

RENATO DA SILVA CARDOSO

**MODULAÇÃO COLINÉRGICA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS:  
RELEVANTE NO CONTEXTO DO GLIOBLASTOMA?**

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.

SÃO PAULO

2023

**RENATO DA SILVA CARDOSO**

**MODULAÇÃO COLINÉRGICA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS:  
RELEVANTE NO CONTEXTO DO GLIOBLASTOMA?**

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 Marzagão Barbuto

Versão original.

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

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: .....

Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditam e trabalham em prol da educação, ciências e saúde pública, gratuita, universal e de qualidade no Brasil.

## AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo afeto, apoio e torcida durante essa minha caminhada acadêmica, em especial, minha mãe Rosângela, irmã Geovanna e pai Givanildo.

Ao Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, pela orientação, escuta, paciência e acolhimento ao longo da realização desse projeto de pesquisa. O Prof. Barbuto é uma grande inspiração, não apenas no âmbito profissional, mas também, humano!

A equipe do laboratório de Imunologia de Tumores. Em especial, a Célia, Danieli, Carla, Renata, Nataly, Patrícia e Jaqueline por toda atenção, cooperação e amizade.

A todas(os) as(os) companheiras(os), pertencentes ou não a comunidade acadêmica, que foram uma essencial rede apoio durante esses anos de desenvolvimento deste projeto de pesquisa atravessado por algumas adversidades, dentre elas, a pandemia da COVID-19. Hoje, superada graças a vacinação em massa e o combate ao negacionismo científico.

A todas(os) as(os) funcionárias(os) do departamento, em especial a Maria Eni por todo apoio e auxílio. Assim como a todas(os) as(os) funcionárias(os) do instituto de Ciências Biomédicas e da Universidade de São Paulo, por ajudarem a construir e manter esse patrimônio da sociedade Brasileira que é a universidade pública, gratuita e, cada vez mais, universal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos que viabilizou meu ingresso e permanência no programa de pós-graduação. Como também, as demais políticas de permanência estudantil na pós-graduação existentes na Universidade de São Paulo, conquistadas através da organização e luta do movimento estudantil. Agradeço, em especial, a atuação da Associação dos(as) Pós-Graduandos(as) do Instituto de Ciências Biomédicas e Helenira 'Preta' Resende da USP Capital. Movimentos estudantis onde pude desenvolver outros saberes, habilidades e pude construir fortes laços de companheirismo e amizade.

De modo geral, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e a conclusão dessa dissertação, desde com o fornecimento de insumos, orientações técnico-científicas, sugestões acadêmicas até mesmo com o acolhimento, afeto e suporte emocional. A vocês, a minha mais sincera gratidão!

“Educação não transforma o mundo.

Educação muda pessoas.

Pessoas transformam o mundo”.

(Paulo Freire)

## RESUMO

CARDOSO, R. S. **MODULAÇÃO COLINÉRGICA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS: RELEVANTE NO CONTEXTO DO GLIOBLASTOMA?**. 2023. Dissertação de Mestrado do Departamento de Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O glioblastoma (GBM) é uma doença altamente agressiva, de maior frequência e mortalidade dentre os cânceres primários cerebrais, difícil tratamento e prognóstico ruim. O melhor esquema de tratamento disponível atualmente é capaz de proporcionar uma sobrevida mediana de 15 meses. Sendo assim, fica evidente a necessidade de que mais estudos sejam desenvolvidos para que possamos melhor entender, bem como, tratar esta doença. Alinhado a isto, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia de Tumores (ICB/USP) tem avançado nos últimos anos no que tange a utilização da vacina de células dendríticas (DC) para o tratamento do câncer e dentre eles, mais recentemente, do GBM. Entretanto, a “falha” do sistema imune que permitiu o crescimento do tumor no paciente, pode também impedir que qualquer abordagem imunoterapêutica alcance seu potencial máximo. Desta forma, a busca por novos alvos que possam atenuar este quadro de imunotolerância, sobretudo no microambiente tumoral, pode trazer ganhos significativos, principalmente, de maneira combinada às imunoterapias. Nesse sentido, a subunidade  $\alpha 7$  dos receptores nicotínicos de acetilcolina ( $\alpha 7$ nAChR) tem potencial para fazer jus a esta busca. Afinal, esta subunidade pode significar um elo entre diferentes abordagens de combate ao GBM, pois: (I) é crescente a descrição da associação da  $\alpha 7$ nAChR com respostas imunossupressoras nas mais diversas condições, bem como, de seu envolvimento direto e/ou indireto com fenômenos pró-tumorais; (II) a presença da  $\alpha 7$ nAChR no microambiente do GBM, representada por micróglia/macrófagos associados ao tumor, por exemplo, assim como de seu agonista endógeno, a acetilcolina, sugere que a interferência em sua sinalização pode modificar tal microambiente e, possivelmente, subsidiar respostas antitumorais; (III) a  $\alpha 7$ nAChR é expressa por DC e a literatura leva a crer que seu antagonismo pode aumentar a atividade imunoestimuladora destas células. Mo-mDC expostas a 100  $\mu$ M de ACh, após estímulo com TNF- $\alpha$ , reduziram a expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 ( $p=0,0625|-40\%$ ) e CD83 ( $p=0,0625|-49\%$ ); apresentaram maior razão entre as moléculas CD274/CD80 e CD274/CD80 e, possivelmente, maior capacidade endocítica. O tratamento concomitante de Mo-mDC com ACh (100  $\mu$ M) e de MLA (25 ou 50  $\mu$ M), antagonista específico da  $\alpha 7$ nAChR, pode reverter parcialmente os efeitos ACh-mediados sobre o fenótipo de membrana das DC. Já o agonista específico da  $\alpha 7$ nAChR, PNU-282987, promoveu uma redução de 62% na expressão de CD83 ao passo que aumentou em 75% a expressão de CD197 em Mo-mDC expostas a 200  $\mu$ M desse fármaco. O tratamento de células da linhagem U87MG com ACh e MLA (1:2) promoveu uma redução de 37% na viabilidade metabólica

dessas células. Dados de bioinformática sugerem que altos níveis de expressão gênica de CD40 e CD197 podem ser fatores de prognóstico desfavorável no GBM. Utilizando a mesma ferramenta, foi possível encontrar correlação positiva entre a expressão gênica da  $\alpha 7$ nAChR e a molécula CD40 ( $p=0.0043$  |  $R=0.22$ ) em biópsias de pacientes com GBM. Da mesma maneira, o enriquecimento do microambiente tumoral do GBM com assinaturas gênicas de DC e macrófagos estão associados a menores índices de sobrevida. Ampliados e confirmados estes resultados, pode-se abrir caminho para a exploração de receptores colinérgicos como alvo terapêutico adjuvante à imunoterapia com DC ou de outras abordagens de tratamento para o GBM.

**Palavras-chave:** Glioblastoma, vacina de células dendríticas, subunidade  $\alpha 7$  dos receptores nicotínicos de acetilcolina ( $\alpha 7$ nAChR).



## ABSTRACT

CARDOSO, R. S. **CHOLINERGIC MODULATION OF DENDRITIC CELLS: RELEVANT IN THE GLIOBLASTOMA CONTEXT?**. 2023. Master thesis of the Department of Immunology – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Glioblastoma (GBM) is a highly aggressive disease, with the highest frequency and mortality among primary brain cancers, difficult treatment, and poor prognosis. The best treatment scheme currently available can provide a median survival of 15 months. Thus, it is evident that more studies need to be developed so that we can better understand, as well as treat this disease. In line with this, the Laboratory of Tumor Immunology (ICB / USP) research group has made progress in recent years regarding the use of dendritic cells (DC) vaccine for the treatment of cancer and, more recently, GBM. However, the "failure" of the immune system that allowed tumor growth in the patient may also prevent any immunotherapeutic approach from reaching its full potential. Thus, the search for new targets that can mitigate this immunotolerance, especially in the tumor microenvironment, can bring significant gains, especially in combination with immunotherapies. In this sense, the  $\alpha 7$  subunit of nicotinic acetylcholine receptors ( $\alpha 7nAChR$ ) has the potential to do justice to this search. After all, this subunit may mean a link between different approaches to combat GBM, as: (I) there is a growing description of the association of  $\alpha 7nAChR$  with immunosuppressive responses in a wide range of conditions, as well as, of its direct and/or indirect involvement with pro-tumor phenomena; (II) the presence of  $\alpha 7nAChR$  in the GBM microenvironment, represented by tumor-associated microglia/macrophages, for example, as well as its endogenous agonist, acetylcholine, suggests that interference in its signaling may modify such microenvironment and possibly subsidize antitumor responses; (III)  $\alpha 7nAChR$  is expressed by DC and the literature suggests that its antagonism may increase the immunostimulatory activity of these cells. Mo-mDC exposed to 100  $\mu M$  ACh, after stimulation with TNF- $\alpha$ , reduced the expression of co-stimulatory molecules CD80 ( $p=0.0625|-40\%$ ) and CD83 ( $p=0.0625|-49\%$ ); they showed a higher ratio between CD274/CD80 and CD274/CD80 molecules and possibly a higher endocytic capacity. Concomitant treatment of Mo-mDC with ACh (100  $\mu M$ ) and MLA (25 or 50  $\mu M$ ), a specific  $\alpha 7nAChR$  antagonist, may partially reverse ACh-mediated effects on the membrane phenotype of DC. In contrast, the  $\alpha 7nAChR$ -specific agonist PNU-282987 promoted a 62% reduction in CD83 expression while increasing CD197 expression by 75% in Mo-mDC exposed to 200  $\mu M$  of this drug. Treatment of U87MG cells with ACh and MLA (1:2) led to a 37% reduction in the metabolic viability of these cells. Bioinformatics data suggest that high levels of CD40 and CD197 gene expression may be unfavorable prognostic factors in GBM. Using the same tool, it was possible to find a positive correlation between  $\alpha 7nAChR$  gene expression and the CD40 molecule ( $p=0.0043 | R=0.22$ ) in biopsies from GBM patients. Similarly, enrichment of the

GBM tumor microenvironment with DC and macrophage gene signatures is associated with lower survival rates. Once these results are extended and confirmed, it may pave the way for the exploration of cholinergic receptors as an adjuvant therapeutic target to DC immunotherapy or other treatment approaches for GBM.

**Keywords:** Glioblastoma, dendritic cell vaccine,  $\alpha 7$  subunit of nicotinic acetylcholine receptors ( $\alpha 7$ nAChR).

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVO GERAL .....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 AMOSTRAS .....	27
3.1.1 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS) .....	27
3.1.2 DESENVOLVIMENTO IN VITRO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS .....	28
3.1.3 CULTIVO DA LINHAGEM CELULAR DE GBM U87MG .....	28
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ESQUEMAS DE TRATAMENTOS UTILIZADOS .....	28
3.2.1 PARA OS ENSAIOS ENVOLVENDO Mo-mDC .....	29
3.2.2 PARA OS ENSAIOS ENVOLVENDO Mo-iDC .....	29
3.2.3 PARA O EXPERIMENTO COM U87MG .....	29
3.3 ANÁLISES DE FENÓTIPO E FUNÇÃO DAS APC .....	30
3.3.1 DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO EM CITÔMETRO DE FLUXO .....	30
3.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENDOCÍTICA UTILIZANDO DEXTRAN-FITC 70 .....	31
3.3.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LINFOESTIMULAÇÃO DAS APC .....	32
3.3.4 AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FOSFORILAÇÃO DE STAT3, STAT5 E STAT6 .....	32
3.4 EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO E/OU DO ANTAGONISMO COLINÉRGICO EM CÉLULAS DE GBM .....	33
3.4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (METABÓLICA) PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT .....	33
3.5 ACHADOS IN SILICO UTILIZANDO AS PLATAFORMAS DE BIOINFORMÁTICA GEPiA2 E TIMER .....	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
4. RESULTADOS .....	35
4.1 A ESTIMULAÇÃO COM ACh E/OU MLA NÃO ALTEROU A FREQUÊNCIA DE CÉLULAS Mo-mDC VIVAS E DUPLO-POSITIVAS PARA HLA-DR/CD11c .....	35
4.2 A ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA APÓS SINAL DE MATURAÇÃO É CAPAZ DE ALTERAR O FENÓTIPO DE MEMBRANA DE Mo-mDC .....	36
4.3 AS RAZÕES ENTRE O ÍNDICE DE EXPRESSÃO DE CD274 (PD-L1) E DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS ANALISADAS SUGEREM A AQUISIÇÃO DE UM PERFIL FENOTÍPICO IMUNOTOLEROGÊNICO PELAS Mo-mDC ACh-MEDIADO .....	38

4.4	O TRATAMENTO COM PNU-282987 NÃO ALTEROU A FREQUÊNCIA DE CÉLULAS Mo-mDC VIVAS E DUPLO-POSITIVAS PARA HLA-DR/CD11c .....	40
4.5	PNU-282987, AGONISTA ESPECÍFICO DA $\alpha 7nAChR$ , TAMBÉM É CAPAZ DE MODULAR O FENÓTIPO DE MEMBRANA DE Mo-mDC .....	41
4.6	AS RAZÕES ENTRE O ÍNDICE DE EXPRESSÃO DE CD274 (PD-L1) E DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS ANALISADAS SÃO POUCO MODULADAS POR PNU-282987 .....	43
4.7	SOB UMA PERSPECTIVA QUALITATIVA, TAMBÉM É SUGESTIVA A AQUISIÇÃO DE UM PERFIL FENOTÍPICO IMUNOTOLEROGÊNICO POR Mo-mDC APÓS MODULAÇÃO COLINÉRGICA .....	45
4.8	A ATIVIDADE ENDOCÍTICA DE Mo-iDC É AFETADA PELA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA E, POSSIVELMENTE, DE MANEIRA CD206 INDEPENDENTE .....	47
4.9	A CAPACIDADE LINFOESTIMULADORA ALOGÊNICA DE Mo-mDC TRATADAS DURANTE A MATURAÇÃO COM ACh E/OU MLA PODE NÃO SOFRER INFLUÊNCIA COLINÉRGICA .....	49
4.10	O PRÉ-TRATAMENTO DE Mo-DC COM ACh E/OU MLA TEM POTENCIAL PARA ALTERAR OS NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DE STAT3 E STAT5, MAS NÃO DE STAT6 .....	49
4.11	A VIABILIDADE METABÓLICA DE CÉLULAS DE GBM DA LINHAGEM U87MG PODE SER REDUZIDA DE MANEIRA SIGNIFICATIVA QUANDO EXPOSTAS, CONCOMITANTEMENTE, A ACh E AO MLA .....	52
4.12	ACHADOS IN SILICO ENDOSSAM UMA POSSÍVEL “RELEVÂNCIA COLINÉRGICA” NO CONTEXTO DO GLIOBLASTOMA .....	54
5.	DISCUSSÃO .....	60
6.	CONCLUSÃO .....	73
7.	ANEXOS .....	74
7.1	ESTRATÉGIAS DE GATING UTILIZADAS .....	74
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## 1. INTRODUÇÃO

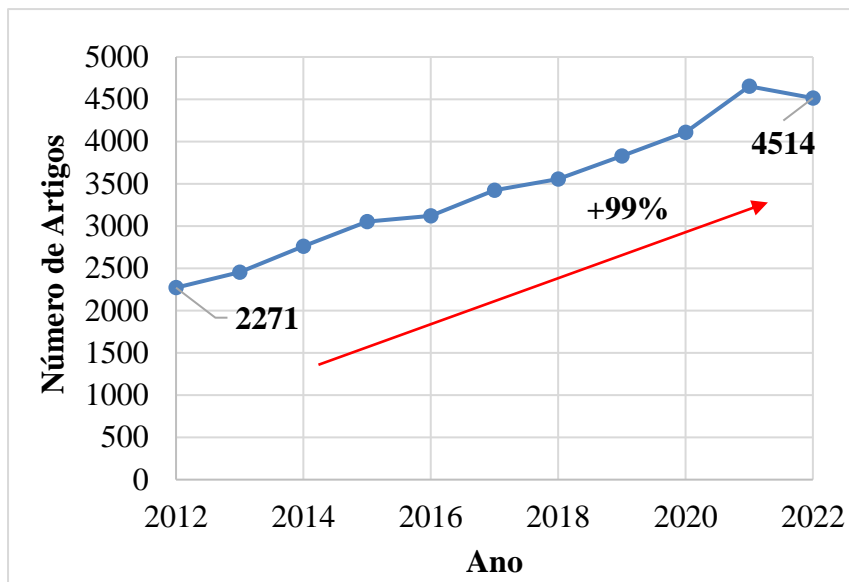
O glioblastoma (GBM) é um tumor maligno do sistema nervoso central (SNC), classificado como um glioma de grau 4 pela Organização Mundial da Saúde (LOUIS *et al.*, 2021) e cuja incidência, por estatísticas estrangeiras, é de 3.19/100.000 habitantes (THAKKAR *et al.*, 2014). Segundo estimativas do INCA, para cada ano do triênio de 2023 a 2025 são esperados 11.490 novos casos de câncer do SNC no Brasil (INCA, 2022). Tendo em vista que os gliomas representam 81% dos tumores malignos do SNC e que aproximadamente 50% dos gliomas são GBM (ZANDERS *et al.*, 2019), fica evidente a relevância em números absolutos dessa doença em nossa população, apesar de sua relativa baixa incidência.

Dentre os cânceres do SNC primários em adultos, o GBM é o de maior frequência e letalidade (TAMIMI; JUWEID, 2017). Sua incidência e taxa de mortalidade aumentam conforme o avançar da idade, sendo 64 anos a idade mediana de diagnóstico (YOUNG *et al.*, 2017). A idade avançada e a exposição à radiação ionizante são os únicos fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento da doença (WELLER *et al.*, 2017; TAMIMI; JUWEID, 2017).

Biologicamente, o GBM é caracterizado por seu alto índice de proliferação celular, propensão à invasão e necrose, robusta angiogênese, expressiva heterogeneidade clonal e subclonal, bem como, por sua alta resistência à apoptose, radioterapia e quimioterapia (BONAVIA *et al.*, 2011; DUNN *et al.*, 2012; CLOUGHESY *et al.*, 2014; LOUIS *et al.*, 2016; HANIF *et al.*, 2017; MCGRANAHAN; SWANTON, 2017).

Tais fatores contribuem para que esta neoplasia seja de difícil tratamento, com estratégias terapêuticas e sobrevida pouco modificadas nas últimas quatro décadas (BONAVIA *et al.*, 2011; TAMIMI; JUWEID, 2017; HANIF *et al.*, 2017). Isso permite que o GBM seja considerado um dos mais letais cânceres humanos da atualidade (CLOUGHESY *et al.*, 2014; VLEESCHOUWER *et al.*, 2017).

