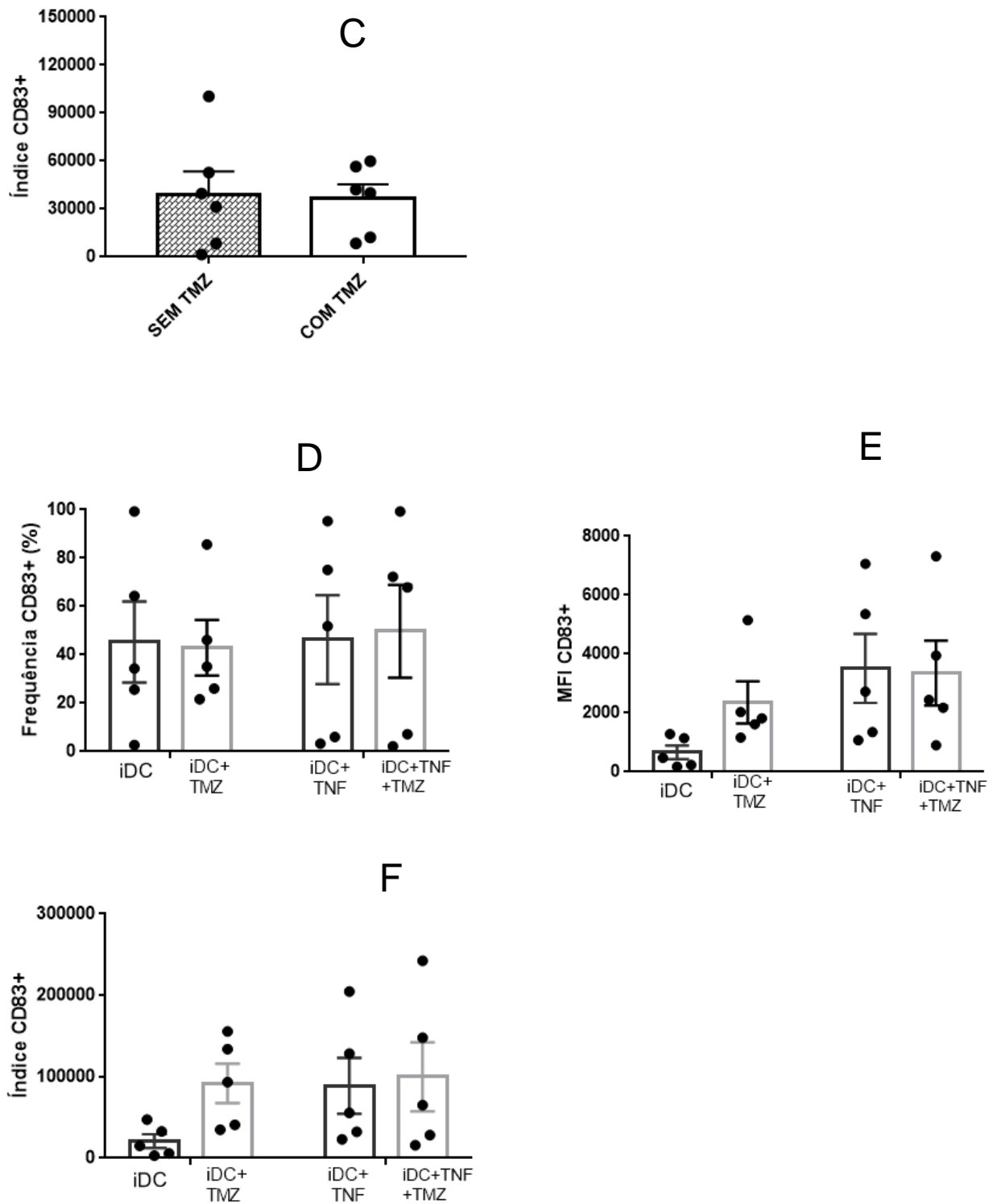


Figura 7: Análise da expressão de CD83 na superfície de Mo-DCs.

A, B e C: Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4 e no 5º dia de cultura foram submetidas ao estímulo de maturação com TNF- α (conforme o esquema de tratamento no dia 0 na página 17) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7.

Um grupo de células foi tratado com TMZ no dia 0 da cultura celular e o outro grupo não recebeu o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador anti-CD83 por 20 min, em seguida lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. n=6, Análise estatística: Test T-Student pareado

A-Frequência de células positivas para CD83.

B-Mediana da intensidade de fluorescência de células positivas para CD83.

D- Índice expressão para CD83

D, E e F: Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4, no 5º dia de cultura alguns grupos foram submetidos ao estímulo de maturação com TNF- α e outros grupos não receberam o estímulo (conforme o esquema de tratamento no dia 5 na página 18) e a cultura seguiu normalmente até o dia 7.

Dois grupos de células foram tratados com TMZ no dia 5 da cultura celular e os outros não receberam o fármaco. Ao final da diferenciação celular (dia 7), todas as células foram incubadas com o marcador anti-CD83 por 20 min, em seguida lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. n=5. Análise estatística: one-way ANOVA

D-Frequência de células positivas para CD83.

E-Mediana da intensidade de fluorescência de células positivas para CD83.

F- Índice de expressão para CD83

4.5 Efeito da TMZ sobre a produção de EROS pelas Mo-DCs

Alguns trabalhos têm demonstrado que as ROS estão envolvidas com a sinalização ativadora de DC para um perfil pró-inflamatório (Eton & Lepore, 2008; Mittal et al., 2014; Tahara et al., 2018). Dessa forma, levantou-se a hipótese de que um dos mecanismos que poderiam influenciar as modificações no fenótipo e função das DC, teriam relação com a atividade reparadora dos danos no DNA causados por EROS, que produzidos em excesso durante o tratamento de quimioterapia e radioterapia (Van Loenhout et al., 2020).