Esse *status* não pode ser justificado pela ausência de esforços para melhor entender e tratar essa doença. Afinal, somente entre os anos de 2012 e 2022, houve um crescimento de 99% na quantidade de artigos depositados na plataforma PubMed com a palavra-chave “glioblastoma” (figura 1). Bem como, segundo Van Solinge *et al.* (2022), no ano de 2022 havia 1.593 estudos clínicos registrados com a palavra “glioblastoma” no banco de dados *ClinicalTrials.gov*. Refletindo, dessa forma, a complexidade e o grande desafio científico e clínico que o GBM ainda significa.



**Figura 1.** Número de artigos científicos depositados por ano na plataforma PubMed contendo a palavra-chave “glioblastoma”.

O tratamento padrão-ouro da doença consiste na máxima ressecção cirúrgica da massa tumoral, seguida pelo tratamento adjuvante com sessões de radio- e quimioterapia com temozolomida (TMZ). Mesmo com essa estratégia, a sobrevida mediana global dos pacientes é por volta de 15 meses (NØRØXE *et al.*, 2016; VLEESCHOUWER *et al.*, 2017); ocorrendo, frequentemente, a recidiva do tumor entre 1.5 e 6 meses após o tratamento (BIRZU *et al.*, 2020) e, em 80% dos casos, a recorrência ocorre dentro ou na margem do campo de irradiação utilizado na radioterapia (VAN SOLINGE *et al.*, 2022).

Diante deste cenário, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos visando a melhor compreensão da complexa fisiopatologia e/ou tratamento do GBM (LEE *et al.*, 2006; MCLENDON *et al.*, 2008; PARSONS *et al.*, 2008; VERHAAK *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2012; VLEESCHOUWER *et al.*, 2017; ROMANI *et al.*, 2018; CARAGHER *et al.*, 2019). Entre estes, merece destaque a investigação de alvos moleculares específicos, tais como mTOR (CHANG *et al.*, 2005), PTEN (CLOUGHESY *et al.*, 2008), EGFR (RICH *et al.*, 2004; BENT *et al.*, 2009; CHAKRAVARTI *et al.*, 2013), VEGF (BATCHELOR *et al.*, 2013; GILBERT *et al.*, 2014), PD-1 (LIM *et al.*, 2022; OMURO *et al.*, 2022), MGMT (WICK *et al.*, 2014; BRANDNER *et al.*, 2021; OMURO *et al.*, 2022) e IDH (AMELOT *et al.*, 2015; MELHEM *et al.*, 2022; HERTLER *et al.*, 2023), moléculas que vem sendo estudadas como marcadores de doença, prognóstico (*i. e.*, PTEN, MGMT e IDH) e/ou como alvos terapêuticos (*i. e.*, mTOR, EGFR, VEGF, PD-1).

No entanto, uma significativa parcela dos ensaios clínicos alvo-dirigidos, envolvendo a utilização de inibidores de tirosina quinase, a exemplo, erlotinibe e gefitinibe. Bem como, anticorpos monoclonais bloqueadores de EGFR e VEGF, tais como nimotuzumabe e bevacizumabe, falharam em produzir respostas clínicas superiores ao tratamento padrão-ouro (BROWN *et al.*, 2008; BENT *et*

*al.*, 2009; NEYNS *et al.*, 2009; CLOUGHESY *et al.*, 2014; WESTPHAL *et al.*, 2015; PEARSON; REGAD, 2017; VLEESCHOUWER *et al.*, 2017; JAIN, 2018). Esta situação acaba por não justificar – ou ao menos enfraquecer muito - a continuidade dos estudos, tampouco, leva à validação dessas vias como alvos terapêuticos relevantes no contexto do GBM.

A resistência adquirida às terapias antineoplásicas é um desfecho atualmente bem conhecido e a depender do tecido de origem e tipo do tumor, um evento inevitável; ocorrendo frequentemente a progressão da doença ou recidiva a partir da seleção de clones resistentes (WANG *et al.*, 2019; MCGRANAHAN; SWANTON, 2017; ZAHREDDINE *et al.*, 2013). Fenômeno esse, que sabidamente pode explicar o insucesso de vários dos estudos clínicos supracitados envolvendo a utilização de terapias alvo-dirigidas para o tratamento do GBM.

Por esse motivo, estratégias que combinem duas ou mais modalidades diferentes de tratamento vem ganhando força e apresentando-se como possível solução aos mecanismos tumor-intrínsecos e -extrínsecos de resistência aos tratamentos antitumorais (SCHREIBELT *et al.*, 2015; ZANDERS *et al.*, 2019; OMURO *et al.*, 2022).

Dentre as novas abordagens com potencial para fazer frente aos mecanismos de resistência às terapias antineoplásicas, como a heterogeneidade clonal e subclonal existente nos cânceres, destaca-se a imunoterapia (LORENZO *et al.*, 2011; SCHREIBELT *et al.*, 2015; BRUDNO; KOCHENDERFER, 2017; HUANG *et al.*, 2017; OISETH; AZIZ, 2017; RILEY *et al.*, 2019; ZANDERS *et al.*, 2019). Isso porque, a imunoterapia representa a possibilidade do desenvolvimento de esquemas de tratamentos, no mínimo, mais específicos contra as células tumorais e com potencial para respostas mais duradouras em comparação a quimio- e/ou radioterapias (LIU; GUO, 2018).

Das diversas estratégias de imunoterapia existentes, os inibidores dos pontos de controle (*checkpoint inhibitors*) - IPC - possuem lugar de destaque, uma vez que, a aprovação e a utilização clínica dos IPC revolucionou o tratamento de alguns tipos de cânceres que, até então, possuíam opções terapêuticas limitadas e prognóstico desfavorável. Exemplos disto são o melanoma metastático, o carcinoma pulmonar de células não pequenas, o linfoma não-Hodgkin de células B e o câncer de bexiga metastático (SCHMIDT *et al.*, 2019; LIU; GUO, 2018; RUSSANO *et al.*, 2023).

Tamanha a relevância dos ganhos trazidos em termos de ciência básica e aplicada com o desenvolvimento dos IPC que os pesquisadores responsáveis por sua idealização foram laureados com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2018 (NOBEL PRIZE, 2018). Esta premiação contribuiu para o aumento do interesse sobre a imunoterapia e de suas possibilidades na luta contra o câncer.

Todavia, os IPC não são a única abordagem possível e potencialmente eficaz de imunoterapia. Essa estratégia tem como principal objetivo “liberar” uma resposta imune pré-existente no paciente de seus controles fisiológicos, porém, esta resposta nem sempre existe. Assim, é possível dirigir o

estudo e as estratégias terapêuticas à outra “ponta” da resposta, nomeadamente, a apresentação de antígenos.

Nessa perspectiva, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia de Tumores (ICB-USP) tem estudado a imunobiologia das células dendríticas (DC) no contexto das neoplasias, tanto em termos de pesquisa básica (NEVES *et al.*, 2004; ANSELMO *et al.*, 2005; PINHO *et al.*, 2016; PATENTE *et al.*, 2019) quanto aplicada (BARBUTO, 2004; ANTUNES *et al.*, 2006; BALEEIRO *et al.*, 2013), desenvolvendo estratégias de imunoterapia para o tratamento do câncer, dentre eles, mais recentemente, do GBM (LEPSKI *et al.*, 2023).

As células dendríticas (DC) foram primeiramente caracterizadas em 1973 pelos pesquisadores Steinman e Cohn (1973). No entanto, ainda em 1868 durante um minucioso estudo anatômico sobre a pele conduzido por Paul Langerhans, o mesmo descreve as células de Langerhans. A primeira célula do sistema imune a ser identificada e, após mais de cem anos de sua descrição por Langerhans, entendida como um tipo de célula dendrítica residente no tecido epitelial (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2008; STOITZNER, 2010).

A identificação das DC por Steinman e Cohn em 1973 ocorre como resultado de uma corrida científica da época que buscava entender como iniciava-se a resposta imune adaptativa. O consenso científico que se consolidava nesse período era de que os macrófagos eram os responsáveis pela ativação dos linfócitos T virgens (*naïve*) e, conseqüentemente, pela iniciação da resposta adaptativa (LIU, 2016).

Especulando que outro tipo celular era na verdade o responsável pela iniciação da resposta imunológica adaptativa, Steinman e Cohn passaram a estudar por microscopia de contraste de fase as células aderentes do baço e dos linfonodos de camundongos. Nesse processo, descobriram uma pequena população de células com formato estrelado e projeções citoplasmáticas que lembravam dendritos de neurônios e, por esse motivo, as nomearam de células dendríticas (STEINMAN; COHN, 1973).

Após sua identificação e caracterização morfológica, Steinman e colaboradores dedicaram-se a entender qual seria a função dessa célula recém descoberta. Em 1978, Steinman e Witmer publicam um artigo que representa um marco inicial para a caracterização funcional das DC (STEINMAN; WITMER, 1978). Nesse trabalho, a partir do modelo *in vitro* de reação leucocitária mista (MLR), os pesquisadores demonstraram que as DC eram quase duas ordens de grandeza mais potentes que células do baço não purificadas, linfócitos B ou macrófagos em estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos (STEINMAN; WITMER, 1978).

A partir de então, um conjunto de estudos foram desenvolvidos por Steinman e demais cientistas (NUSSENZWEIG *et al.*, 1980; STEINMAN *et al.*, 1991; BANCHEREAU *et al.*, 2000;

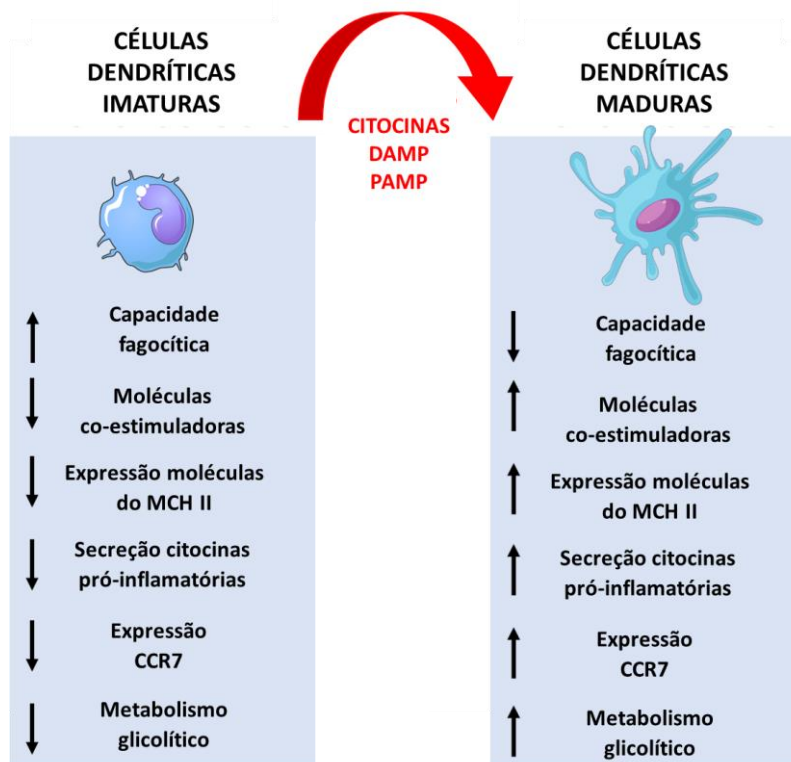


STEINMAN *et al.*, 2003), proporcionando um acúmulo teórico e experimental inequívoco acerca do papel fisiológico das células dendríticas, isto é, a iniciação da resposta imune adaptativa e a manutenção da tolerância periférica, através da captura e processamento de antígenos periféricos, migração aos órgãos linfoides secundários e apresentação de antígenos aos linfócitos T de maneira MHC-restrita (BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN *et al.*, 2003; LIU, 2016).

As DC representam uma verdadeira “ponte” entre a resposta imune inata e o que está ocorrendo nos confins do organismo e a resposta imunológica adaptativa, centralizada nos órgãos linfoides secundários. Não à toa, essas células estão distribuídas por quase todos os tecidos do organismo (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2008). Assim, a mesma é capaz de monitorar e prontamente identificar qualquer distúrbio homeostático que porventura ocorra no microambiente dos tecidos e seja relevante o suficiente para evocar a resposta imune adaptativa, através da ativação de linfócitos T virgens.

Influenciadas justamente pelos estímulos presentes em seu microambiente, as DC podem apresentar dois estados funcionais: um denominado imaturo, e outro, maduro (PATENTE *et al.*, 2019). O estado imaturo é caracterizado pela inabilidade das DC em ativar células T *naïve*. Uma vez que, nessa condição, as células apresentam uma baixa produção de moléculas do MHC de classe II; reduzida expressão de moléculas co-estimuladoras; baixa secreção de citocinas pró-inflamatórias; menor potencial migratório (devido à menor expressão do receptor CCR7) e metabolismo pouco glicolítico (figura 2) (STEINMAN *et al.*, 2003; KIM; KIM, 2019; PATENTE *et al.*, 2019). Fatores esses, que atuam de modo a reduzir as chances de apresentação de antígenos, ou ainda, promovem tolerância imunológica por meio do estímulo à apoptose, anergia ou, alternativamente, polarização das células T a um perfil regulatório, ou seja, a transformação de linfócitos T *naïve* em células Treg (KURTS *et al.*, 1997; MANICASSAMY *et al.*, 2011; SAITO *et al.*, 2011).

Já em seu estado maduro, as células dendríticas tornam-se aptas a ativarem linfócitos T (STEINMAN *et al.*, 2003; KIM; KIM, 2019; PATENTE *et al.*, 2019). Isso acontece em decorrência da ativação de seus receptores de reconhecimento de padrões (PRR), mediante a ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e/ou padrões moleculares associados a danos (DAMP). Como consequência, um conjunto de alterações moleculares, metabólicas e morfológicas (figura 2) são desencadeadas como, por exemplo, o aumento da expressão de proteínas do MHC classe II e



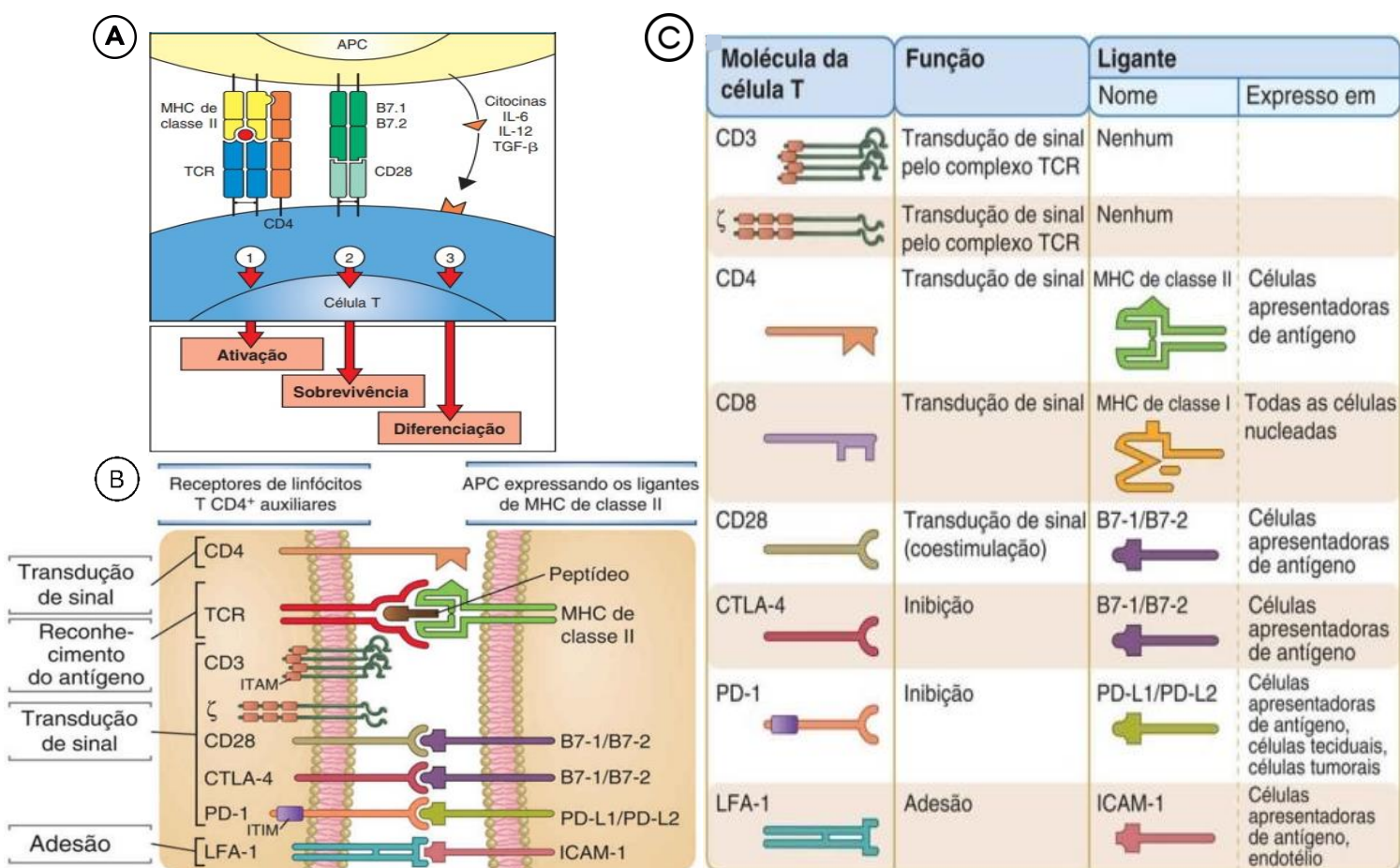
**Figura 2.** Células dendríticas e seus estados funcionais. A ativação dos PRR das DC por meio da ligação de PAMP e/ou DAMP promovem alterações moleculares, metabólicas e morfológicas que permitem dicotomizar as células dendríticas em dois estados funcionais, isto é, imaturo e maduro. Adaptado de Patente *et al.* (2019).

moléculas co-estimuladoras (*i.e.* CD40, CD80, CD83 e CD86); alterações essas, necessárias para que as dendríticas sejam capazes de apresentar os antígenos capturados e, paralelamente, atingir o limiar de ativação dos linfócitos T a fim de que estes iniciem sua expansão clonal e diferenciação em células T efetoras e de memória (BARBUTO, 2013; PATENTE *et al.*, 2019).

A íntima interação entre células apresentadoras de antígenos (APC) e linfócitos T recebe o nome de sinapse imunológica (figura 3) (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2008). Tal como a sinapse entre neurônios, a sinapse imunológica nada mais é do que uma interface de comunicação entre duas células visando a propagação de uma informação biológica. No entanto, diferentemente da sinapse nervosa, a imunológica sempre acontece por intermédio da ligação física entre as células envolvidas e a informação é transpassada da célula emissora (a APC) para a célula receptora (o linfócito T) através de três tipos de sinais (JANEWAY *et al.* 2007).

O primeiro sinal advém da interação entre o complexo TCR-CD3 do linfócito T com o peptídeo antigênico processado e ligado a moléculas do MHC de classe I (reconhecido por células TCD8+) ou de classe II (reconhecido por células TCD4+) expressos na membrana plasmática da APC (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2008; STOITZNER, 2010).

O segundo sinal deriva da ligação das proteínas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), expressas pelas APC, ao receptor chamado CD28 presente na superfície dos linfócitos T. A ligação de CD80 e CD86 ao CD28 desencadeia sinais intracelulares nas células T que atuam conjuntamente a sinalização gerada pelo reconhecimento do complexo peptídeo-MHC (primeiro sinal) (JANEWAY *et al.* 2007). Na ausência desse segundo sinal, o linfócito T pode entrar em apoptose ou em estado de anergia, ou seja, se torna não responsivo/tolerante ao peptídeo antigênico apresentado (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).



**Figura 3.** A sinapse imunológica. (A) A completa ativação de um linfócito T virgem ocorre mediante a conjunção de três sinais. (B) As principais moléculas expressas por células T CD4+ envolvidas na sinapse imunológica (receptores) e as moléculas ligantes na superfície das APC. Células T CD8+ utilizam praticamente as mesmas moléculas, exceto que o TCR reconhece os complexos peptídeo-MHC de classe I e o correceptor é CD8, o qual reconhece o MHC de classe I. (C) Principais moléculas envolvidas na ativação ou inibição de células T. APC, célula apresentadora de antígeno; CTLA-4, antígeno-4 do linfócito T citotóxico; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; LFA-1, antígeno 1 associado à função leucocitária; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; PD-1, morte programada-1; PDL-1/2, ligantes 1 e 2 de morte programada; TCR, receptor de células T. Adaptado de Abbas *et al.* (2015) e Janeway *et al.* (2007).

Já o terceiro sinal, é proveniente da secreção de citocinas pelas APC - e por outras células do microambiente onde ocorrem as interações - que irão atuar, principalmente, na diferenciação e no pleno desenvolvimento da função efetora das células T (CURTSINGER *et al.*, 1999; CURTSINGER *et al.*, 2003). A exemplo a citocina IL-12, que ao ser secretada na fenda sináptica pela APC durante a interação com linfócitos TCD4+, por exemplo, irá conduzir a polarização dessas

células para o perfil auxiliar tipo 1 (Th1), subtipo celular considerado fundamental para uma eficiente resposta adaptativa contra patógenos intracelulares (CURTSINGER *et al.*, 1999; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A célula dendrítica é chamada de apresentadora de antígenos profissional, pois é o único tipo celular, dentre as APC (*i.e.* macrófagos, linfócitos B e DC), capaz de fornecer os três sinais supracitados de maneira suficiente para atingir o limiar de ativação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ virgens e, conseqüentemente, deflagrar todo o potencial da resposta imune adaptativa (STEINMAN *et al.*, 2003; BARBUTO, 2013; PATENTE *et al.*, 2019).

Essa habilidade superior das DC pode ser justificada por diversas características inerentes a esse grupo celular. Desde vantagens morfológicas, a exemplo, sua grande quantidade de dendritos que aumentam a superfície de contato disponível para a captura e apresentação de antígenos. Assim como a habilidade exclusiva dessas células de capturar antígenos periféricos, processá-los e migrar até os órgãos linfoides secundários para o encontro com as células T *naïve*, isso, por intermédio do aumento da expressão de receptores para quimiocinas linfonodais (*i.e.* CCL19 e/ou CCL21), nesse caso, CCR7 (CD197). Até, principalmente, a aptidão em expressar moléculas co-estimuladoras que fornecem direta (*i.e.* CD80 e CD86) e/ou indiretamente (*i.e.* CD40 e CD83) sinais adicionais anti-apoptóticos, de proliferação e diferenciação, necessários para a completa ativação das células T (GROSCHÉ *et al.*, 2020).

Tão importante quanto estimular uma resposta fisiológica, é regular sua ativação e função. A sinapse imunológica e, por consequência, a ativação da resposta imune adaptativa não fogem a essa regra evolutivamente selecionada. Dito isso, dois receptores importantes reguladores da resposta imune mediada por linfócitos T são, CTLA-4 (CD152) e PD-1 (CD279). CTLA-4, competindo com CD28, se liga à CD80 e CD86 na superfície das APC e PD-1 reconhece as moléculas PD-L1 (CD274) e PD-L2 (CD273), também presentes na membrana das APC (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Tanto CTLA-4 quanto PD-1 são induzidas em células T ativadas e a sinalização intracelular proveniente do estímulo dessas moléculas é inibidora e regula negativamente a ativação da célula T (Figura 3) (JANEWAY *et al.* 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Dessa forma, essas proteínas atuam como um "freio" da resposta imunológica, evitando reações imunes exacerbadas ou contra autoantígenos, ou seja, prevenindo a autoimunidade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). É interessante destacar que mesmo estando os níveis máximos da expressão de CTLA-4 abaixo da expressão extracelular de CD28, CTLA-4 ainda compete favoravelmente para a ligação às moléculas B7, pois apresenta uma afinidade substancialmente maior a essas moléculas do que CD28 (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2008).

A partir dessa constatação, é possível sugerir que há uma certa tendência à regulação negativa da resposta imune adaptativa, ao invés de sua ativação. Assim sendo, a existência de um grupo celular “profissional” em apresentar antígenos, que são as DC, representa um ganho evolutivo extremamente importante no que tange ao alcançar o limiar de ativação de uma resposta que tende à tolerância. Essa dinâmica, por si só, ajuda a garantir a especificidade da resposta contra antígenos não-próprios e, de fato, potencialmente perigosos à homeostase dos tecidos.

Estratégias imunoterapêuticas que utilizam DC exploram a dinâmica natural de indução da resposta imunológica adaptativa. Portanto, essa modalidade de imunoterapia busca induzir uma resposta imune antitumoral específica, mediada por linfócitos T, a partir da apresentação de antígenos tumorais pelas DC vacinais (BARBUTO, 2004; JAIN, 2018; PATENTE *et al.*, 2019).

No protocolo terapêutico desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, as DC utilizadas são derivadas de monócitos (Mo-DC) de doadores saudáveis (DALL’OGLIO; SROUGI; BARBUTO, 2003). As DC de pacientes com câncer podem apresentar algumas limitações/inadequações, como: (I) menor aptidão em estimular a proliferação de linfócitos T; (II) menor expressão de moléculas co-estimuladoras; (III) capacidade de migração e secreção de IL-12 e (IV) potenciais disfunções na fagocitose, processamento e apresentação de antígenos (BARBUTO, 2013).

Isto posto, tendo em vista que esses mecanismos são vitais para a dinâmica de iniciação e manutenção de uma efetiva resposta imune antitumoral, a utilização de DC provenientes de doadores saudáveis configura-se como uma alternativa atrativa e com potencial para produzir resultados mais significativos (BELLA *et al.*, 2003; ORSINI *et al.*, 2003; SATTHAPORN *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 2012; TONIOLO *et al.*, 2016; PATENTE *et al.*, 2019).

O uso das DC na imunoterapia contra o câncer tem gerado resultados promissores, tanto por nosso grupo de pesquisa (DALL’OGLIO; SROUGI; BARBUTO, 2003; BARBUTO, 2004; PINHO *et al.*, 2022; LEPSKI *et al.*, 2023), como também, em estudos conduzidos por diversas outras equipes (AZUMA *et al.*, 2002; GROVER *et al.*, 2006; CHIANG *et al.*, 2013; SCHREIBELT *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018), inclusive no contexto do GBM (PHUPHANICH *et al.*, 2012; BREGY *et al.*, 2013; RAPP *et al.*, 2018; LIAU *et al.*, 2018; LEPSKI *et al.*, 2023).

Resultados recém publicados a partir de um estudo clínico de fase I/II não-controlado desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (LEPSKI *et al.*, 2023), corroboram os já descritos na literatura e endossam a utilização das DC no tratamento do GBM. Liao *et al.* (2018), por exemplo, através de um ensaio clínico de fase III, observaram uma sobrevida global mediana (mOS) de 40,5 meses em 30% (100 dos 331 com intenção de tratamento) dos pacientes tratados com vacina de DC.

E, de uma maneira geral, uma mOS de 23,1 meses após a intervenção cirúrgica para os 331 pacientes com intenção de tratamento incluídos no estudo.

Já nosso grupo de pesquisa, diferentemente de Liau *et al.* (2018), utilizando como estratégia vacinal Mo-DC alogênicas fundidas a células de GBM autólogas, pode constatar uma sobrevida mediana global de  $27,6 \pm 2,4$  meses para os 28 pacientes com GBM vacinados com as DC híbridas. Ambos os trabalhos, apesar de possuírem metodologia vacinal e um número de participantes bem distintos, apontam no mesmo sentido e são muito promissores se comparados a mOS proveniente de séries históricas de pacientes submetidos apenas ao tratamento padrão-ouro, isto é, cerca de 15 meses (STUPP *et al.*, 2005; NØRØXE *et al.*, 2016; VLEESCHOUWER *et al.*, 2017).

Entretanto, resultados clínicos obtidos através do tratamento de pacientes com câncer vacinados com DC ainda estão aquém do esperado (SCHADENDORF *et al.*, 2006; PRINS *et al.*, 2010; SARNAIK *et al.*, 2010; FILLEY *et al.*, 2017; EAGLES *et al.*, 2018; DATSI; SORG, 2021), indicando claramente que ainda há muito espaço para investigação e aprimoramento desta estratégia, inclusive, no que diz respeito ao tratamento do GBM com vacinas de DC (DATSI; SORG, 2021).

De maneira geral, uma hipótese para explicar a falha das estratégias que buscam induzir reações imunes ativas nos pacientes é o “desvio” da resposta, inicialmente induzida, para a imunotolerância (HANAHAN; WEINBERG, 2011; BARBUTO, 2013; SAXENA; BHARDWAJ, 2018), que é também, a explicação para o “escape” dos tumores à resposta imune, seja no microambiente tumoral ou de maneira sistêmica no organismo do paciente (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MAGAÑA-MALDONADO *et al.*, 2016).

Tal qual em outros cânceres, no GBM são conhecidos inúmeros fatores indutores de imunotolerância em seu microambiente, que juntos agem a seu favor e contra o desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral efetiva. Macrófagos e células da micróglia do fenótipo M2, linfócitos T reguladores, células supressoras mieloides, bem como, a produção da interleucina 10 (IL-10), dos fatores de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e do endotélio vascular (VEGF), da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e a expressão de moléculas co-inibidoras tais como PD-1, PD-L1 e CTLA-4; todos parecem contribuir para estabelecer um microambiente imunossupressivo e, conseqüentemente, tolerogênico no GBM, que favorece sua progressão e que pode comprometer uma duradoura eficácia de estratégias imunoterapêuticas contra esta neoplasia (LINDAU *et al.*, 2013; GALATRO, 2016; MAGAÑA-MALDONADO *et al.*, 2016; SAXENA; BHARDWAJ, 2018; ROURA *et al.*, 2020).

Apesar da existência de mecanismos de evasão tumoral ao sistema imune aparentemente comuns à maioria das neoplasias (HANAHAN; WEINBERG, 2011), fatores como o tipo histológico do tumor e o tecido onde a neoplasia primária está localizada, podem modificar substancialmente a

contribuição de cada elemento e a composição do “cenário” tolerogênico de um câncer (QUAIL *et al.*, 2017; YU; CUI, 2018). No caso do GBM e demais tumores que acometem o sistema nervoso, há também a considerável presença dos neurotransmissores (NT); mediadores que sabidamente possuem a capacidade de alterar o comportamento das células do sistema imunológico (FRANCO *et al.*, 2007; GODINHO-SILVA *et al.*, 2019), podendo desta forma afetar a evolução da resposta imune ao tumor (MANCINO *et al.*, 2011; JOBLING *et al.*, 2015; QUAIL *et al.*, 2017; CARAGHER *et al.*, 2019).

Curiosamente, tal como as células neurais, leucócitos são capazes de sintetizar, secretar e expressar receptores para os principais NT cerebrais, como glutamato, dopamina, acetilcolina, noradrenalina e serotonina (FRANCO *et al.*, 2007; GODINHO-SILVA *et al.*, 2019; REAVIS *et al.*, 2020). A simples constatação destas habilidades prenuncia um possível papel imunomodulador dos NT. Além do mais, a revisitação do conceito de imunoprivilégio do SNC trouxe consigo a descoberta de um sistema particular de drenagem linfática de antígenos e células do sistema imune (LOUVEAU *et al.*, 2015; ABSINTA *et al.*, 2017; PAVLOV; TRACEY, 2017), revelando uma maior interação entre SNC e sistema imunológico, possibilitando pensar em uma diversidade de interações neuro-imunes já a partir do SNC, antes, inimagináveis (ENGELHARDT *et al.*, 2017; NUTMA *et al.*, 2019).

Nesse cenário, é crescente o interesse em compreender as implicações biológicas desta interação entre sistema nervoso e sistema imune em diversas circunstâncias, dentre elas, no câncer (MANCINO *et al.*, 2011; QUAIL *et al.*, 2017; ZAHALKA; FRENETTE, 2020; REAVIS *et al.*, 2020; MANCUSI; MONJE, 2023). Caragher *et al.* (2019), por exemplo, demonstraram os efeitos da dopamina, via receptores de dopamina do tipo 2 (DRD2), sobre células de GBM, aumentando a capacidade de autorrenovação das mesmas e promovendo a troca metabólica para vias glicolíticas, favoráveis ao desenvolvimento tumoral.

De maneira análoga, os efeitos dos NT sobre as células do sistema imune no contexto do câncer, também vêm sendo reconhecidos. A exemplo, o trabalho desenvolvido por Kokolus *et al.* (2018) ao mostrar, através de uma análise retrospectiva, que pacientes com melanoma metastático em tratamento com o IPC anti-PD-1 e, concomitantemente,  $\beta$ -bloqueadores inespecíficos, apresentaram sobrevida global superior aos pacientes que apenas fizeram uso do *checkpoint inhibitor* anti-PD-1. Embora apenas sugestiva, esta observação pode apontar para uma interação neuro-imune significativa, na medida em que mediadores beta-adrenérgicos possuem conhecida ação imunossupressora (GUERESCHI *et al.*, 2013; ENG *et al.*, 2014; TAKENAKA *et al.*, 2015; QIAO *et al.*, 2018) e seu bloqueio poderia potencializar e/ou sustentar a resposta imune antitumoral nos pacientes.

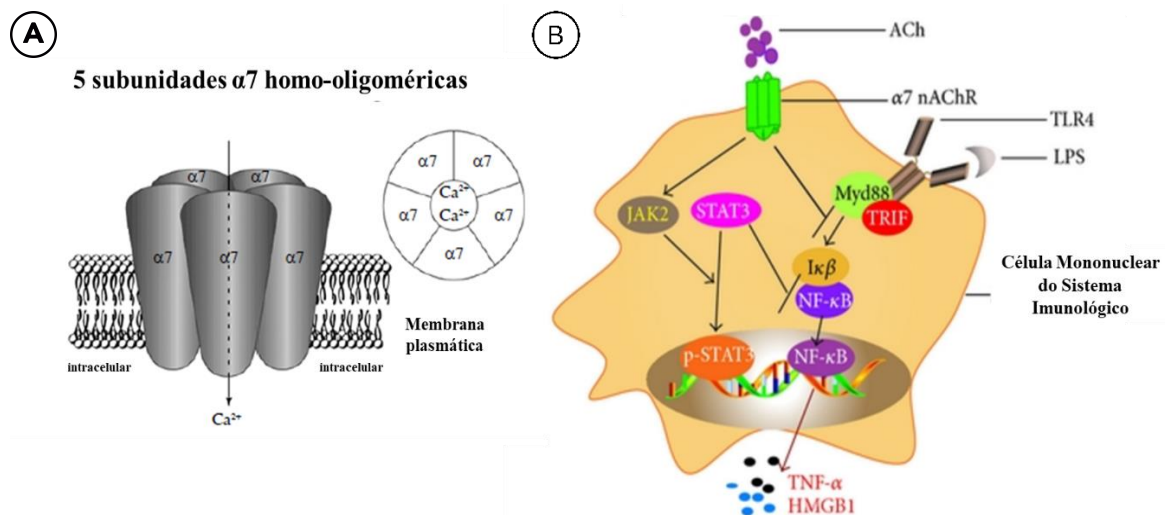
Dentre os NT cujo potencial imunomodulador já é conhecido, a acetilcolina (ACh) vem ganhando destaque. A ACh e seus receptores (nicotínicos e muscarínicos) possuem ampla distribuição pelo sistema nervoso central e periférico, desempenhando funções viscerais, motoras e



cognitivas fundamentais para a sobrevivência e o desenvolvimento do organismo (MANCINO *et al.*, 2011; PICCIOTTO *et al.*, 2012). No entanto, a descrição da ACh como molécula imunomoduladora é relativamente recente e foi impulsionada pelos resultados obtidos no trabalho desenvolvido por Borovikova *et al.* (2000).

Neste estudo, os efeitos anti-inflamatórios da ACh foram evidenciados e deram suporte à descrição de uma “via anti-inflamatória colinérgica”, também chamada de “reflexo inflamatório” (TRACEY *et al.* 2002), que possui efeitos tanto sobre células imunes no sistema nervoso, quanto em tecidos periféricos (FRANCO *et al.*, 2007; RÖTERING *et al.*, 2014; JOBLING *et al.*, 2015; FUJII *et al.*, 2017). Sua atuação vem sendo amplamente estudada em diversas doenças e condições diferentes (TRACEY, 2002; GAHRING; ROGERS, 2005; MARRERO *et al.*, 2009; ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009; RÖTERING *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2015; ZDANOWSKI *et al.*, 2015; CORSI-ZUELLI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018).

Os efeitos imunossupressores promovidos pela ACh são atribuídos à atividade da subunidade  $\alpha 7$  de seus receptores nicotínicos ( $\alpha 7$ nAChR) (TRACEY, 2002; WANG *et al.*, 2002). Os receptores  $\alpha 7$  nicotínicos de ACh são constituídos por 5 subunidades  $\alpha 7$  que circundam e controlam um canal iônico permeável ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ ; que quando ativado, promove o influxo deste íon e, conseqüentemente, desencadeia respostas subcelulares que incluem a inibição da translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, a ativação da via JAK2-STAT3 e/ou a fosforilação da proteína quinase B (Akt) via JAK2-PI3K (figura 4) (JONGE; ULLOA, 2009; PAVLOV; TRACEY, 2012; ZDANOWSKI *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Via anti-inflamatória colinérgica ao nível celular. (A) Estrutura dos receptores  $\alpha 7$  nicotínicos. Os receptores homopentaméricos  $\alpha 7$  nicotínicos são canais iônicos que controlam o influxo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) A ativação da  $\alpha 7$ nAChR pela ligação da acetilcolina desencadeia respostas intracelulares antagônicas a produção de mediadores inflamatórios tal como a citocina TNF- $\alpha$ . Esse antagonismo ocorre através da inibição da translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e/ou pela ativação da via JAK2-STAT3 e, conseqüentemente, a translocação nuclear de p-STAT3. TLR4, receptor tipo Toll 4; LPS, lipopolissacarídeo. Adaptado de Krishna *et al.* (2008) e Wu, Li e Su (2014).