Os resultados dessas análises mostram que a MFI das células que receberam somente TMZ, apresentou maior taxa de produção de EROS em comparação com todos os grupos. (Figura 9).

Relacionando esse resultado com o fenótipo celular, este mesmo grupo "iDC+TMZ" em todos os marcadores, apresentou taxas maiores da MFI quando comparado ao controle "iDC" (Figura 4. E, 5.E, 6.E, 7.E). Contudo parece que

possa ter uma relação entre as mudanças do fenótipo das DC e os danos oxidativos.

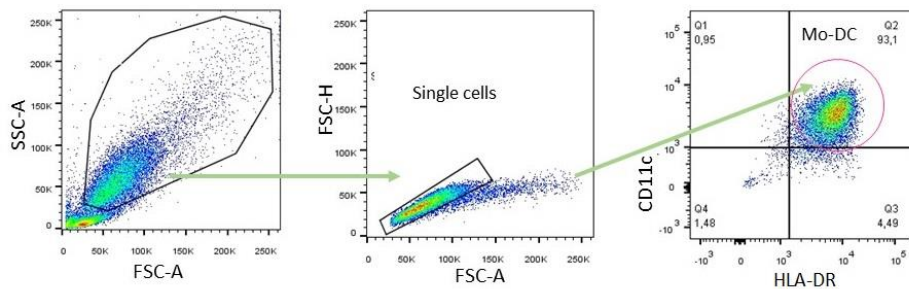


Figura 8: Estratégia de análise de DHR por citometria de fluxo.

Dot-plots de tamanho por granulosidade (SSC-A x FSC-A) indicando o gate para a seleção de monócitos, altura por tamanho de área (FSC-H x FSC-A) indicando single cells, CD11c por HLA-DR indicando gate de células duplo positivas para esses marcadores. A partir das células duplo positivas foi avaliado o MFI para a fluorescência de DHR.

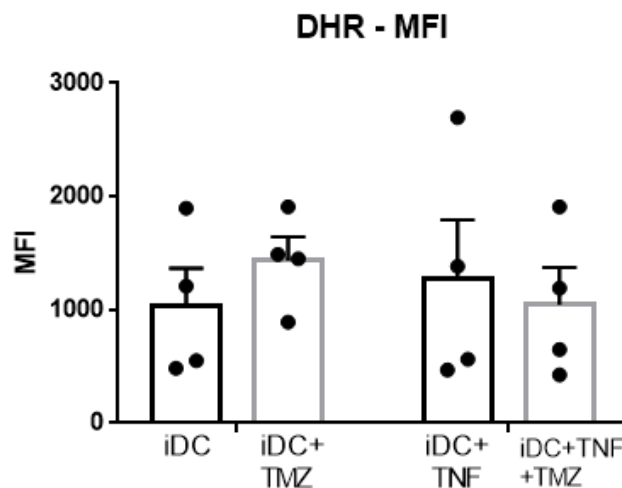


Figura 9: Análise da produção de EROS

Células mononucleares foram cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4, no 5º dia de cultura, alguns grupos foram submetidos ao estímulo de maturação com TNF- α e outros grupos não receberam o estímulo, dois grupos de células foram tratados com TMZ e os outros não receberam o fármaco (conforme o esquema de tratamento no dia 5 na página 18). As células ficaram em incubação por 4 horas em estufa, depois foram retiradas e marcadas com anti-CD11c, anti-HLA-DR e DHR por 20 min e analisadas por citometria de fluxo. n=4. Análise estatística: one-way ANOVA.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos os efeitos da quimioterapia com TMZ sobre as Mo-DCs *in vitro* em dois momentos da diferenciação celular. Os resultados obtidos não permitem conclusões seguras sobre um possível efeito ativador da TMZ sobre as células, uma vez que não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas no fenótipo das mesmas. Todavia, é possível concluir que, no mínimo, a TMZ não afeta o fenótipo das Mo-DCs de maneira a diminuir sua capacidade de apresentação. Na verdade, mesmo não atingindo significância estatística, o conjunto dos resultados sugere que um efeito ativador da TMZ sobre as Mo-DCs imaturas pode ocorrer, uma vez que a análise de vários marcadores de ativação mostra, consistentemente, aumentos marginais, coerentes com tal.

Primeiramente, fizemos ensaios para descobrir as taxas de toxicidade da TMZ sobre as Mo-DCs *in vitro*, partindo de concentrações do fármaco encontradas no plasma, tecido cerebral, tumor cerebral de pacientes e doses sub-letais de TMZ em células tronco tumorais de GBM utilizadas *in vitro*, fim de mimetizar as condições clínicas dos pacientes de GBM. (Beier et al., 2012; Brada et al., 1999; Joel et al., 1997; Rosso et al., 2009; Strik et al., 2012)

Notamos que a toxicidade do fármaco foi dependente da concentração em todos os momentos de tratamento, além disso, a estabilidade na viabilidade com a dose de 40 μM nos três períodos do tratamento nos chamou a atenção para a escolha, além de ser um valor muito próximo as dosagens encontradas nos pacientes e então foi iniciado as avaliações do fenótipo.

Quando analisamos o efeito da TMZ adicionada sobre os monócitos, logo no início da cultura em que estes foram induzidos a se diferenciar, não conseguimos encontrar alterações fenotípicas significativas, nem sequer apontando numa mesma direção. Assim a expressão de HLA-DR mostrou-se inalterada em termos de frequência, mas diminuída em sua MFI e índice de expressão. Já as moléculas CD80, CD86 e CD83 não mostraram grandes alterações no fenótipo das DC tratadas com TMZ. Tais resultados podem ter alguma relação com a ineficiência do monócito em reparar lesões de alquilações

devido a regulação negativa da sua atividade de reparo do DNA , isto parece ser uma peculiaridade geral desse tipo de célula, ao contrário das DC e macrófagos (Berte et al., 2021).