Não surpreendentemente, a expressão da  $\alpha 7$ nAChR pode ser constatada em diversos tipos de células neurais e da glia, no entanto, também em células endoteliais, monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B (JONGE *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; RÖTERING *et al.*, 2014; CORTES *et al.*, 2017), dando substrato aos efeitos imunossupressores de moléculas agonistas da subunidade  $\alpha 7$ . Entre tais efeitos, está a habilidade de aumentar a função supressiva de linfócitos T reguladores (WANG *et al.*, 2010); provocar distúrbios nos processos de maturação, fagocitose, apresentação de antígenos, produção de IL-12 e na capacidade de ativação de linfócitos T efetores por DC (JONGE; ULLOA, 2009; ZDANOWSKI *et al.*, 2015; ST-PIERRE *et al.*, 2016), bem como, o estímulo a polarização preferencial de macrófagos para o fenótipo pró-resolutivo M2 (LEE; VAZQUEZ, 2013; ST-PIERRE *et al.*, 2016).

Ainda que cada vez mais estudada a atividade imunodepressora da  $\alpha 7$ nAChR e seus ligantes sobre os leucócitos periféricos, principalmente no tocante ao reflexo inflamatório, sua influência sobre células migrantes ou residentes no sistema nervoso central, a exemplo as células da micróglia e suas polarizações, é até o momento pouco explorada e demanda por mais estudos, especialmente, no âmbito do microambiente tumoral (PARADA *et al.*, 2013; MAGAÑA-MALDONADO *et al.*, 2016).

Afinal, a modulação funcional das micróglias/macrófagos associados a tumores (TAM), revertendo suas polarizações tolerogênicas para perfis mais imunorreativos, é apontada como uma das possibilidades para superar o desafiador quadro de imunotolerância intratumoral no GBM (POON *et al.*, 2017; CHEN; HAMBARDZUMYAN, 2018). Estratégia essa, com referencial teórico e experimental para se provar eficaz, sobretudo, se considerarmos o fato de que 30 a 40% das células imunes infiltrantes no microambiente do GBM parecem ser TAM (CHEN; HAMBARDZUMYAN, 2018) e que segundo Roura *et al.* (2020), é possível encontrar um enriquecimento de assinaturas gênicas de macrófagos do fenótipo M2 e células dendríticas imaturas (iDC) no ambiente intratumoral de gliomas de alto grau, tal como o GBM.

Nesse contexto, contribui ainda para a escolha da  $\alpha 7$ nAChR como alvo de estudos, a crescente caracterização da relação da ACh, bem como, de demais NT com respostas pró-tumorais (THAKER *et al.*, 2006; MANCINO *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2012; JOBLING *et al.*, 2015; QUAIL *et al.*, 2017; SHAASHUA *et al.*, 2017; WANG; HU, 2018) e, especialmente, do envolvimento da subunidade  $\alpha 7$  com a progressão tumoral em diversos modelos de câncer (LIN *et al.*, 2012), nos quais este receptor apresenta efeitos pró-angiogênicos, proliferativos e pró-metastáticos associados a sua ativação em neoplasias, como o câncer de pulmão (WANG; HU, 2018), o mesotelioma (TROMBINO *et al.*, 2004) e o adenocarcinoma colônico (WONG *et al.*, 2007). Aponta na mesma direção, o controle da proliferação, angiogênese e metástase através da utilização de fármacos antagonistas específicos da

subunidade  $\alpha 7$ , como a metilcaconitina (MLA) ou a  $\alpha$ -bungarotoxina, em estudos pré-clínicos em modelos de câncer de pulmão, cólon e bexiga (HO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2011).

Ainda é conveniente citar observações clínico-epidemiológicas reportadas na literatura, que também endossam a escolha da  $\alpha 7$ nAChR como alvo de estudos no contexto do GBM. A exemplo, a observação de que áreas do SNC onde raramente ocorre o aparecimento ou invasão de células do GBM como no cerebelo (TAMIMI; JUWEID, 2017) e hipocampo (PERRIN *et al.*, 2019), respectivamente, serem justamente regiões onde a expressão de receptores nicotínicos e/ou da  $\alpha 7$ nAChR é significativamente menor em comparação a demais regiões do SNC (PATERSON; NORDBERG, 2000; TOYOHARA *et al.*, 2010; MUGHAL *et al.*, 2018; PERRIN *et al.*, 2019); do mesmo modo, a constatação de que quando há o aparecimento do GBM em regiões cerebelares, os tumores são de menor tamanho e os pacientes apresentam maiores índices de sobrevida em comparação a GBM supratentoriais (ADAMS *et al.*, 2013), sobretudo em pacientes mais jovens (MATTOS *et al.*, 2006).

Dado o exposto até aqui, a atividade da  $\alpha 7$ nAChR parece ter efeitos sobre três aspectos na história natural das neoplasias: 1. Algumas células neoplásicas demonstram ser estimuladas por ela; 2. No microambiente tumoral, sua ação parece desviar a resposta imune para perfis tolerantes; 3. Em estratégias terapêuticas, seu bloqueio pode potencializar as respostas efetoras pretendidas.

Portanto, este projeto almejou explorar direta e/ou indiretamente esses três aspectos, dando preferência *in vitro* para a modulação colinérgica e sua repercussão no fenótipo e função de DC, tendo em mente a especialidade e estratégia vacinal desenvolvida pelo grupo de pesquisa, bem como, o papel central das DC na dinâmica da resposta imune adaptativa. Mas, ao mesmo tempo, o projeto procurou avaliar os efeitos da ativação ou inibição colinérgica sobre células neoplásicas de GBM, onde há uma carência de dados na literatura. Paralelamente, investigou-se, *in silico*, correlatos clínicos que permitissem especular a respeito do valor da  $\alpha 7$ nAChR como alvo de modulação no contexto do GBM, ou não.

## 2. OBJETIVO GERAL

Estudar *in vitro* o papel da modulação colinérgica no fenótipo e função de células dendríticas derivadas de monócitos, bem como, sua influência sobre a viabilidade mitocondrial de células de GBM da linhagem U87MG. E *in silico*, buscar marcadores correlatos que permitam avaliar a possível relevância da  $\alpha 7$ nAChR e/ou da modulação colinérgica no contexto do GBM.

Para isso, os objetivos específicos foram:

- a) Testar a capacidade da estimulação e/ou do antagonismo colinérgico de modular o fenótipo e função de Mo-mDC;
- b) Estimar a fosforilação dos fatores de transcrição STAT3, STAT5 e STAT6 em Mo-iDC tratadas com o agonista e/ou antagonista colinérgico;
- c) Avaliar a viabilidade mitocondrial de células tumorais de GBM da linhagem U87MG expostas a ACh e/ou MLA, fármaco antagonista específico da  $\alpha 7$ nAChR;
- d) Explorar dados *in silico*, a partir da utilização de ferramentas *web* de bioinformática, que permitam complementar os achados *in vitro*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS

##### 3.1.1 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS)

Câmaras de leucorredução (CLR) residuais do processo de doação de plaquetas por aférese (a qual contém sangue residual rico em leucócitos) foram generosamente fornecidas pelo Instituto de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, após consentimento por escrito dos doadores, para a realização dos resultados aqui descritos. As CLR doadas foram utilizadas para a obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), necessárias para o processo de geração *in vitro* das mo-DC, bem como, para a obtenção dos linfócitos (células não aderentes mononucleares - CNA) utilizados nos ensaios contido no desenho experimental deste projeto. Para tanto, os seguintes critérios de inclusão e exclusão foram adotados:

##### **Critérios de Inclusão**

- a) Adultos de ambos os sexos com idade entre 18 e 69 anos;
- b) Concordantes com o termo de consentimento livre e esclarecido fornecido e assinado no Instituto de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz antes do procedimento de doação de plaquetas;
- c) Indivíduos considerados saudáveis; sem comorbidades como doenças crônicas (diabetes, dislipidemia, doenças infecciosas e entre outras), assim como, não reagentes para os exames sorológicos realizados no serviço de hemoterapia do hospital em questão para a detecção de infecções por Hepatites B e C, Sífilis, Doença de Chagas, HTLV I/II, e HIV; como de praxe em todo processo de doação de sangue e hemoderivados;
- d) Respeitar os critérios de habilitação para doação de sangue e hemoderivados segundo a legislação vigente e atual.

##### **Critérios de Exclusão**

- a) Doadoras grávidas ou lactantes;
- b) Indivíduos com quadro médico ou cirúrgico relevantes, distúrbios psiquiátricos ou que façam uso (prévio ou atual) de qualquer medicação ou tratamento que possa interferir no andamento deste estudo (quimioterapia, radioterapia e imunossuppressores, por exemplo);
- c) Doadores que tenham sido submetidos a algum protocolo de tratamento experimental até a data de doação de plaquetas.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e está devidamente registrado na plataforma Brasil sob processo número CAAE: 17788219.8.0000.5467.

### **3.1.2 DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS**

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) provenientes de doadores saudáveis foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (GE Healthcare, EUA). As PBMC foram semeadas em placas de cultura de células com 24 poços, em volume de 1mL, incubadas em meio RPMI-1640 (GIBCO) por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as CNAs foram removidas e transferidas para uma garrafa para uso posterior, e as aderentes foram cultivadas em RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de uma solução antibiótica-antimicótica (Gibco 15240062) - meio R10 - suplementado com fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (50ng/mL; Peprotech) e IL-4 (50ng/mL; Peprotech). Após 5 dias em cultivo, obtivemos as células dendríticas derivadas de monócitos em seu estágio funcional imaturo (mo-iDC) e, então, as células receberam um estímulo de maturação com TNF- $\alpha$  (50ng/ml; Peprotech) para a obtenção, após 48h de cultivo, das Mo-DC em seu estágio funcional maduro, ou seja, as Mo-mDC.

### **3.1.3 CULTIVO DA LINHAGEM CELULAR DE GBM U87MG**

Foram utilizadas células da linhagem U87MG de GBM humano, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) da Universidade de São Paulo ao nosso grupo de pesquisa. As células foram descongeladas e, posteriormente, ressuspensas em RPMI-1640 (GIBCO) no qual foi adicionado 10% de SFB e 1% de uma solução antibiótica-antimicótica (GIBCO 15240062). As células foram semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e colocadas na estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A cada dois ou três dias o meio de cultura foi trocado e ao atingir confluência de aproximadamente 100%, as células foram lavadas com solução salina tamponada e preparadas para os próximos experimentos.

## **3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ESQUEMAS DE TRATAMENTOS UTILIZADOS**

Os grupos experimentais deste projeto de pesquisa foram divididos da seguinte maneira:

- i.** Controle, com aplicação do veículo - água ultrapura Milli-Q;
- ii.** ACh (*Acetylcholine chloride* - Sigma-Aldrich);
- iii.** MLA (*Methyllycaconitine citrate salt* - Sigma-Aldrich), fármaco antagonista competitivo específico da subunidade  $\alpha 7nAChR$ ;
- iv.** ACh + MLA;

- i. Ou PNU 282987 (Sigma-Aldrich), fármaco agonista específico da subunidade  $\alpha 7nAChR$ .

Para chegarmos as concentrações descritas nos resultados obtidos até o presente momento e aqui detalhados, realizamos alguns ensaios de concentração-reposta que permitiram excluir algumas doses com o intuito de que pudéssemos focar em análises mais objetivas e exequíveis (dados não mostrados). As concentrações testadas tiveram como base um intervalo de concentrações já descritas na literatura, especialmente em Borovikova *et al.* (2000), variando entre concentrações de 1 a 100  $\mu M$  para cada tratamento ou combinação dos mesmos (BOROVIKOVA *et al.*, 2000; TUCCI *et al.*, 2003; CHILTON *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2017).

### **3.2.1 PARA OS ENSAIOS ENVOLVENDO Mo-mDC:**

As Mo-iDC obtidas no 5º dia de cultivo receberam o estímulo para maturação com TNF- $\alpha$  (50ng/ml) e, após 30 minutos desse estímulo, foram tratadas com (i) Veículo, (água MiliQ autoclavada – grupo controle) ou (ii) ACh, nas concentrações de 1, 25 e 100  $\mu M$ , alternativamente, de 1, 25, 50, 100 e 200  $\mu M$  ou (iii) MLA, na concentração de 25  $\mu M$  ou (iv) ACh na concentração de 100  $\mu M$  mais MLA nas concentrações de 25  $\mu M$  (relação 4:1) ou 50  $\mu M$  (relação 2:1) ou (v) PNU, nas concentrações 1, 25, 50, 100 e 200  $\mu M$  e, após isso, permaneceram em cultivo por 48h assim como estabelece o protocolo para obtenção das Mo-mDC.

### **3.2.2 PARA OS ENSAIOS ENVOLVENDO Mo-iDC:**

- a) Experimento para avaliação da atividade endocítica:

No 5º dia de cultivo das mo-DC as células foram tratadas com (i) Veículo, (água MiliQ autoclavada – grupo controle) ou (ii) ACh, nas concentrações de 1, 25 e 100  $\mu M$  ou (iii) MLA, na concentração de 25  $\mu M$  ou (iv) ACh na concentração de 100  $\mu M$  mais MLA nas concentrações de 25  $\mu M$  (relação 4:1) ou 50  $\mu M$  (relação 2:1). Após 24h da exposição aos tratamentos, as APCs foram desafiadas com 1,5 mg/mL de Dextran-FITC 70 e seguido o protocolo detalhado no item 3.3.2.

- b) Ensaio para marcação de moléculas intracelulares:

Durante o 3º e 4º dia de cultivo das mo-DC, as mesmas foram expostas aos tratamentos na mesma configuração de grupos e concentrações conforme detalhados no item anterior. No 5º dia de cultivo, ou seja, após aproximadamente 24h da última exposição aos tratamentos, as Mo-iDC foram estimuladas com TNF- $\alpha$  (50ng/ml; Peprotech) e após 30 minutos o ensaio foi encerrado e as células marcadas extra e intracelularmente para as moléculas de interesse.

### **3.2.3 PARA O EXPERIMENTO COM U87MG:**

Por 24h células de GBM da linhagem U87MG foram submetidas aos tratamentos com (i) Veículo, (água MiliQ autoclavada – grupo controle) ou (ii) ACh, nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  ou (iii) MLA, nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  ou (iv) ACh na concentração de 10  $\mu\text{M}$  mais MLA nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  (relação 10:1), 5  $\mu\text{M}$  (relação 2:1), 10  $\mu\text{M}$  (relação 1:1), 20  $\mu\text{M}$  (relação 1:2) e 40  $\mu\text{M}$  (relação 1:4). As concentrações foram feitas em triplicata. Após o período de exposição aos tratamentos, o ensaio foi encerrado e seguido o protocolo detalhado no item 3.4.1.

## **3.3 ANÁLISES DE FENÓTIPO E FUNÇÃO DAS APC**

### **3.3.1 DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO EM CITÔMETRO DE FLUXO**

Após a exposição das células aos tratamentos em diferentes configurações, elas foram lavadas, centrifugadas por 10 minutos a 300g e ressuspensas em PBS num tubo cônico. Posteriormente, anticorpos específicos para as moléculas de interesse para as Mo-mDC (HLA-DR, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, CD197 e CD274) foram adicionados aos tubos e então incubados por 20 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após incubação, os tubos foram centrifugados novamente, o sobrenadante armazenado e as células então marcadas foram fixadas com 200 $\mu\text{L}$  de paraformaldeído a 1% para leitura posterior em citometro de fluxo. A aquisição foi feita em citometro de fluxo (FACSCanto II © BD) e a análise através do software FlowJo (versão 9.0.2, Tree Star).

### 3.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENDOCÍTICA UTILIZANDO DEXTRAN-FITC 70

Após 24h da aplicação dos tratamentos, as APCs foram transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL contendo 1mL de meio R10 contendo 1,5 mg/mL de Dextran-FITC 70 e incubadas na estufa a 37 °C por 1 hora. Após esse tempo, as células foram lavadas e centrifugadas durante 10 minutos em meio RPMI-1640 por duas vezes. Como controle negativo, objetivando a eliminação de possíveis ligações inespecíficas, um outro grupo de APCs, expostas as mesmas condições, foram incubadas com a mesma concentração de Dextran-FITC 70 a 4°C (geladeira) por 1 hora. Cada tratamento e concentração teve seu respectivo controle negativo. Ao término do ensaio, a atividade endocítica foi avaliada por aquisição em citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos através do valor de MFI apresentado pelas APCs incubadas na estufa, subtraído do valor de MFI obtido pelos controles negativos de cada grupo experimental. Ou seja, quanto maior a média geométrica da intensidade de fluorescência, maior a incorporação de Dextran-FITC 70 pelas mo-DC.

Painel	Anticorpo-Anti (Alvo)	Fluorocromo	Marca
Células Dendríticas	HLA-DR	V500	BD Bioscience
	CD11c	PECy-7	BD Bioscience
	CD40	PECy-5	BD Bioscience
	CD80	PECy-5	BD Bioscience
	CD83	PE	BD Bioscience
	CD86	FITC	BD Bioscience
	CD197 (CCR7)	FITC	BD Bioscience
	CD206	PECy-5	BD Bioscience
	CD274 (PD-L1)	PE	BD Bioscience
Linfócitos	CD3	APC	BD Bioscience
	CD4	PE	BD Bioscience
	CD8	PerCP-eFluor™ 710	ThermoFisher
	CD25	PECy-7	BD Bioscience



### 3.3.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LINFOESTIMULAÇÃO DAS APC

Linfócitos T allogenêicos (provenientes das CNAs previamente coletadas) em uma concentração de  $1 \times 10^7$  células foram incubados com tampão PBS, contendo  $5 \mu\text{M}$  de CFSE. A incubação foi realizada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , ao abrigo da luz por 15 min. Após isso, os linfócitos foram lavados 2 vezes em meio R10 gelado e, posteriormente, foram co-cultivados com Mo-mDC previamente tratadas, assim como descrito no item 3.3.1, em placas de 96 poços com fundo em U na proporção de 1 Mo-mDC para 30 linfócitos. As células foram mantidas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 5 dias. Ao término do período de co-cultura, os linfócitos foram marcados com o corante Live and Dead® (2 mM) e para as moléculas CD3, CD4, CD8, CD25 e a análise da expressão das mesmas, bem como, da fluorescência emitida pelo CFSE foi realizada em citometria de fluxo (FACSCanto II © BD) e análise através do software FlowJo (versão 9.0.2, Tree Star). Como controle positivo um grupo foi tratado com fitohemaglutinina (PHA) e como controle negativo, um grupo foi plaqueado apenas com linfócitos.

### 3.3.4 AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FOSFORILAÇÃO DE STAT3, STAT5 E STAT6

Para tanto, foram seguidos os procedimentos descritos no item 3.3.1 ou no item 3.3.2 b) e, posteriormente, executado o protocolo relatado no item 3.4.1, com apenas algumas adaptações requeridas para a marcação intracelular de moléculas como, por exemplo, a permeabilização das células com a solução *BD Cytofix/Cytoperm Buffer™* e lavagens com a solução *BD Perm Wash Buffer™* e, naturalmente, a adição ao mix de marcação de anticorpos para a detecção das formas fosforiladas dos fatores de transcrição STAT3, STAT5 e STAT6.

Painel	Anticorpo-Anti (Alvo)	Fluorocromo	Marca
Células Dendríticas (Intracelular)	STAT3 (pY705)	Alexa Fluor® 488	BD Bioscience
	STAT5 (pY694)	PE	BD Bioscience
	STAT6 (pY641)	Alexa Fluor® 647	BD Bioscience

### **3.4 EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO E/OU DO ANTAGONISMO COLINÉRGICO EM CÉLULAS DE GBM**

#### **3.4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (METABÓLICA) PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT**

Anteriormente a exposição aos tratamentos, as células de GBM da linhagem U87MG foram cultivadas por 12h em meio RPMI-1640 com 0% de SFB para sincronização do ciclo celular das mesmas em G0/G1. Posteriormente, as células foram plaqueadas em uma concentração de  $4 \times 10^3$  células por poço em meio R10 juntamente com os tratamentos conforme descrito no item item 3.3.3. Após isto, foram adicionados 10  $\mu$ L de MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio] a 5 mg/mL em cada poço da placa de 96 poços com os respectivos tratamentos e a mesma foi incubada por 3h. Após este tempo, a placa foi centrifugada a 240 g por 10 minutos, o meio foi descartado e os cristais de formazan foram diluídos em 100 $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). A viabilidade mitocondrial foi determinada a partir dos valores de absorbância obtidos (subtraídos do branco) normalizados pelo valor de absorbância do veículo, considerado como 100% viável. A densidade óptica foi determinada utilizando o leitor de microplacas (VERSAmax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, CA, USA) em comprimento de onda de 538 nm.

### **3.5 ACHADOS *IN SILICO* UTILIZANDO AS PLATAFORMAS DE BIOINFORMÁTICA GEPIA2 E TIMER**

GEPIA2 (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*) é uma ferramenta *web* de bioinformática que utiliza amostras teciduais provenientes de 8,587 pacientes saudáveis e 9,736 pacientes com diferentes tipos de neoplasias para avaliação da expressão gênica e correlação com parâmetros clínicos e patológicos. As análises são realizadas utilizando as amostras do GTEx (*Genotype-Tissue Expression*) ou TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). A GEPIA2 tem capacidade de trabalhar com os resultados provenientes da mineração de ~ 20.000 genes codificadores, ~ 25.000 genes não codificantes, ~ 14.000 pseudogenes e ~ 400 fragmentos de receptores de células T (TANG *et al.*, 2019). A GEPIA2 faz uso para as análises de sobrevivência o modelo gráfico de Kaplan Meier com teste de Logrank e modelo de riscos proporcionais de Cox. Já os testes de correlação são através do coeficiente de correlação de Pearson. Diferença estatística significativa para todos os testes de  $p < 0,05$ .

Já a TIMER (*Tumor Immune Estimation Resource*) é uma ferramenta de bioinformática utilizar para verificar a associação entre infiltrado imune e diversos parâmetros biológicos e clínicos no contexto de vários tipos de cânceres (LI *et al.*, 2017). Essa ferramenta utiliza o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) para minerar cerca de 10.897 amostras de 32 tipos de cânceres e estimar a correlação entre as células do sistema imunológico, como TCD4 +, TCD8 +, macrófagos, células dendríticas,

neutrófilos e outras células do microambiente tumoral, como fibroblastos associados ao câncer (CAF) e a expressão de determinados genes pelas células tumorais. A TIMER utiliza para as análises de sobrevida o modelo gráfico de Kaplan Meier com teste de Logrank e modelo de riscos proporcionais de Cox. Diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ .

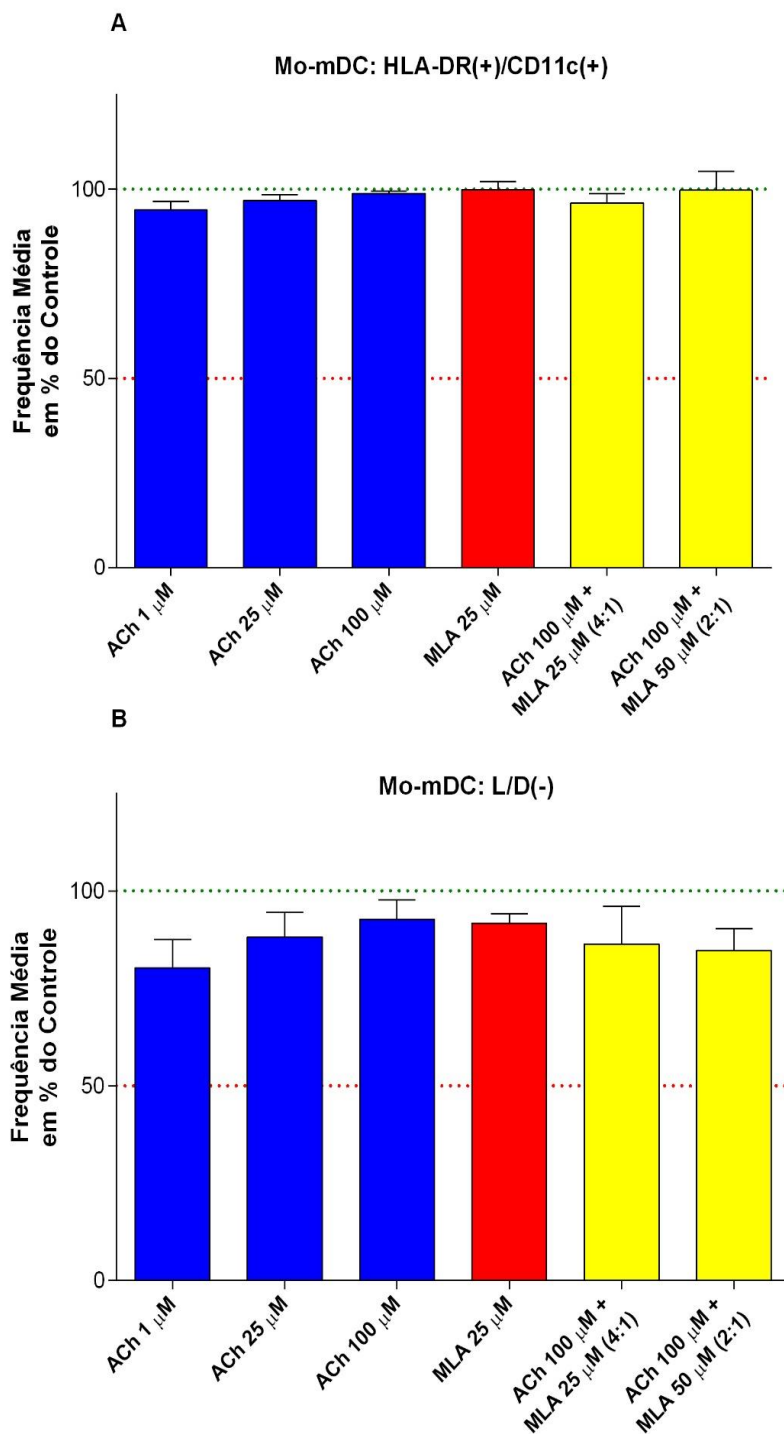
### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os gráficos e análises estatísticas foram realizados no *software* Prisma 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Como todos os resultados aqui apresentados, até o presente momento, não possuem um número de repetições igual ou superior a 10, assim como pressupõe as análises estatísticas de normalidade, todos os testes aqui utilizados foram testes não-paramétricos. Para comparações entre os tratamentos e o grupo controle (veículo), o tendo como valor de referência (100%), foi utilizado o teste de Wilcoxon (*Wilcoxon signed rank test*). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média. Apenas diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas e  $p \geq 0,05$  e  $\leq 0,07$  foi classificado como tendência a diferença estatística significativa, tido como de valor quantitativo nesse estudo. Os testes estatísticos foram somente aplicados aos ensaios com um número de repetições  $\geq 4$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 A ESTIMULAÇÃO COM ACh E/OU MLA NÃO ALTEROU A FREQUÊNCIA DE CÉLULAS Mo-mDC VIVAS E DUPLO-POSITIVAS PARA HLA-DR/CD11c

Não foi possível notar diferença estatística relevante, ou mesmo alguma tendência, em relação a frequência de células dendríticas, isto é, células duplo-positivas para HLA-DR/CD11c entre os



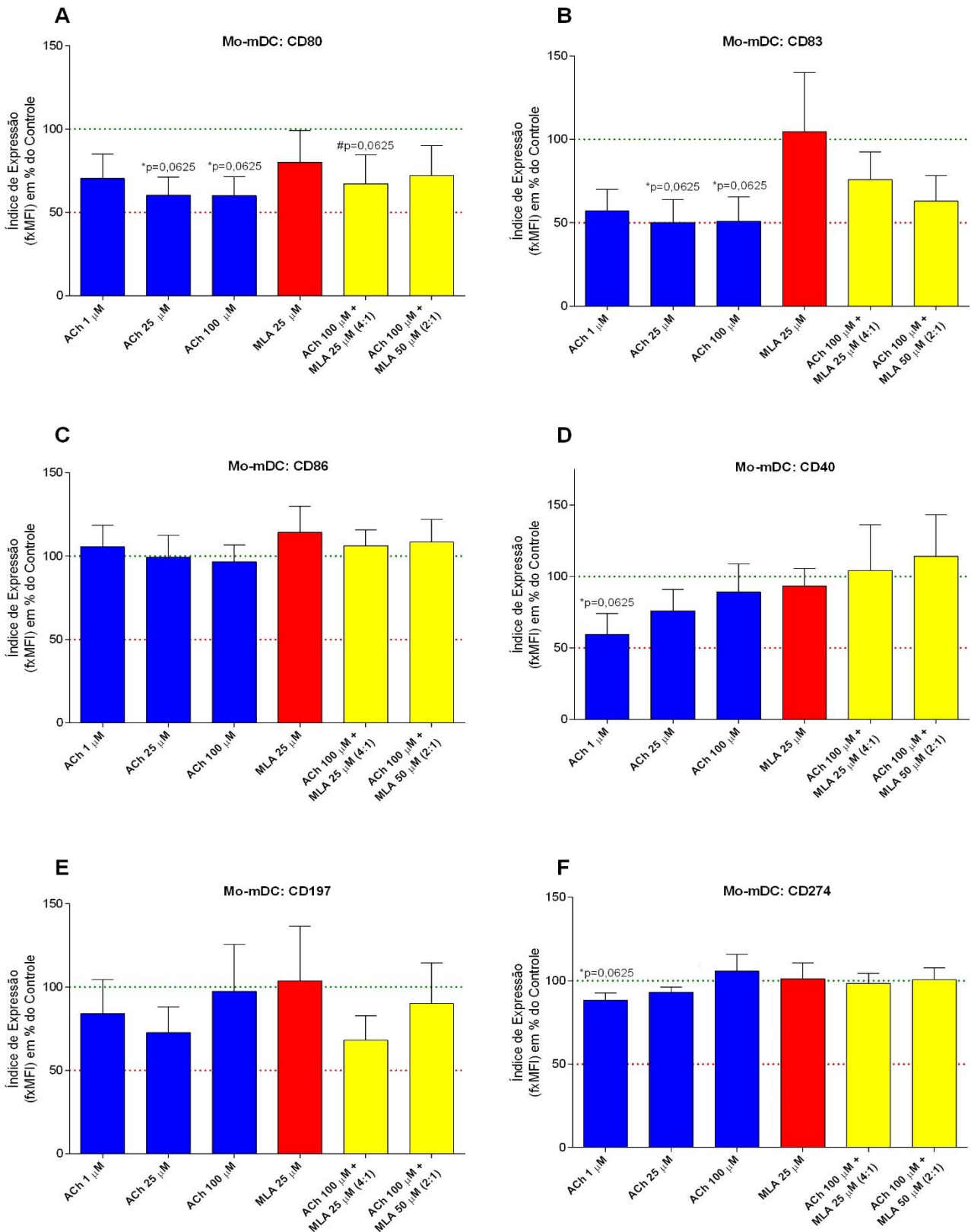
**Figura 5.** Frequência média em % do controle de células HLA-DR+/CD11c+ e vivas (L/D-) após tratamento com ACh e/ou MLA. Valores apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 5 experimentos independentes. Todos os grupos estão normalizados pelo valor de frequência das células duplo-positivas para HLA-DR/CD11c encontrado no grupo controle (veículo), bem como, para a frequência de células negativas para o corante Live/Dead (células vivas) observado nesse grupo (A-B). Teste estatístico de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test).

diferentes tratamentos. Bem como, para a frequência de células vivas, negativas para o corante Live/Dead (Fig. 5 A-B).

#### **4.2 A ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA APÓS SINAL DE MATURAÇÃO É CAPAZ DE ALTERAR O FENÓTIPO DE MEMBRANA DE Mo-mDC**

A partir de um panorama geral, é possível constatar que os diferentes tratamentos aplicados 30 minutos após o estímulo para maturação (TNF- $\alpha$ ), foram capazes de modular quali e/ou quantitativamente o fenótipo de membrana de Mo-mDC, avaliado após 48h, levando em consideração o índice de expressão (produto da frequência pelo índice de fluorescência média (MFI) das populações positivas) das moléculas CD80, CD83, CD40, CD197 (CCR7) e/ou CD274 (PDL1) em relação ao grupo controle (veículo) (Fig. 6 A-F). Foi observado que apenas os tratamentos com ACh foram capazes de produzir uma tendência a redução estatisticamente significativa (\* $p=0,0625$ ), em comparação ao grupo controle, na expressão da maioria dos marcadores avaliados: para as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD83 nas concentrações de 25 e 100  $\mu\text{M}$ ; para CD40 na concentração de 1  $\mu\text{M}$ ; e para a molécula co-inibidora CD274, também, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

Interessantemente, enquanto os tratamentos com ACh levaram a esta tendência de redução nos índices de expressão das moléculas avaliadas, as Mo-mDC tratadas apenas com o fármaco antagonista competitivo de alta especificidade para a subunidade  $\alpha 7\text{nAChR}$ , MLA, manifestaram um padrão de igualdade, quanti- e qualitativamente, nos índices de expressão das moléculas pesquisadas. Coerentemente, os grupos que receberam, após o estímulo para maturação, ACh e concomitantemente MLA, não apresentaram para nenhuma das moléculas analisadas sequer uma tendência de diferença estatística em relação ao grupo controle (todas  $p \geq 0,1250$ ). Apesar da “redução qualitativa” observada em CD80, CD83 e CD197, só é possível notar tendência de diferença estatística ( $\#p=0,0625$ ) quando comparamos o grupo MLA 25 $\mu\text{M}$  com o grupo tratado com ACh 100 $\mu\text{M}$  + MLA 25 $\mu\text{M}$ , e isso, exclusivamente para a molécula CD80. Dessa forma, reiterando a propensão de diminuição no índice de expressão da molécula CD80 na presença do neurotransmissor ACh em Mo-mDC.

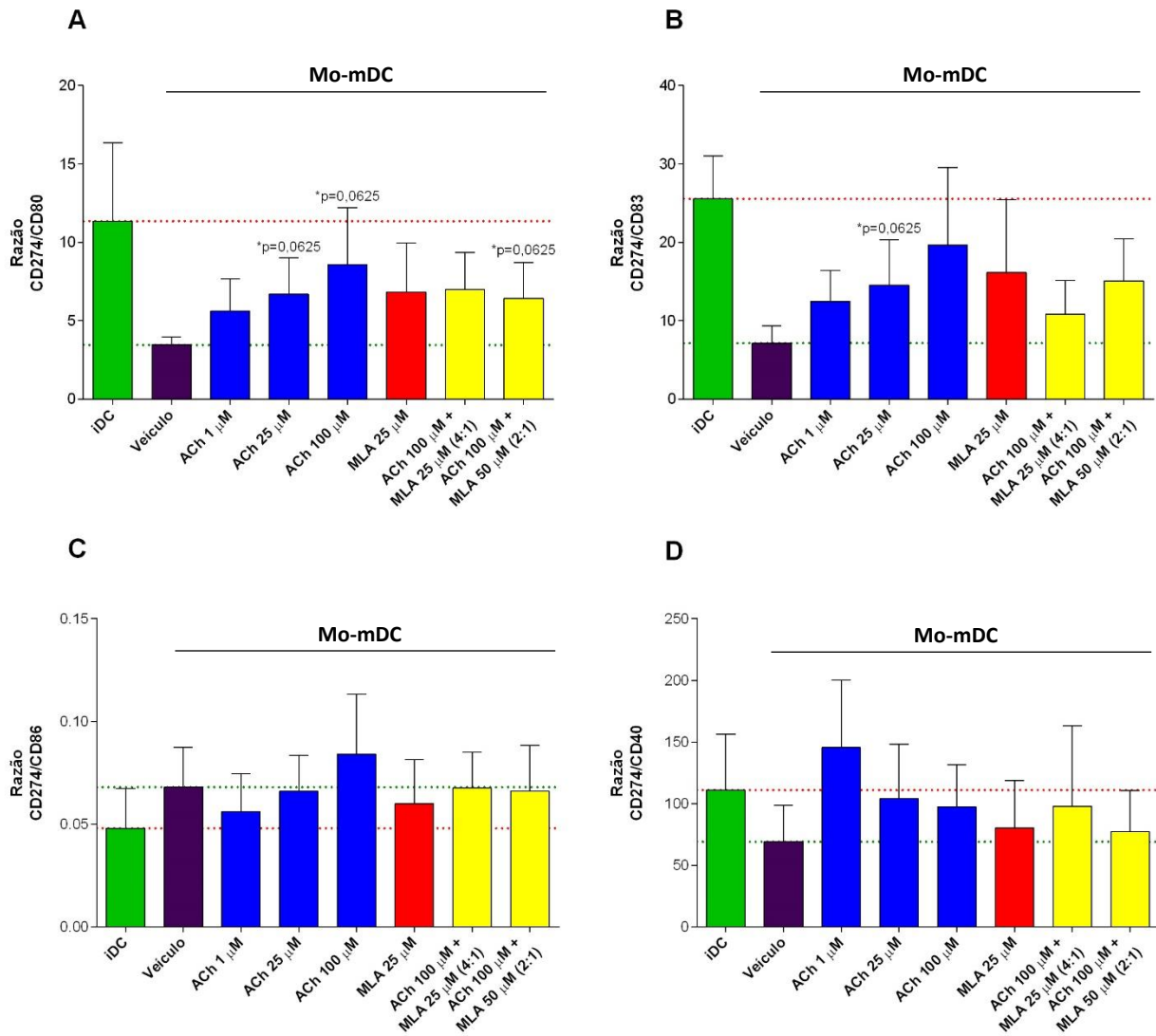


**Figura 6. Fenótipo de membrana das Mo-mDC frente a estimulação e/ou antagonismo colinérgico.** Índices de expressão das moléculas CD80, CD83, CD86, CD40, CD197 e CD274 expressos em % do controle (veículo). Desta forma, todos os grupos estão normalizados pelo valor de índice de expressão do veículo (controle), tido como 100% (A-F). Valores apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 5 experimentos independentes. (\*) indica tendência a diferença estatística significativa, sendo  $p \geq 0,05$  e  $\leq 0,07$ , em comparação ao grupo controle. (#) indica tendência a diferença estatística significativa, sendo  $p \geq 0,05$  e  $\leq 0,07$ , em relação ao grupo MLA 25  $\mu$ M. Todos os valores de p foram obtidos a partir da realização do teste estatístico de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test).