A investigação do efeito da TMZ sobre as iDCs quando adicionada no dia 5 da cultura celular, apresentou mudança fenotípicas que foram mais intrigantes em comparação com o tratamento no dia 0, em especial as análises das moléculas CD80, CD86 e CD83. Os resultados apontaram características de maturação das Mo-DCs com o tratamento, mas padrões de comportamentos diferentes das moléculas. Quando observamos o marcador CD80, é possível notar que a TMZ adicionada de forma isolada ou em conjunto com TNF- α , aumentou as taxas do marcador nessas células. Por outro lado, a frequência de CD86 e CD83 não apresentou grandes mudanças entre os grupos, apenas um leve aumento nas células que receberam o fármaco isolado ou com em conjunto TNF- α .

Quando olhamos para o MFI de todas as moléculas, exceto HLA-DR, podemos observar aumento no grupo "iDC+TMZ" quando comparado com o controle "iDC", mas quando analisamos o índice de fluorescência, fica mais claro a influência do fármaco como um agente que parece induzir a maturação das Mo-DCs, principalmente nos grupos que receberam TMZ (iDC + TMZ e iDC+TNF+TMZ) em comparação aos que não receberam (iDC e iDC+TNF), mesmo não sendo estatisticamente significantes, esses dados parecem mostrar uma possível interação do fármaco com a atividade da célula.

As moléculas CD80 e CD86 apresentaram diferentes padrões de expressão após os tratamentos. Curiosamente elas são conhecidas por apresentarem padrões semelhantes e serem funcionalmente equivalentes na iniciação e manutenção da ativação de células T (Bhatia et al., 2006; Bhatt et al., 2013),

Uma hipótese para explicar esse aspecto, pode ser os papéis distintos de CD80 e CD86 na regulação ou estimulação da resposta. De acordo com alguns relatos na literatura, as duas moléculas participam tanto da co-estimulação, quanto da co-inibição da atividade dos linfócitos T (Collins et al., 2002; Sansom

et al., 2003), por exemplo, o CD80 é o ligante mais potente para CTLA-4, baseado não apenas em sua maior afinidade, mas também pela avidéz, e o CD86 tem uma afinidade mais fraca por CD28 que CD80, porém ele se liga de maneira mais eficaz ao CD28 e colabora com uma maior ativação das células T (Sansom et al., 2003).

Sendo assim, pode-se mencionar que CD80 e CD86, participam de diferentes formas na sinapse imunológica, e não necessariamente vão apresentar as mesmas características de expressão nas células. Essas informações podem explicar nossos achados, pois mesmo sendo moléculas coestimuladoras da resposta imune, elas indiretamente possuem atuações diferentes e poderão apresentar níveis de expressão, não necessariamente, correlacionados.

Além disso, a molécula CD83 também foi avaliada, ela é um marcador bem característico da transição fenotípica de DC imaturas para maduras. A presença de CD83 na membrana das DC está correlacionada com um aumento da estimulação das células T (Kruse et al., 2000; Prechtel et al., 2007). Mesmo assim a correlação exata da modulação da proliferação de células T por CD83 ainda permanece indeterminada nos dados científicos.

Então podemos sugerir mais uma vez, que a TMZ parece potencializar a ativação das DC, e levando em consideração que as DC de pacientes com GBM tem pouca capacidade ativar dos linfócitos T *in vitro* (Ogden et al., 2006; Pinzon-Charry et al., 2005), este fármaco parece ser positivo tanto para a resposta imune durante a administração de TMZ isolada, como também poderá ser para a imunoterapia com vacinação de DCs, que necessariamente precisa de uma boa interação entre DC e linfócitos T para obter sucesso clínico.

Embora não podemos dizer que esse conjunto de alterações fenotípicas apresentou diferença estatística, aparente concordância entre os vários marcadores nos levou a considerar possíveis mecanismos que pudessem ser desencadeados pela TMZ e que pudessem afetar o fenótipo de Mo-DCs imaturas, as células onde tais alterações se mostraram mais aparentes.

Sabe-se que durante a diferenciação celular das DCs, ocorre um aumento na expressão de genes no DNA associados com atividade da via BER (Briegert

& Kaina, 2007), que atua em diversos tipos de lesões causadas por agentes alquilantes, processos oxidativos ou radiações ionizantes (Kim & M. Wilson III, 2011; Wallace, 2014).

Uma das ideias especuladas para entender as possíveis mudanças nas células tratadas com TMZ, foi baseada nas características inflamatórias desencadeadas pela via de reparo BER (Stratigopoulou et al., 2020), Contudo, 90% das alquilações no DNA geradas pela TMZ (Atkins et al., 2015) e os danos oxidativos produzidos pela quimioterapia são reparadas por esta via (Valtorta et al., 2017; W. Bin Zhang et al., 2010). A reparação começa com o reconhecimento e remoção das bases danificadas, realizada por DNA glicosilases que marcam o início desse mecanismo, uma dessas glicosilases é a 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1) (David et al., 2007), uma peça fundamental para o sistema de correção de danos causados por EROS (Kreuzer et al., 2014).

A presença de EROS intracelular gera a lesão oxidativa mais abundante de base mutagênica chama-se 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) que é reconhecida pela glicosilase OGG1 e forma-se o complexo OGG1-8-oxoG com a finalidade de retirar a base oxidada e prevenir mutações no material genético (Damsma & Cramer, 2009).

O complexo OGG1-8-oxoG ativa a família de pequenas proteínas sinalizadoras no DNA como as GTPases (Ba et al., 2014), que atuam como interruptores de sinalizações moleculares e estão envolvidas na regulação das funções das DCs, incluindo a diferenciação celular (Burns et al., 2001; Giammarioli et al., 2006), endocitose (Shurin et al., 2005), maturação (Pérez-Montesinos et al., 2017; Singh et al., 2012), quimiotaxia, apresentação de antígeno (Shurin et al., 2005), apresentação cruzada (Savina et al., 2009; Seong et al., 2008; Zou et al., 2009), iniciação de células T (Benvenuti et al., 2004) e autofagia (Yan et al., 2016).

Tendo as informações sobre o mecanismo de reparação dos danos por EROS e a relação com as modificações funcionais e fenotípicas nas DC, achamos interessante realizar um ensaio para quantificar a produção de EROS nas células e correlacionar com nossos achados do fenótipo célula e com isso escolhemos utilizar a técnica de avaliação semiquantitativa da produção de

EROS por meio da molécula DHR, uma sonda indicadora de oxidação (Yazdani, 2015).

Nossos resultados sobre a análise da produção de moléculas de oxidação, mostraram mais uma vez, aumento da MFI no grupo que recebeu TMZ isolada em comparação com o grupo controle “iDC” e nota-se um comportamento parecido entre esses dois grupos quando se observa os dados do fenótipo de membrana. Assim, com nossos dados, a hipótese e as informações da literatura, correlacionaram e deram um possível sentido para as alterações nas Mo-DCs vistas neste estudo.

De acordo com a literatura científica, trabalhos têm demonstrado a relação das moléculas da via BER com a resposta inflamatória e patologias, por exemplo, Pázmándi e seus colaboradores, mostraram que redução da glicosilase OGG1, reduz a ativação das DCs, sugerindo que a presença e atividade funcional de OGG1 é essencial para o processo de ativação dessas células (Pázmándi et al., 2019). De outro lado, também já foi visto que a ativação de OGG1 exacerba a inflamação alérgica causada por antígenos (Bacsi et al., 2013), enquanto os polimorfismos do gene OGG1 foram associados à progressão da artrite reumatoide (Chen et al., 2012), câncer (Sanjari Moghaddam et al., 2016) e doença de Alzheimer (Kowalska et al., 2020)

Alem disso, outro trabalho mostrou que Mo-DCs humanas, tratadas com 8-oxo livre apresentou características de ativação, através do aumento de moléculas coestimuladoras e maior produção de citocinas (IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF- α) e quimosinas (Ccl3, Ccl20, Cxcl1, Cxcl2) pró-inflamatórias (He et al., 2010).

De modo geral, a atividade das moléculas de reparação do DNA além de manter a integridade do material genético para evitar mutações, o reparo contínuo dos danos também causa mudanças funcionais nas células que as induzem para um perfil pró-inflamatório,

Assim, podemos supor que as mudanças ocorridas no fenótipo das Mo-DCs neste trabalho, possam estar relacionadas com as sinalizações geradas pela atividade das proteínas de BER, que corrigem tanto danos das alquilações quanto os danos causados por EROS pelo uso do fármaco. Os resultados

obtidos ainda não podem confirmar nossa hipótese, mas nos instigaram a realizar mais estudos da produção de EROS em diferentes condições de tratamento nas Mo-DCs em nossos projetos futuros do laboratório, a fim de investigar mais informações que eventualmente possam contribuir para associação da imunoterapia com vacinação de DCs a TMZ e um melhor benefício clínico do paciente.

7.CONCLUSÃO

- As Mo-DCs tratadas com TMZ apresentaram características normais de morfologia, sem atipia detectada.
- O tratamento com TMZ nos monócitos não apresentaram grandes mudanças no fenótipo das Mo-DCs.
- O tratamento com TMZ isolada sobre as iDCs parece induzir um efeito maturador semelhante ou as vezes maior que o TNF- α nas células.
- As alterações fenotípicas observadas nas Mo-DCs parecem estar relacionadas com a sinalizações decorrentes da reparação de danos oxidativos e alquilantes pela via BER.
- A TMZ parece ter um efeito positivo para a ativação das Mo-DCs

REFERÊNCIAS

- Al-Badr, A. A., & Alodhaib, M. M. (2016). Dacarbazine. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 41, 323–377. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.12.002>
- Agarwala, S. S., & Kirkwood, J. M. (2000). Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma. *The Oncologist*, 5(2), 144–151. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-2-144>
- Atkins, R. J., Ng, W., Stylli, S. S., Hovens, C. M., & Kaye, A. H. (2015). Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment. *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.09.003>
- Bacsi, A., Aguilera-Aguirre, L., Szczesny, B., Radak, Z., Hazra, T. K., Sur, S., Ba, X., & Boldogh, I. (2013). Down-regulation of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 expression in the airway epithelium ameliorates allergic lung inflammation. *DNA Repair*, 12(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.10.002>
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000). *Mmunobiology of. Figure 1*, 767–811.
- Barbuto, J. A. M., Ensina, L. F. C., Neves, A. R., Bergami-Santos, P. C., Leite, K. R. M., Marques, R., Costa, F., Martins, S. C., Camara-Lopes, L. H., & Buzaid, A. C. (2004). Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(12), 1111–1118. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0551-7>
- Bates, J. M., Flanagan, K., Mo, L., Ota, N., Ding, J., Ho, S., Liu, S., Roose-Girma, M., Warming, S., & Diehl, L. (2015). Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis. *Mucosal Immunology*, 8(2), 414–428. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.79>
- Beier, D., Schriefer, B., Brawanski, K., Hau, P., Weis, J., Schulz, J. B., & Beier, C. P. (2012). Efficacy of clinically relevant temozolomide dosing schemes in glioblastoma cancer stem cell lines. *Journal of Neuro-Oncology*, 109(1), 45–52. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0878-4>
- Benvenuti F, Hugues S, Walmsley M, Ruf S, Fetler L, Popoff M, Tybulewicz VL,