### **4.3 AS RAZÕES ENTRE O ÍNDICE DE EXPRESSÃO DE CD274 (PD-L1) E DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS ANALISADAS SUGEREM A AQUISIÇÃO DE UM PERFIL FENOTÍPICO IMUNOTOLEROGÊNICO PELAS Mo-mDC ACh-MEDIADO**

Com o cálculo das razões entre o índice de expressão da molécula co-inibidora CD274 e o índice apresentado pelas moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD83 e CD86, fica ainda mais sugestiva a aquisição de um fenótipo tolerogênico pelas Mo-mDC estimuladas com ACh, após o desafio com TNF- $\alpha$  no 5º dia de cultivo (Fig. 7 A-D). Isso porque, a tendência a diferença estatística significativa observada em termos de redução no índice de expressão das moléculas CD80 e CD83 quando comparadas ao controle, continua sendo manifestada no que tange a razão entre o índice de expressão de CD274 e CD80 para ACh a 25 e 100 $\mu$ M e ACh a 100 $\mu$ M mais MLA a 50 $\mu$ M, bem como, para CD83 no grupo tratado com ACh a 25  $\mu$ M, em comparação ao veículo (Fig. 7 A-B).

Além disso, apesar de não possuir significância ou propensão a significância estatística, é qualitativamente visível o padrão ACh-mediado e “concentração-dependente” em aumentar a razão entre o índice de expressão da molécula CD274 e o índice apresentado pelas moléculas CD80, CD83 e, até mesmo, CD86 (Fig. 7 A-C). Exibindo uma tendência qualitativa a se distanciar da razão observada no grupo controle e, no caso das moléculas CD80 (ACh 100  $\mu$ M), CD83 (ACh 100  $\mu$ M) e CD40 (ACh 1  $\mu$ M), uma propensão a se aproximar dos valores apresentados por células Mo-DC em estado funcional imaturo (grupo iDC) – linha tracejada em vermelho (Fig. 7 A, B e D). Já no que tange aos grupos tratados com MLA, simultaneamente ou não a ACh, os mesmos apresentaram valores de razão entre CD274 e CD80, 83, 86 e CD40 muito próximos entre si e, especialmente para a razão CD274/CD40, próximos ao valor do controle (veículo) (Fig. 7 D). Ainda vale destacar que ao compararmos qualitativamente o grupo ACh a 100  $\mu$ M com os grupos ACh 100  $\mu$ M + MLA a 25 ou 50  $\mu$ M, é possível sugerir um ligeiro efeito mitigador do MLA as respostas ACh-mediadas, no que tange as moléculas CD80, CD83 e CD86 (Fig. 7 A-C).

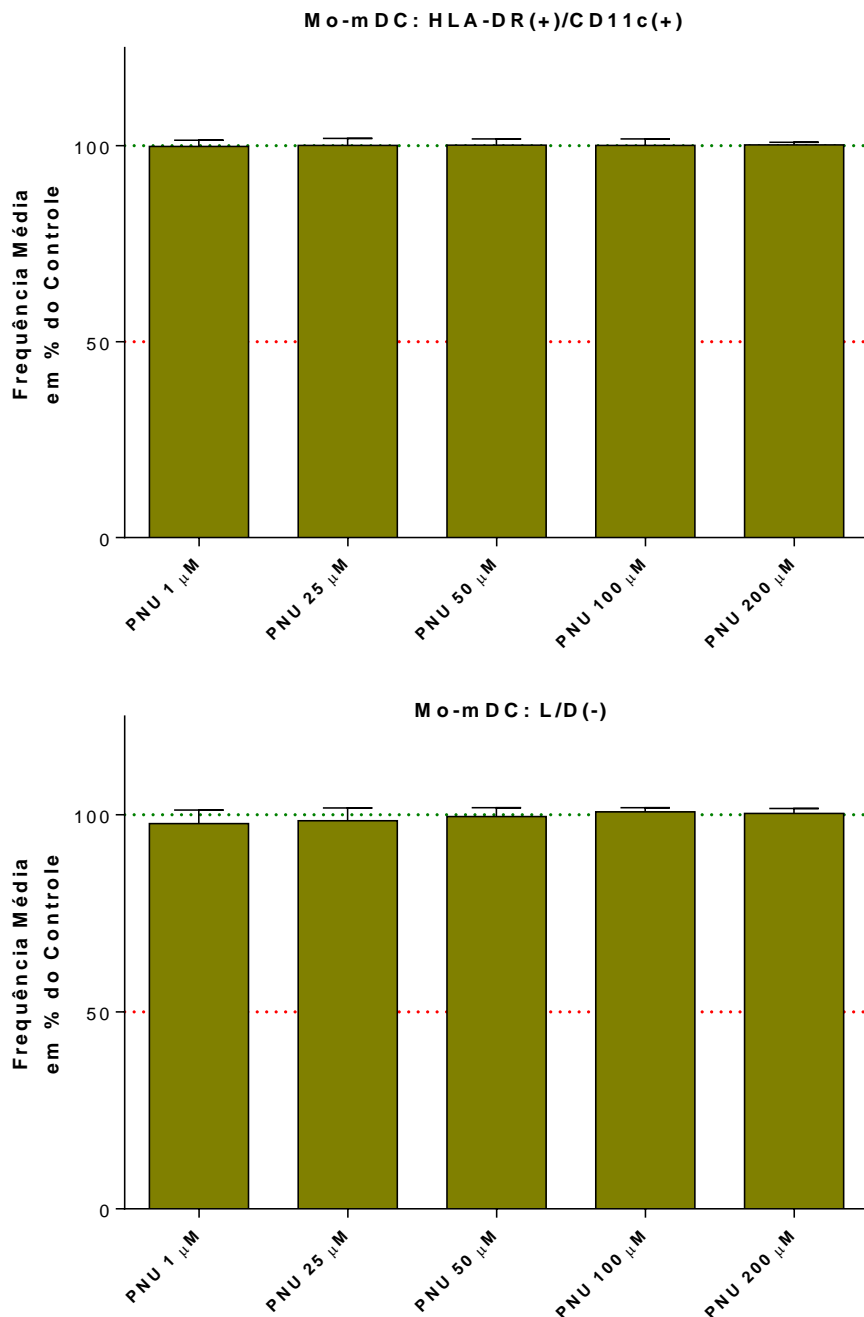


**Figura 7. Razão entre o índice de expressão da molécula co-inibidora CD274 (PD-L1) e as moléculas co-estimuladoras CD80, CD83, CD86 e CD40 frente a estimulação e/ou antagonismo colinérgico.** Valores apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 5 experimentos independentes. (\*) indica tendência a diferença estatística significativa, sendo  $p \geq 0,05$  e  $\leq 0,07$ , em comparação ao grupo controle. Todos os valores de p foram obtidos a partir da realização do teste estatístico de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test). O grupo “iDC” diz respeito as Mo-DC que no 5º dia de cultivo não receberam o estímulo inflamatório para maturação com TNF- $\alpha$  e tampouco qualquer tipo de tratamento, funcionando apenas como um controle negativo ao desafio com TNF- $\alpha$  e incluído nessa figura apenas para o estabelecimento de possíveis paralelos.



#### 4.4 O TRATAMENTO COM PNU-282987 NÃO ALTEROU A FREQUÊNCIA DE CÉLULAS Mo-mDC VIVAS E DUPLO-POSITIVAS PARA HLA-DR/CD11c

Não foi possível notar diferença estatística relevante, ou mesmo alguma tendência, em relação a frequência de células dendríticas, isto é, células duplo-positivas para os marcadores HLA-DR/CD11c, sequer para a frequência de células vivas, negativas para o corante Live/Dead (Fig. 8 A-B).



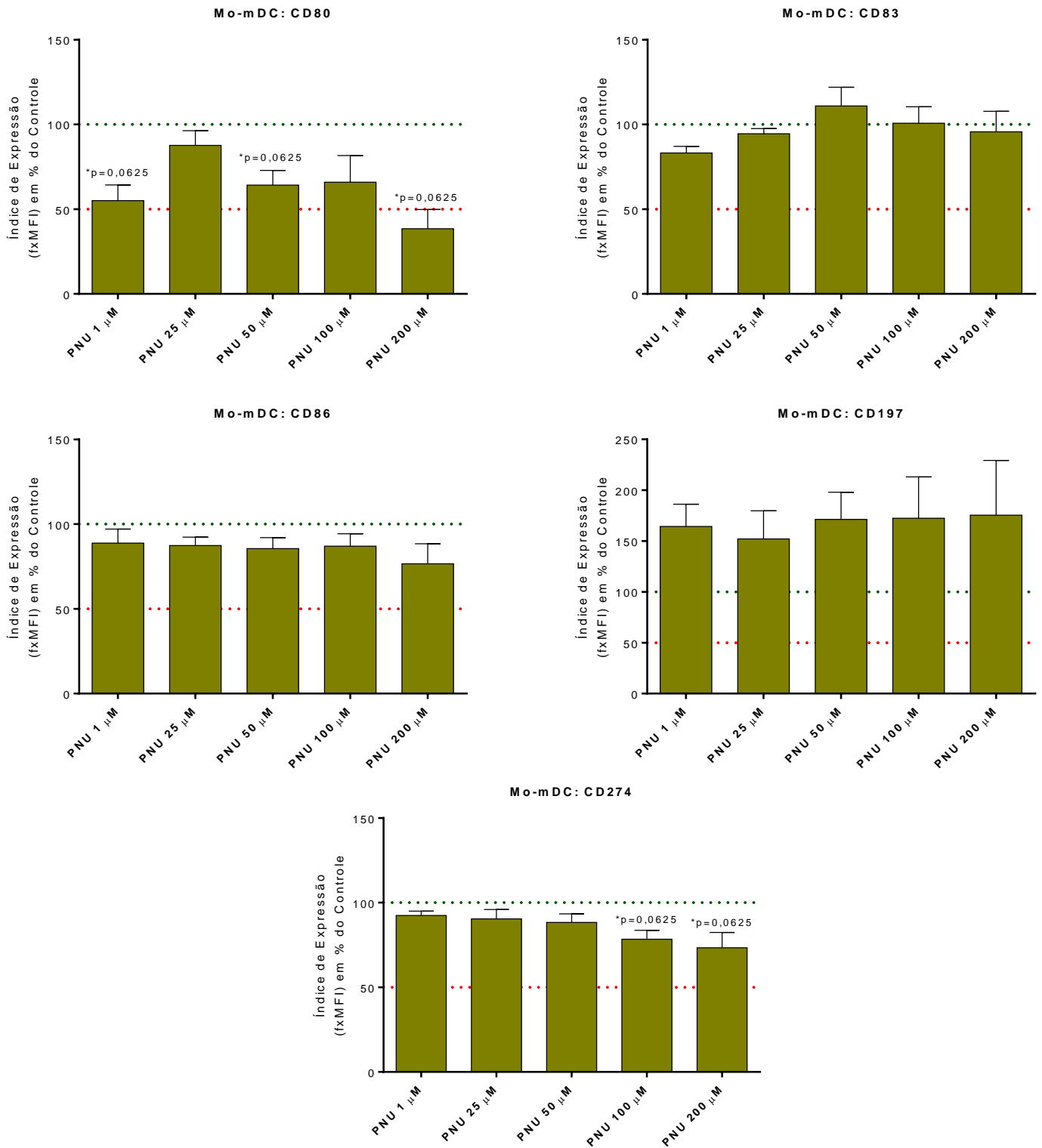
**Figura 8.** Frequência média em % do controle de células HLA-DR+/CD11c+ e vivas (L/D-) após exposição ao PNU-282987. Valores apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 6 experimentos independentes. Todos os grupos estão normalizados pelo valor de frequência das células duplo-positivas para HLA-DR/CD11c encontrado no grupo controle (veículo), bem como, para a frequência de células negativas para o corante Live/Dead (células vivas) observado nesse grupo (A-B). Teste estatístico de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test).

#### **4.5 PNU-282987, AGONISTA ESPECÍFICO DA $\alpha 7$ nAChR, TAMBÉM É CAPAZ DE MODULAR O FENÓTIPO DE MEMBRANA DE Mo-mDC**

As Mo-DC expostas ao fármaco agonista específico da  $\alpha 7$ nAChR, PNU-282987, após 30 minutos do estímulo com TNF- $\alpha$  foram moduladas quali- e/ou quantitativamente no que tange ao índice de expressão das moléculas CD80, CD197 (CCR7) e/ou CD274 (PDL1) em relação ao grupo controle (veículo) (Fig. 9 A-E). É interessante notar que os dados obtidos com relação a expressão proteica de CD80 e CD274 vão ao encontro dos resultados observados a partir da estimulação com ACh, isto é, de expressiva redução da molécula co-estimuladora CD80 (ACh 25 e 100  $\mu$ M) e ligeira redução da molécula co-inibidora CD274 (ACh 1  $\mu$ M) e, conseqüentemente, em oposição ao comportamento apresentado pelos grupos tratados com o fármaco antagonista específico da subunidade  $\alpha 7$ , MLA (Fig. 9 A e F).

Ao passo que em relação ao receptor de quimiocinas CCR7, o fenótipo de membrana apresentado pelas Mo-mDC tratadas com PNU-282987 foi, numa primeira análise, diferente do notado nas células estimuladas com ACh (Fig. 9 F e 9 E). Uma vez que, a exposição das células ao PNU-282987 promoveu um nítido aumento, qualitativo, no índice de expressão dessa molécula em comparação ao grupo controle e de maneira “concentração-independente”, afinal, todas as concentrações testadas exibiram praticamente a mesma intensidade de resposta.

Já as moléculas CD83 e CD86 parecem não ter sido influenciadas pela estimulação da subunidade  $\alpha 7$ , seja em termos quantitativos (nesse trabalho, tendência a diferença estatística) ou qualitativos. Desta forma, os resultados observados após tratamento das Mo-mDC com ACh, no que tange a expressão de CD83, poderiam ser decorrência da ligação desse neurotransmissor a outras subunidades e/ou receptores colinérgicos expressos na membrana das DC. Ou seja, a modulação colinérgica de CD83, ao que parece, é  $\alpha 7$ nAChR-independente. CD86, por sua vez, ao não apresentar diferença em seu índice de expressão em relação ao controle (Fig. 9 C), corrobora os resultados obtidos mediante o tratamento das Mo-mDC com ACh e/ou MLA (Fig. 9 C). Assim, ambos os experimentos indicam que a expressão de CD86 é, no mínimo, pouco susceptível à modulação colinérgica (dado especialmente evidente na tabela 1).

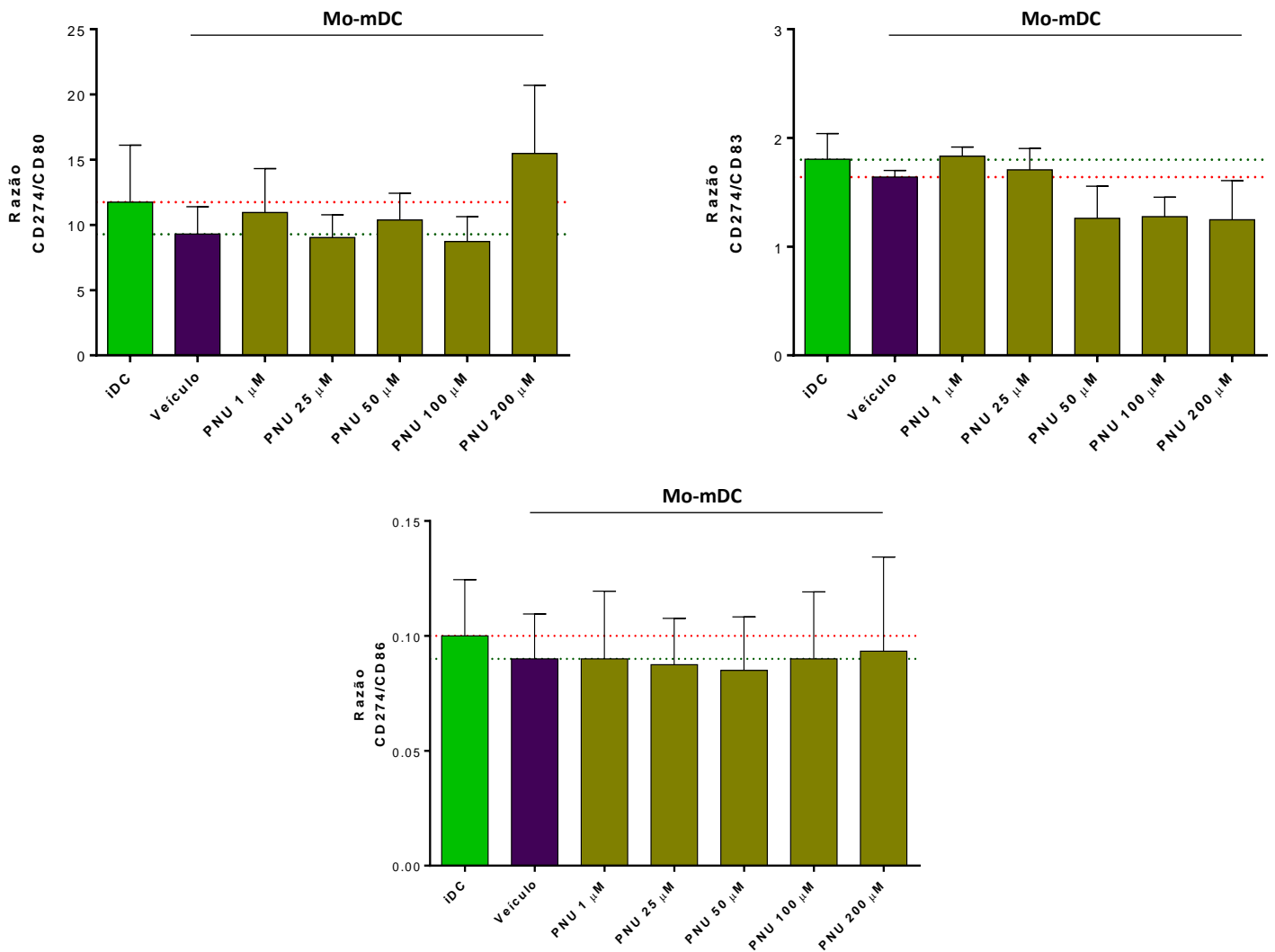


**Figura 9. Fenótipo de membrana das Mo-mDC frente a exposição ao PNU-282987.** Índices de expressão das moléculas CD80, CD83, CD86, CD197 e CD274 expressos em % do controle (veículo). Desta forma, todos os grupos estão normalizados pelo valor de índice de expressão do veículo (controle), tido como 100% (A-E). Valores apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 4 a 6 experimentos independentes. (\*) indica tendência a diferença estatística significativa, sendo  $p \geq 0,05$  e  $\leq 0,07$ , em comparação ao grupo controle. Todos os valores de p foram obtidos a partir da realização do teste estatístico de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test).