- Amigorena S, Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming, *Science* 305(5687) (2004) 1150–3.
- Berte, N., Eich, M., Heylmann, D., Koks, C., Van Gool, S. W., & Kaina, B. (2021). Impaired DNA repair in mouse monocytes compared to macrophages and precursors. *DNA Repair*, 98(October 2020), 103037. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.103037>
- Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S. C., & Nathenson, S. G. (2006). B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunology Letters*, 104(1–2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.11.019>
- Bhatt, K., Kim, A., Kim, A., Mathur, S., & Salgame, P. (2013). Equivalent functions for B7.1 and B7.2 costimulation in mediating host resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Cellular Immunology*, 285(1–2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.09.004>
- Brada, M., Judson, I., Beale, P., Moore, S., Reidenberg, P., Statkevich, P., Dugan, M., Batra, V., & Cutler, D. (1999). Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *British Journal of Cancer*, 81(6), 1022–1030. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690802>
- Briegert, M., & Kaina, B. (2007). Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents. *Cancer Research*, 67(1), 26–31. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3712>
- Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L., & Jones, G. E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*, 98(4), 1142–1149. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.4.1142>
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T., Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A., & Gilbertson, R. J. (2007). *Article A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. January*, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.020>

- Campanelli, A. P., Roselino, A. M., Cavassani, K. A., Pereira, M. S. F., Mortara, R. A., Brodskyn, C. I., Gonçalves, H. S., Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A., & Silva, J. S. (2006). CD4 + CD25 + T Cells in Skin Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Exhibit Phenotypic and Functional Characteristics of Natural Regulatory T Cells . *The Journal of Infectious Diseases*, 193(9), 1313–1322. <https://doi.org/10.1086/502980>
- Campian, J. L., Piotrowski, A. F., Ye, X., Hakim, F. T., Rose, J., Yan, X. Y., Lu, Y., Gress, R., & Grossman, S. A. (2017). Serial changes in lymphocyte subsets in patients with newly diagnosed high grade astrocytomas treated with standard radiation and temozolomide. *Journal of Neuro-Oncology*, 135(2), 343–351. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2580-z>
- Clavijo-Salomon, M. A., Ramos, R. N., Crippa, A., Pizzo, C. R., Bergami-Santos, P. C., & Barbuto, J. A. M. (2014). Monocyte-derived dendritic cells reflect the immune functional status of a chromophobe renal cell carcinoma patient: Could it be a general phenomenon? *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(2), 161–171. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1625-9>
- Chen, S. Y., Wan, L., Huang, C. M., Huang, Y. C., Sheu, J. J. C., Lin, Y. J., Liu, S. P., Lan, Y. C., Lai, C. H., Lin, C. W., Tsai, C. H., & Tsai, F. J. (2012). Association of the C-285T and A5954G polymorphisms in the DNA repair gene OGG1 with the susceptibility of rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 32(5), 1165–1169. <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1738-1>
- Collins, A. V., Brodie, D. W., Gilbert, R. J. C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D. I., Van Der Merwe, P. A., & Davis, S. J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*, 17(2), 201–210. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00362-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00362-X)
- Comont, T., Belliere, J., Sibaud, V., Alric, L., Meyer, N., Mazières, J., Caron, P., Acket, B., Michot, J. M., Beyne-Rauzy, O., & Lambotte, O. (2020). Immune-related adverse events after immune checkpoints inhibitors in 2019: An update. *Revue de Medecine Interne*, 41(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.09.005>
- Couzin-Frankel, J. (2013). Cancer immunotherapy. *Science*, 342(6165), 1432–1433. <https://doi.org/10.1126/science.342.6165.1432>

- Coventry, B. J., Baume, D., & Lilly, C. (2015). Long-term survival in advanced melanoma patients using repeated therapies: Successive immunomodulation improving the odds? *Cancer Management and Research*, 7, 93–103. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S76163>
- Damsma, G. E., & Cramer, P. (2009). Molecular basis of transcriptional mutagenesis at 8-oxoguanine. *Journal of Biological Chemistry*, 284(46), 31658–31663. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022764>
- Dalgleish, A. G. (2015). Rationale for combining immunotherapy with chemotherapy. *Immunotherapy*, 7(3), 309–316. <https://doi.org/10.2217/imt.14.111>
- David, S. S., O'Shea, V. L., & Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941–950. <https://doi.org/10.1038/nature05978>
- Dhodapkar, K. M., Barbuto, S., Matthews, P., Kukreja, A., Mazumder, A., Vesole, D., Jagannath, S., & Dhodapkar, M. V. (2008). Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood*, 112(7), 2878–2885. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143222>
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbø, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., Peña-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., & Krokan, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA - Repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, 3(11), 1389–1407. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.05.004>
- Elfenbein, G. J., Green, I., Paul, E. W. (1974). The Allogenic effect: increased cellular immune and inflammatory responses. *The Journal of Immunology*, 112(6), 2166-2175
- Ellsworth, S., Ye, X., & Grossman, S. A. (2017). Clinical, Radiographic, and Pathologic Findings in Patients Undergoing Reoperation Following Radiation Therapy and Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *American Journal of Clinical Oncology*, 40(3), 219–222. <https://doi.org/10.1097/COC.000000000000136>
- Eton & Lepore. (2008). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to

- reactive oxygen species. *Bone*, 23(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1038/nri3423>. Beyond
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Singhal, S., Kapoor, V., Cheng, G., Suzuki, E., & Albelda, S. M. (2010). Chemotherapy delivered after viral immunogene therapy augments antitumor efficacy via multiple immune-mediated mechanisms. *Molecular Therapy*, 18(11), 1947–1959.
<https://doi.org/10.1038/mt.2010.159>
- Friedman, H. S., Kerby, T., & Calvert, H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical Cancer Research*, 6(7), 2585–2597.
- Giammarioli, A. M., Gambardella, L., Quaranta, M. G., Lapenta, C., Santini, S. M., Belardelli, F., Viora, M., & Malorni, W. (2006). Differentiation of monocyte-derived dendritic cells is associated with upregulation and activation of Rac-1 small GTPase. *FEBS Letters*, 580(13), 3335–3339.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.095>
- Gill, B. J., Pisapia, D. J., Malone, H. R., Goldstein, H., Lei, L., Sonabend, A., & Yun, J. (2014). *MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma*. 2–7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1405839111>
- Gittleman, H., Ostrom, Q. T., Stetson, L. C., Waite, K., Hodges, T. R., Wright, C. H., Wright, J., Rubin, J. B., Berens, M. E., Lathia, J., Connor, J. R., Kruchko, C., Sloan, A. E., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2019). Sex is an important prognostic factor for glioblastoma but not for nonglioblastoma. *Neuro-Oncology Practice*, 6(6), 451–462. <https://doi.org/10.1093/nop/npz019>
- Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., & Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *Journal of Experimental Medicine*, 185(6), 1101–1111. <https://doi.org/10.1084/jem.185.6.1101>
- Guermontez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). A *NTIGEN* PRESENTATION AND T CELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 621–667.

- Gotwals, P., Cameron, S., Cipolletta, D., Cremasco, V., Crystal, A., Hewes, B., Mueller, B., Quaratino, S., Sabatos-Peyton, C., Petruzzelli, L., Engelman, J. A., & Dranoff, G. (2017). Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *17*(5), 286–301. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.17>
- He, S., Wang, L., Wu, Y., Li, D., & Zhang, Y. (2010). CCL3 and CCL20-recruited dendritic cells modified by melanoma antigen gene-1 induce anti-tumor immunity against gastric cancer ex vivo and in vivo. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *29*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-37>
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., De Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, *352*(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Herting, C. J., Chen, Z., Pitter, K. L., Szulzewsky, F., Kaffes, I., Kaluzova, M., Park, J. C., Cimino, P. J., Brennan, C., Wang, B., Hambardzumyan, D., Cancer, A., Pharmacology, S., Sloan, M., Kettering, C., Hutchinson, F., Reserve, C. W., & Comprehensive, C. (2018). *HHS Public Access*. *65*(12), 1914–1926. <https://doi.org/10.1002/glia.23203>. Genetic
- Lewis, K. L., & Reizis, B. (2012). Dendritic cells: Arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007401>
- Liau, L. M., Ashkan, K., Tran, D. D., Campian, J. L., Trusheim, J. E., Cobbs, C. S., Heth, J. A., Salacz, M., Taylor, S., D'Andre, S. D., Iwamoto, F. M., Dropcho, E. J., Moshel, Y. A., Walter, K. A., Pillainayagam, C. P., Aiken, R., Chaudhary, R., Goldlust, S. A., Bota, D. A., ... Bosch, M. L. (2018). First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Translational Medicine*, *16*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1507-6>
- Liu, H., Wan, Y., & Wu, Y. (2009). The GTPase Rab3b/3c-positive recycling

- vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15801–15806. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905684106>
- Joel, M., Vera, J., Patrick, S., Burch, J. A., Ames, H., & Matthew, N. U. (1997). *J. r.. p. 3.*
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 557–569. <https://doi.org/10.1038/nri3254>
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G. I., De Los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E. G., Littman, D. R., & Lang, R. A. (2002). In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*, 17(2), 211–220. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00365-5)
- Karachi, A., Dastmalchi, F., Mitchell, D. A., & Rahman, M. (2018). Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 20(12), 1566–1572. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy072>
- Kim, Y.-J., & M. Wilson III, D. (2011). Overview of Base Excision Repair Biochemistry. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 3–13. <https://doi.org/10.2174/1874467211205010003>
- Kowalska, M., Piekut, T., Prendecki, M., Sodel, A., Kozubski, W., & Dorszewska, J. (2020). Mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in physiological and pathological aging. *DNA and Cell Biology*, 39(8), 1410–1420. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.5347>
- Kreuzer, K. N., Clauson, C., & Schärer, O. D. (2014). *Base Excision Repair*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>
- Kruse, M., Rosorius, O., Krätzer, F., Bevec, D., Kuhnt, C., Steinkasserer, A., Schuler, G., & Hauber, J. (2000). Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *Journal of Experimental Medicine*, 191(9), 1581–1589. <https://doi.org/10.1084/jem.191.9.1581>
- Lim, M., Xia, Y., Bettegowda, C., & Weller, M. (2018). Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(7),

422–442. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0003-5>

- McDonnell, A. M., Robinson, B. W. S., & Currie, A. J. (2010). Tumor antigen cross-presentation and the dendritic cell: Where it all begins? *Clinical and Developmental Immunology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/539519>
- Mellman, I., & Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3), 255–258. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00449-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00449-4)
- Meyer, M., Reimand, J., Lan, X., Head, R., Zhu, X., Kushida, M., & Bayani, J. (2014). *Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity*. 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320611111>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Mutter, N., & Stupp, R. (2006). Temozolomide: A milestone in neuro-oncology and beyond? *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6(8), 1187–1204. <https://doi.org/10.1586/14737140.6.8.1187>
- Neilsen, B. K., Sleightholm, R., McComb, R., Ramkissoon, S. H., Ross, J. S., Corona, R. J., Miller, V. A., Cooke, M., & Aizenberg, M. R. (2019). Comprehensive genetic alteration profiling in primary and recurrent glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 142(1), 111–118. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03070-2>
- Neves, A. R., Ensina, L. F. C., Anselmo, L. B., Leite, K. R. M., Buzaid, A. C., Câmara-Lopes, L. H., & Barbuto, J. A. M. (2005). Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0550-8>
- Neyns, B., Tosoni, A., Hwu, W. J., & Reardon, D. A. (2010). Dose-dense temozolomide regimens: Antitumor activity, toxicity, and immunomodulatory effects. *Cancer*, 116(12), 2868–2877. <https://doi.org/10.1002/cncr.25035>
- Ogden, A. T., Horgan, D., Waziri, A., Anderson, D., Louca, J., McKhann, G. M.,