#### **4.6 AS RAZÕES ENTRE O ÍNDICE DE EXPRESSÃO DE CD274 (PD-L1) E DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS ANALISADAS SÃO POUCO MODULADAS POR PNU-282987**

Não foi possível encontrar diferença estatística, tampouco tendência relevante, para as razões entre o índice de expressão da molécula co-inibidora CD274 e o índice apresentado pelas moléculas co-estimuladoras CD80, CD83 e CD86, em relação ao grupo controle (veículo), para as Mo-mDC tratadas com PNU-282987 após estímulo para maturação com TNF- $\alpha$  (Fig. 10 A-C). Esse resultado é coerente com a observação de que o índice de expressão da molécula CD83 não foi afetado pelo tratamento com PNU-282987 (agonista específico do receptor  $\alpha 7nAChR$ ) e que a expressão de CD86 parece ser irresponsiva a modulação colinérgica de modo amplo (Fig. 10 B-C).

Em termos qualitativos, chama a atenção apenas a razão entre CD274/CD80 para o grupo tratado com 200  $\mu$ M de PNU-282987, uma vez que, esse grupo apresentou uma razão 32% maior que a obtida no grupo iDC, isto é, Mo-DC em estado funcional imaturo e, ainda, 40% superior a razão observada no grupo controle (veículo), formado por Mo-mDC sem tratamento algum (Fig. 10 A).



**Figura 10. Razão entre o índice de expressão da molécula co-inibidora CD274 (PD-L1) e as moléculas co-estimuladoras CD80, CD83 e CD86 frente a estimulação com PNU-282987.** Valores apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 5 a 6 experimentos independentes. O grupo “iDC” diz respeito às Mo-DC que no 5º dia de cultivo não receberam o estímulo inflamatório para maturação com TNF- $\alpha$  e tampouco qualquer tipo de tratamento, funcionando apenas como um controle negativo ao desafio com TNF- $\alpha$  e incluído nessa figura apenas para o estabelecimento de possíveis paralelos. Teste estatístico de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test).

#### **4.7 SOB UMA PERSPECTIVA QUALITATIVA, TAMBÉM É SUGESTIVA A AQUISIÇÃO DE UM PERFIL FENOTÍPICO IMUNOTOLEROGÊNICO POR Mo-mDC APÓS MODULAÇÃO COLINÉRGICA**

O *heat map* construído na tabela 1, permite que se avalie de modo global a influência dos moduladores colinérgicos utilizados nesse trabalho, isto é, MLA (antagonista específico da  $\alpha 7$ nAChR), ACh e PNU-282987 (agonista específico da  $\alpha 7$ nAChR) sobre o perfil de expressão das moléculas de membrana aqui estudadas. Como se pode notar, a sinalização colinérgica com ACh ou a droga PNU-282987, iniciada logo após o estímulo com TNF- $\alpha$ , reduz a expressão de moléculas associadas à maturação das Mo-DC (até 62% [PNU 200  $\mu$ M] para o índice de expressão de CD80, e em até 50% para a expressão de CD83 para o tratamento com ACh a 25  $\mu$ M).

O tratamento concomitante de ACh e MLA tende a exibir um efeito mitigador da ação da ACh, fenômeno qualitativamente proeminente para CD83 em comparação ao veículo (Tabela 1). Por outro lado, o grupo exposto apenas a MLA (25  $\mu$ M) é qualitativamente o mais próximo fenotipicamente do grupo controle (Tabela 1). Ainda sob esse prisma qualitativo, chama a atenção o aumento da expressão de CCR7 pelas Mo-mDC expostas ao fármaco PNU-282987 em comparação ao veículo (controle), sugerindo uma possível interação entre a modulação da  $\alpha 7$ nAChR e a expressão desse importante receptor de quimiocinas linfonodais.

REDUÇÃO		SEM DIFERENÇA		AUMENTO		
≤ -60	≥ -60 ~ ≤ -41	≥ -40 ~ ≤ -21	≥ -20 ~ ≤ 20	≥ 21 ~ ≤ 40	≥ 41 ~ ≤ 60	≥ 61
<b>Veículo</b>						
	CD40	CD80	CD83	CD86	CD197	CD274
<b>ACh 1 μM</b>	-41	-30	-43	6	-16	-12
<b>ACh 25 μM</b>	-24	-40	-50	-1	-27	-7
<b>ACh 100 μM</b>	-11	-40	-49	-3	-3	6
<b>MLA 25 μM</b>	-7	-20	5	14	4	1
<b>ACh 100 μM + MLA 25 μM (4:1)</b>	4	-33	-24	6	-32	-2
<b>ACh 100 μM + MLA 50 μM (2:1)</b>	14	-28	-37	8	-10	1
<b>PNU 1 μM</b>	n.a.	-45	-17	-11	64	-8
<b>PNU 25 μM</b>	n.a.	-12	-6	-13	52	-10
<b>PNU 50 μM</b>	n.a.	-36	11	-15	71	-12
<b>PNU 100 μM</b>	n.a.	-34	1	-13	72	-22
<b>PNU 200 μM</b>	n.a.	-62	-4	-23	75	-27

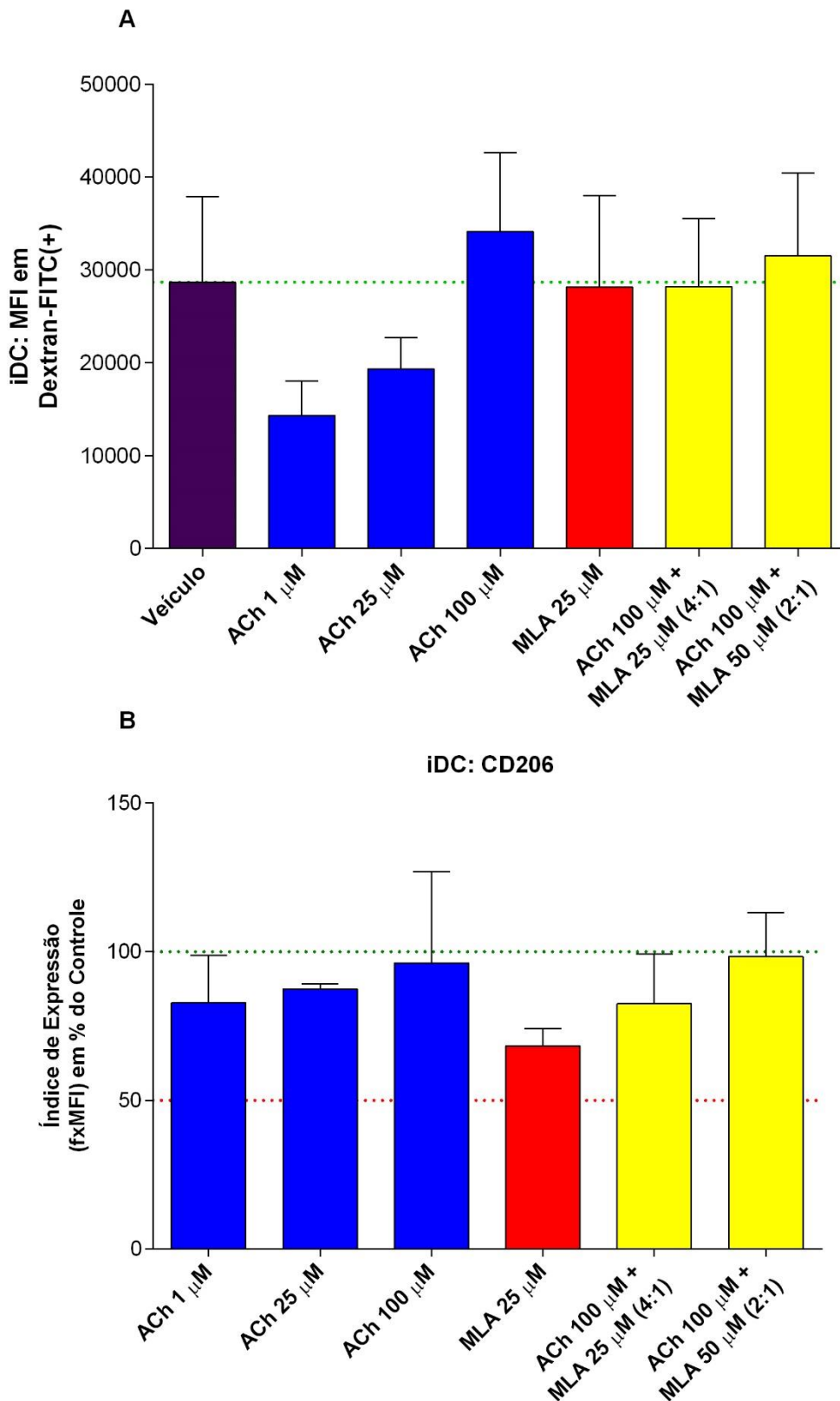
**Tabela 1. Heat map da diferença entre o índice de expressão das moléculas CD40, CD80, CD83, CD86, CD197 e CD274 obtido para cada tratamento em relação ao grupo controle.** Todos os valores apresentados estão normalizados pelo grupo controle (veículo), considerado como valor de referência (100%). Valores expressam em % a diferença média entre os tratamentos (4 a 6 experimentos independentes) e o grupo controle (veículo), para cada molécula analisada. A partir dos valores resultantes os grupos foram classificados em três categorias, sendo elas: “redução” (para os valores de diferença negativos e menores que -20%); “sem diferença” (para valores de diferença entre -20 a 20%) e “aumento” (para valores de diferença maiores que 20%). As categorias “redução” e “aumento” foram subdivididas em três níveis e lhes foram atribuídas cores indicativas da intensidade da redução ou aumento apresentado, tal como indicado na legenda. Os valores e categorias descritas possuem valor qualitativo de análise. A molécula co-estimuladora CD40 não foi analisada nos grupos tratados com PNU-282987, por esse motivo, n.a. = não aplicável.

#### **4.8 A ATIVIDADE ENDOCÍTICA DE Mo-iDC É AFETADA PELA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA E, POSSIVELMENTE, DE MANEIRA CD206 INDEPENDENTE**

Qualitativamente, foi possível notar que o tratamento de Mo-iDC com ACh 24h antes do ensaio de endocitose com Dextran-FITC, foi capaz de reduzir a atividade endocítica dessas DC imaturas nas concentrações de 1 e 25  $\mu$ M (Fig. 11 A). Na contramão dessa observação, a concentração de 100  $\mu$ M de ACh indica ser capaz de aumentar ligeiramente a atividade endocítica de Mo-iDC. Ao passo que o tratamento com MLA, concomitante ou não a ACh, tende a não apresentar diferença em relação a atividade endocítica observada no grupo controle (veículo) (Fig. 11 A).

Já no que se refere ao índice de expressão da molécula CD206, possivelmente envolvida no processo de endocitose do Dextran-FITC, à primeira vista as diferentes concentrações de ACh não foram capazes de modular relevantemente o índice de expressão dessa molécula quando comparadas entre si, bem como, em relação ao controle (Fig. 11 B). À medida que, o grupo tratado apenas com MLA, apresentou um índice de expressão de CD206 aproximadamente 32% menor em relação ao índice do controle, mesmo ambos os grupos exibindo taxas praticamente iguais de endocitose do Dextran-FITC (Fig. 11 B-A).





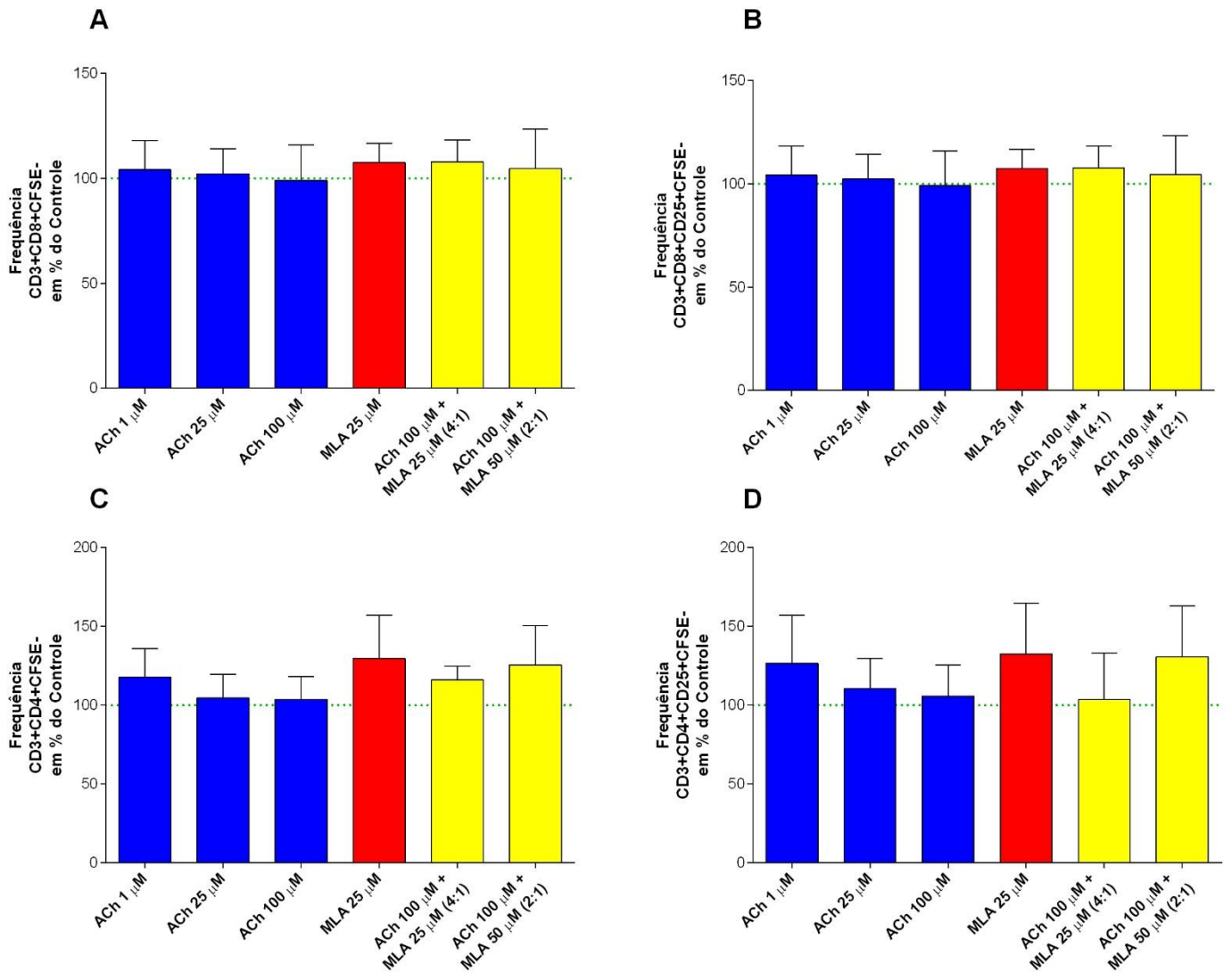
**Figura 11. Atividade endocítica e índice de expressão da molécula CD206 em Mo-iDC frente a estimulação e/ou antagonismo colinérgico.** Valores apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes. Atividade endocítica avaliada em termos da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das Mo-iDC FITC+. Índice de expressão de CD206 nas Mo-iDC expresso em % do Controle (veículo). Não foi realizado teste estatístico dado que  $N < 4$ . Análise de valor apenas qualitativo.

#### **4.9 A CAPACIDADE LINFOESTIMULADORA ALOGÊNICA DE Mo-mDC TRATADAS DURANTE A MATURAÇÃO COM ACh E/OU MLA PODE NÃO SOFRER INFLUÊNCIA COLINÉRGICA**

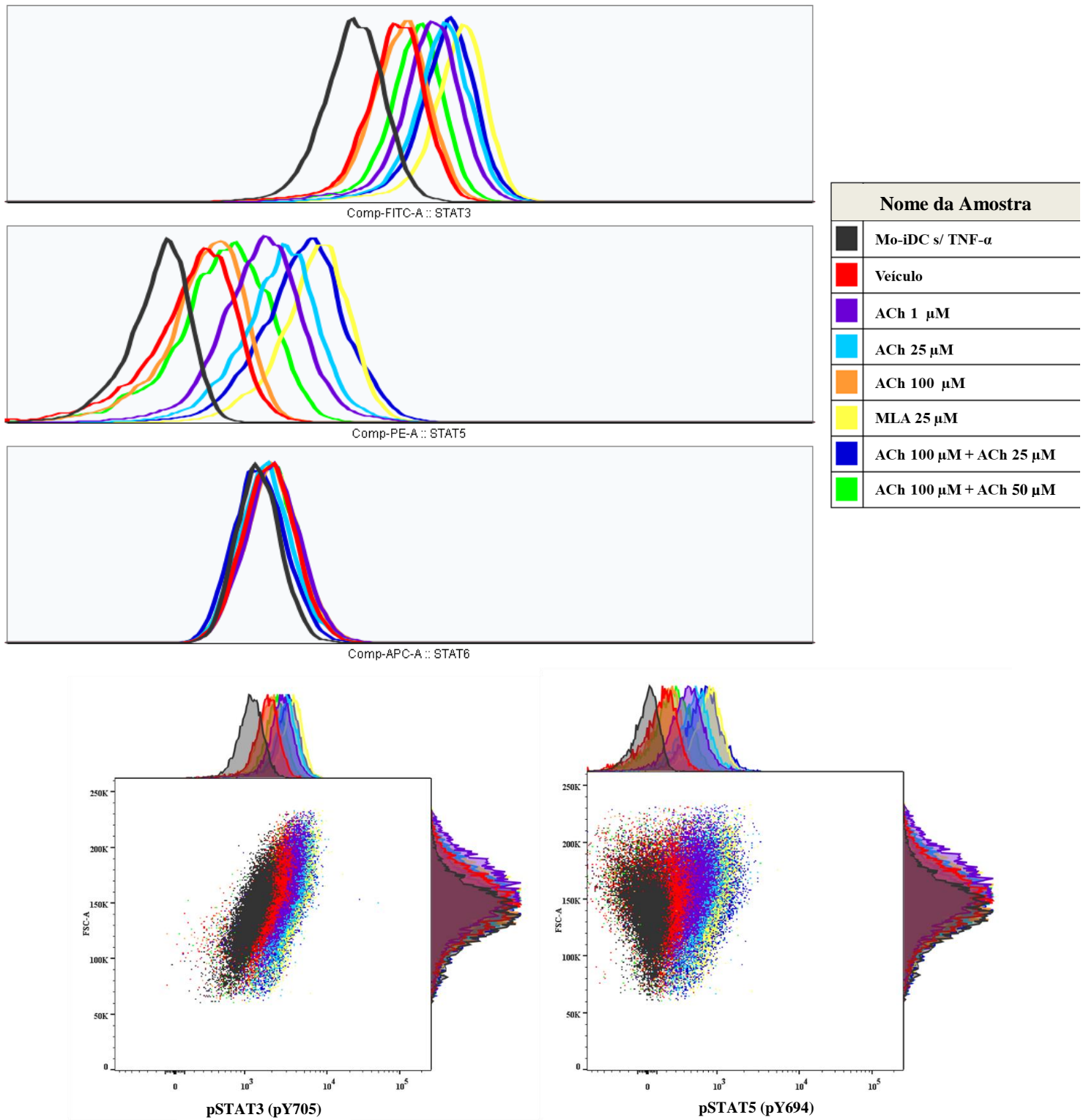
A exposição a ACh e/ou ao MLA aparentemente não é capaz de alterar a habilidade de Mo-mDC estimularem a expansão clonal seja de Linfócitos T CD3+CD8+ (medida tanto pela frequência de células CD8+, quanto CD8+CD25+) (Fig. 12 A-B). Porém Mo-mDC tratadas com ACh 1 $\mu$ M, MLA 25 $\mu$ M ou ACh 100 $\mu$ M + MLA a 25 $\mu$ M ou 50 $\mu$ M, foram mais hábeis em estimular a proliferação de células T CD3+CD4+, em comparação ao grupo controle (Fig. 12 C-D).