- Sisti, M. B., Parsa, A. T., & Bruce, J. N. (2006). Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas. *Neurosurgery*, *59*(4), 902–909. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000233907.03070.7B>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). *The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma*. *19*(4), 764–773. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- Ostrom, Q. T., Cote, D. J., Ascha, M., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). Adult glioma incidence and survival by race or ethnicity in the United States from 2000 to 2014. *JAMA Oncology*, *4*(9), 1254–1262. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.1789>
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro-Oncology*, *16*(7), 896–913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N. E., Kruchko, C., & Barnholtz-sloan, J. S. (2013). N E U R O - O N C O L O G Y CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, *12*(1), 28–36. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not151>
- Ouyang, M., White, E. E., Ren, H., Guo, Q., Zhang, I., Gao, H., Manuel, R., Zhang, L., Vonderfecht, S. L., & Alizadeh, D. (2016). *Metronomic Doses of Temozolomide Enhance the Efficacy of Carbon Nanotube CpG Immunotherapy in an Invasive Glioma Model*. 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148139>
- Pázmándi, K., Sütő, M., Fekete, T., Varga, A., Boldizsár, E., Boldogh, I., & Bácsi, A. (2019). Oxidized base 8-oxoguanine, a product of DNA repair processes, contributes to dendritic cell activation. *Free Radical Biology and Medicine*, *143*(June), 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.010>
- Pencheva, N., de Gooijer, M. C., Vis, D. J., Wessels, L. F. A., Würdinger, T., van Tellingen, O., & Bernards, R. (2017). Identification of a Druggable Pathway

- Controlling Glioblastoma Invasiveness. *Cell Reports*, 20(1), 48–60.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.036>
- Perfetto, S. P., Chattopadhyay, P. K., Lamoreaux, L., Nguyen, R., Ambrozak, D., Koup, R. A., & Roederer, M. (2006). Amine reactive dyes: An effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 313(1–2), 199–208.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.04.007>
- Pérez-Montesinos, G., López-Ortega, O., Piedra-Reyes, J., Bonifaz, L. C., & Moreno, J. (2017). Dynamic changes in the intracellular association of selected rab small GTPases with MHC class II and DM during dendritic cell maturation. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00340>
- Pham, T., Roth, S., Kong, J., Guerra, G., Narasimhan, V., Pereira, L., Desai, J., Heriot, A., & Ramsay, R. (2018). An Update on Immunotherapy for Solid Tumors: A Review. *Annals of Surgical Oncology*, 25(11), 3404–3412.
<https://doi.org/10.1245/s10434-018-6658-4>
- Phuphanich, S., Wheeler, C. J., Rudnick, J. D., Mazer, M., Wang, H., Nuño, M. A., Richardson, J. E., Fan, X., Ji, J., Chu, R. M., Bender, J. G., Hawkins, E. S., Patil, C. G., Black, K. L., & Yu, J. S. (2013). Phase i trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(1), 125–135.
<https://doi.org/10.1007/s00262-012-1319-0>
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., Misra, A., Nigro, J. M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P. M., Modrusan, Z., Feuerstein, B. G., & Aldape, K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9(3), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.019>
- Pinzon-Charry, A., Maxwell, T., & López, J. A. (2005). Dendritic cell dysfunction in cancer: A mechanism for immunosuppression. *Immunology and Cell Biology*, 83(5), 451–461. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01371.x>
- Prechtel, A. T., Turza, N. M., Theodoridis, A. A., & Steinkasserer, A. (2007). CD83

- Knockdown in Monocyte-Derived Dendritic Cells by Small Interfering RNA Leads to a Diminished T Cell Stimulation. *The Journal of Immunology*, 178(9), 5454–5464. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5454>
- Preusser, M., Lim, M., Hafler, D. A., Reardon, D. A., & Sampson, J. H. (2015). Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. *Nature Reviews Neurology*, 11(9), 504–514. <https://doi.org/10.1038/hrneuro.2015.139>
- Ramos, R. N., Chin, L. S., dos Santos, A. P. S. A., Bergami-Santos, P. C., Laginha, F., & Barbuto, J. A. M. (2012). Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(3), 673–682. <https://doi.org/10.1189/jlb.0112048>
- Rosso, L., Brock, C. S., Gallo, J. M., Saleem, A., Price, P. M., Turkheimer, F. E., & Aboagye, E. O. (2009). A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: Pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients. *Cancer Research*, 69(1), 120–127. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2356>
- Sallusto, F., & Lanzavecchi, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *Journal of Experimental Medicine*, 179(4), 1109–1118. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>
- Sansom, D. M., Manzotti, C. N., & Zheng, Y. (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends in Immunology*, 24(6), 313–318. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00111-X)
- Sanjari Moghaddam, A., Nazarzadeh, M., Noroozi, R., Darvish, H., & Jarrahi, A. M. (2016). XRCC1 and OGG1 gene polymorphisms and breast cancer: A systematic review of literature. *International Journal of Cancer Management*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.17795/ijcp-3467>
- Sato, K., Mano, T., Iwata, A., & Toda, T. (2019). Neurological and related adverse events in immune checkpoint inhibitors: a pharmacovigilance study from the Japanese Adverse Drug Event Report database. *Journal of Neuro-*

- Oncology*, 145(1). <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03273-1>
- Savina, A., Peres, A., Cebrian, I., Carmo, N., Moita, C., Hacohen, N., Moita, L. F., & Amigorena, S. (2009). The Small GTPase Rac2 Controls Phagosomal Alkalinization and Antigen Crosspresentation Selectively in CD8+ Dendritic Cells. *Immunity*, 30(4), 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.013>
- See, A. P., Parker, J. J., & Waziri, A. (2015). The role of regulatory T cells and microglia in glioblastoma-associated immunosuppression. *Journal of Neuro-Oncology*, 123(3), 405–412. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1849-3>
- Seong, H. K., Visser, A., Cruijisen, C., Van Der Velden, A. W. M., & Boes, M. (2008). Recruitment of Rab27a to phagosomes controls microbial antigen cross-presentation by dendritic cells. *Infection and Immunity*, 76(11), 5373–5380. <https://doi.org/10.1128/IAI.01044-08>
- Servais, P. A. , L. C. , J. V. , C. C. , E. (2016). *Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity Prasad*. 27(1), 138–144. <https://doi.org/10.1002/adma.201403943>. Evaluating
- Shurin, G. V., Tourkova, I. L., Chatta, G. S., Schmidt, G., Wei, S., Djeu, J. Y., & Shurin, M. R. (2005). Small Rho GTPases Regulate Antigen Presentation in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 174(6), 3394–3400. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3394>
- Singh, G., Hashimoto, D., Yan, X., Helft, J., Park, P. J. Y., Ma, G., Qiao, R. F., Kennedy, C. R., Chen, S. H., Merad, M., & Chan, A. M. (2012). R-Ras is required for murine dendritic cell maturation and CD4+ T-cell priming. *Blood*, 119(7), 1693–1701. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-357319>
- Sotomayor, E. M., Borrello, I., Rattis, F. M., Cuenca, A. G., Abrams, J., Staveley-O'Carroll, K., & Levitsky, H. I. (2001). Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. *Blood*, 98(4), 1070–1077. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.4.107>
- Stepanovic, A., & Nikitovic, M. (2018). Severe hematologic temozolomide-related

- toxicity and life-threatening infections. *Journal of B.U.ON.*, 23(1), 7–13.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.2628369>
- Stojanovska, V., Prakash, M., McQuade, R., Fraser, S., Apostolopoulos, V., Sakkal, S., & Nurgali, K. (2019). Oxaliplatin Treatment Alters Systemic Immune Responses. *BioMed Research International*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/4650695>
- Stratigopoulou, M., van Dam, T. P., & Guikema, J. E. J. (2020). Base Excision Repair in the Immune System: Small DNA Lesions With Big Consequences. *Frontiers in Immunology*, 11(May).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01084>
- Strik, H. M., Marosi, C., Kaina, B., & Neyns, B. (2012). Temozolomide dosing regimens for glioma patients. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 12(3), 286–293. <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0262-y>
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). 2005STUPP rt + tmz. *N Engl J Med*, 352, 987–996. www.nejm.org
- Tahara, Y. K., Auld, D., Ji, D., Beharry, A. A., Kietrys, A. M., Wilson, D. L., Jimenez, M., King, D., Nguyen, Z., & Kool, E. T. (2018). Potent and Selective Inhibitors of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase. *Journal of the American Chemical Society*, 140(6), 2105–2114. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09316>
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23(10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450–461. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>
- Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - An overview. *Wspolczesna Onkologia*, 18(5), 307–312.

<https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>

- Valtorta, S., Dico, A. Lo, Raccagni, I., Gaglio, D., Belloli, S., Politi, L. S., Martelli, C., Diceglie, C., Bonanomi, M., Ercoli, G., Vaira, V., Ottobrini, L., & Moresco, R. M. (2017). Metformin and temozolomide, a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget*, *8*(68), 113090–113104. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23028>
- Van Loenhout, J., Peeters, M., Bogaerts, A., Smits, E., & Deben, C. (2020). Oxidative stress-inducing anticancer therapies: Taking a closer look at their immunomodulating effects. *Antioxidants*, *9*(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox9121188>
- Van Mierlo, G. J. D., Boonman, Z. F. H. M., Dumortier, H. M. H., den Boer, A. T., Fransen, M. F., Nouta, J., van der Voort, E. I. H., Offringa, R., Toes, R. E. M., & Melief, C. J. M. (2004). Activation of Dendritic Cells That Cross-Present Tumor-Derived Antigen Licenses CD8 + CTL to Cause Tumor Eradication . *The Journal of Immunology*, *173*(11), 6753–6759. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6753>
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, *17*(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Villalva, C., Cortes, U., Wager, M., Tourani, J. M., Rivet, P., Marquant, C., Martin, S., Turhan, A. G., & Karayan-Tapon, L. (2012). O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) promoter methylation status in glioma stem-like cells is correlated to temozolomide sensitivity under differentiation-promoting conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(6), 6983–6994. <https://doi.org/10.3390/ijms13066983>
- Wallace, S. S. (2014). Base excision repair: A critical player in many games Susan. *DNA Repair (Amst)*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Wang, H., Mustafa, A., Liu, S., Liu, J., Lv, D., Yang, H., & Zou, J. (2019). Immune

- checkpoint inhibitor toxicity in head and neck cancer: From identification to management. *Frontiers in Pharmacology*, 10(October), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01254>
- Weiss, T., Weller, M., & Roth, P. (2016). Immunological effects of chemotherapy and radiotherapy against brain tumors. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 16(10), 1087–1094. <https://doi.org/10.1080/14737140.2016.1229600>
- West, C. D., & Harsh, G. R. (2016). *Multiple Subsets of Brain Tumor Initiating Cells Coexist in Glioblastoma*. 1702–1707.
- Wirsching, H., Galanis, E., & Weller, M. (2016). *Glioblastoma*. 134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Yan, Y., Xu, Z., Dai, S., Qian, L., Sun, L., & Gong, Z. (2016). Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0303-5>
- Yazdani, M. (2015). Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species in vitro. *Toxicology in Vitro*, 30(1), 578–582. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.08.010>
- Zhang, W. Bin, Wang, Z., Shu, F., Jin, Y. H., Liu, H. Y., Wang, Q. J., & Yang, Y. (2010). Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. <file:///C:/Users/Danieli/Desktop/referencias/valtorta.pdf>. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40461–40471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.164046>
- Zhang, J., F.G. Stevens, M., & D. Bradshaw, T. (2012). Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114. <https://doi.org/10.2174/1874-470211205010102>
- Zitvogel, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2011). Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(3), 151–160. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.223>
- Zou, L., Zhou, J., Zhang, J., Li, J., Liu, N., Chai, L., Li, N., Liu, T., Li, L., Xie, Z.,