#### **4.10 O PRÉ-TRATAMENTO DE Mo-DC COM ACh E/OU MLA TEM POTENCIAL PARA ALTERAR OS NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DE STAT3 e STAT5, MAS NÃO DE STAT6**

Como pode ser observado na figura 6, os diferentes tratamentos (exceto o tratamento com ACh a 100 $\mu$ M) foram capazes de aumentar os níveis de fosforilação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT5, 30 minutos após o estímulo com TNF- $\alpha$  (Fig. 13). Como controle negativo do desafio com TNF- $\alpha$ , um grupo de Mo-DC não recebeu nenhum tratamento, tampouco, o estímulo com TNF- $\alpha$  e foram incluídas no ensaio. Dessa forma, evidenciando a modulação das moléculas analisadas de maneira TNF- $\alpha$ -dependente. Ao que parece, o tratamento com MLA a 25 $\mu$ M simultaneamente ou não a ACh é capaz de promover um aumento significativo, em relação ao grupo controle, nos níveis de fosforilação de STAT3 e STAT5, após desafio agudo com TNF- $\alpha$  (Fig. 13).



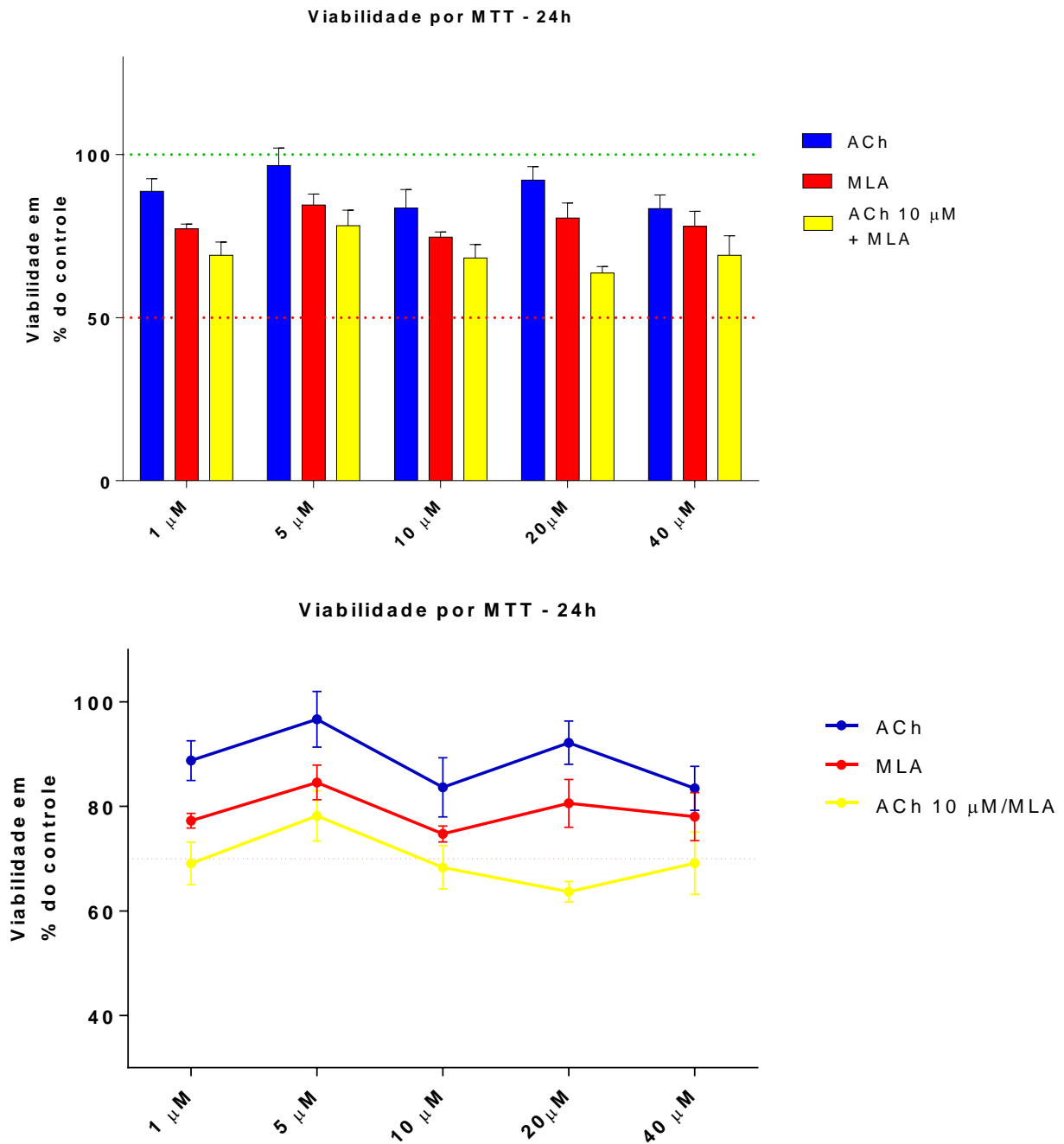
**Figura 12. Capacidade alolinfoproliferativa de Mo-mDC tratadas durante a maturação com ACh e/ou MLA.** Valores apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 3 experimentos independentes. Atividade alolinfoproliferativa das Mo-mDC avaliada em termos da frequência de células CD3+CD4+CFSE- ou CD3+CD8+CFSE-, ou seja, linfócitos TCD4+ e TCD8+ que proliferaram em resposta ao efeito alógênico e aos estímulos das Mo-mDC previamente tratadas. Frequência expressa em % do Controle (veículo). Não foi realizado teste estatístico dado que  $N < 4$ . Análise de valor apenas qualitativo.



**Figura 13. Avaliação da fosforilação de STAT3, STAT5 e STAT6 em Mo-mDC pré-tratadas com ACh e/ou MLA.** Fosforilação avaliada por citometria de fluxo em termos da frequência de células HLA-DR+CD11c+FITC+ (pSTAT3), HLA-DR+CD11c+PE+ (pSTAT5) e HLA-DR+CD11c+APC+ (pSTAT6). Não foi realizado teste estatístico dado que o experimento possui N=1. Análise de valor apenas qualitativo.

#### **4.11 A VIABILIDADE METABÓLICA DE CÉLULAS DE GBM DA LINHAGEM U87MG PODE SER REDUZIDA DE MANEIRA SIGNIFICATIVA QUANDO EXPOSTAS, CONCOMITANTEMENTE, A ACh E AO MLA**

De uma maneira geral, foi possível observar que todos os tratamentos exibiram uma certa propensão a diminuir a viabilidade celular (metabólica) em relação ao grupo controle (Fig. 14). No entanto, qualitativamente falando, é possível sugerir que a relevância desse efeito citotóxico esteja restrita aos grupos tratados com MLA, sobretudo quando conjuntamente a ACh. Uma vez que, para todas as concentrações testadas esse fenômeno biológico é repetidamente observado, especialmente para as combinações de ACh e MLA que independentemente das proporções testadas (variando de 10:1 a 1:4), apresentaram índices de viabilidade celular menores que os grupos tratados com unicamente ACh ou MLA (Fig. 14). Sendo as células de GBM expostas a 10 $\mu$ M de ACh + 20 $\mu$ M de MLA (1:2) as que exibiram a maior redução na viabilidade em relação ao grupo controle, de aproximadamente 37% (Fig. 14).

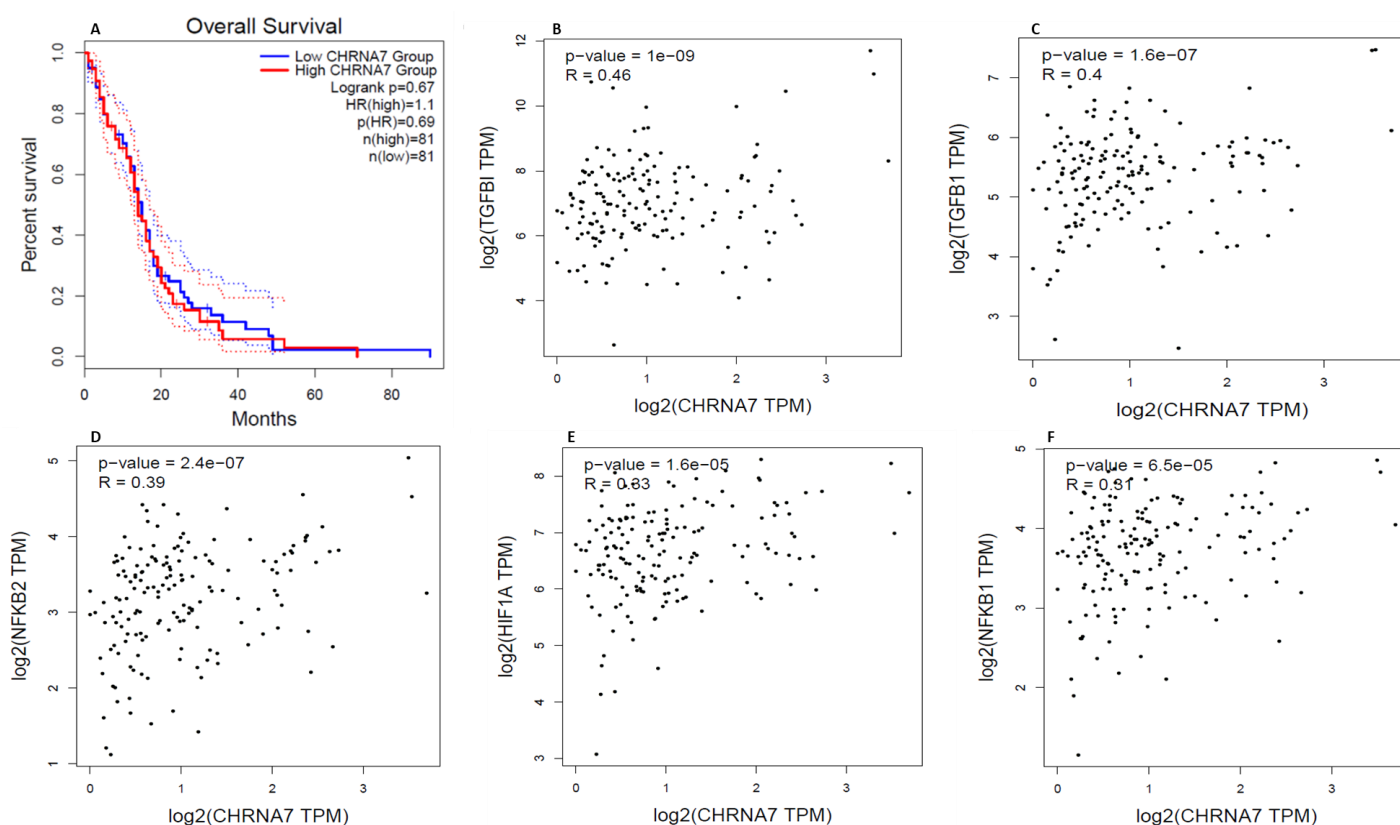


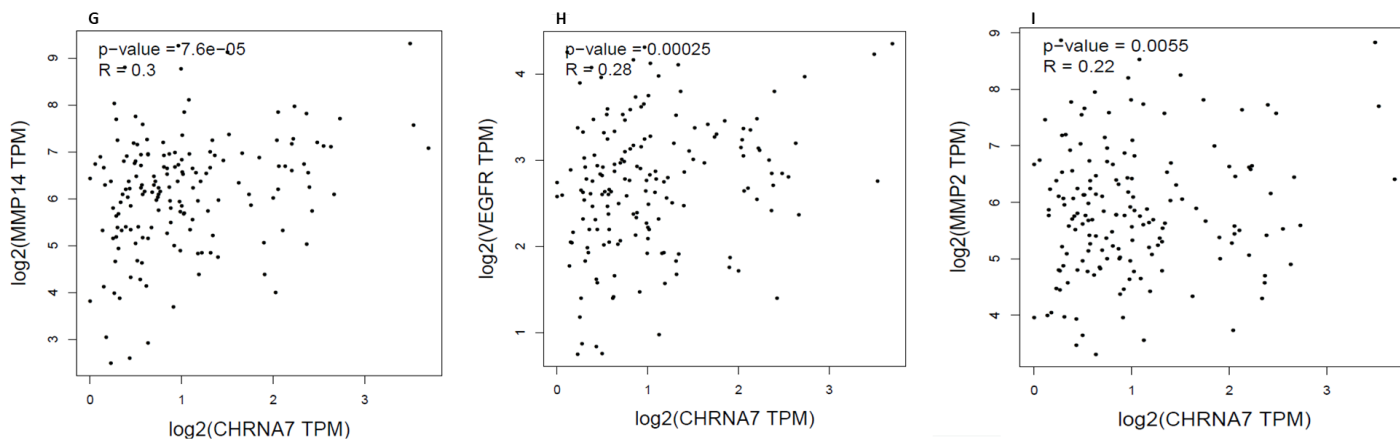
**Figura 14. Viabilidade Celular (Metabólica) por MTT em % do Controle.** Viabilidade celular medida em termos da capacidade das células em metabolizar o MTT em sal de formazan, após a exposição aos tratamentos por 24h. Valores expressos como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 1 experimento independente em triplicata. Não foi realizado teste estatístico dado que o ensaio possui N=1. Análise de valor apenas qualitativo.

## 4.12 ACHADOS IN SILICO ENDOSSAM UMA POSSÍVEL “RELEVÂNCIA COLINÉRGICA” NO CONTEXTO DO GLIOBLASTOMA

Procurando trazer o “contexto GBM” para nossos dados, bem como, objetivando estabelecer uma ponte entre os achados obtidos a partir dos experimentos *in vitro* desenvolvidos nesse trabalho com aquilo que de fato pode ocorrer na “vida real”, fizemos uso das ferramentas *web* de bioinformática GEPIA2 e TIMER para a mineração de dados de expressão gênica provenientes do banco de dados públicos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). A “mineração” de dados teve como “guia” os resultados obtidos experimentalmente.

Utilizando a ferramenta *web* de bioinformática GEPIA2, foi possível obter os resultados descritos nas figuras 15 e 16. A expressão da  $\alpha 7nAChR$  em GBM não é um fator preditivo de sobrevivência, uma vez que, a alta ou baixa expressão gênica desta subunidade não produz índices de sobrevida com diferença estatística significativa pelo teste de Logrank (Fig. 15 A). Apesar disto, a expressão da  $\alpha 7nAChR$  em amostras de GBM correlaciona-se positivamente de maneira estatisticamente relevante com a expressão de algumas moléculas sabidamente envolvidas com a gênese, progressão e/ou recidiva do tumor (PULIYAPPADAMBA *et al.*, 2014; PEARSON; REGAD, 2017; PRIDHAM *et al.*, 2017; LO DICO *et al.*, 2018; PAN *et al.*, 2018; CHAO *et al.*, 2021; ULASOV *et al.*, 2013), nomeadamente: TGF $\beta$ i (Fig. 15 B), TGF $\beta$ 1 (Fig. 15 C), NF- $\kappa$ B2 (p52) (Fig. 15 D), HIF-1 $\alpha$  (Fig. 15 E), NF- $\kappa$ B1 (P50) (Fig. 15 F), MMP14 (Fig. 15 G), VEGFR (Fig. 15 H) e MMP2 (Fig. 15 I). É importante dizer que esses resultados dizem respeito ao GBM de uma maneira geral, dessa forma, essas correlações observadas podem ser mais fortes ou fracas a depender do perfil molecular do GBM apresentado.



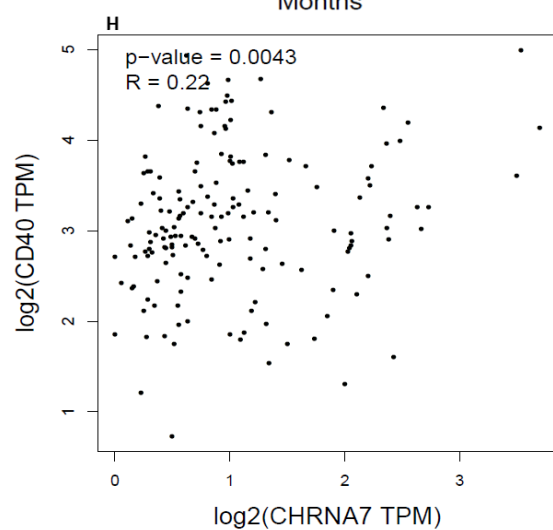
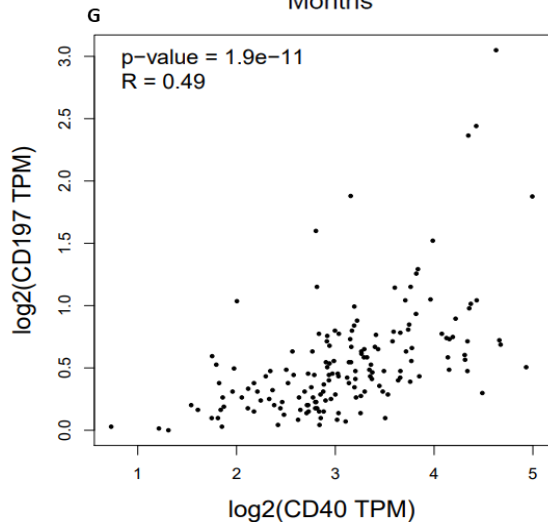
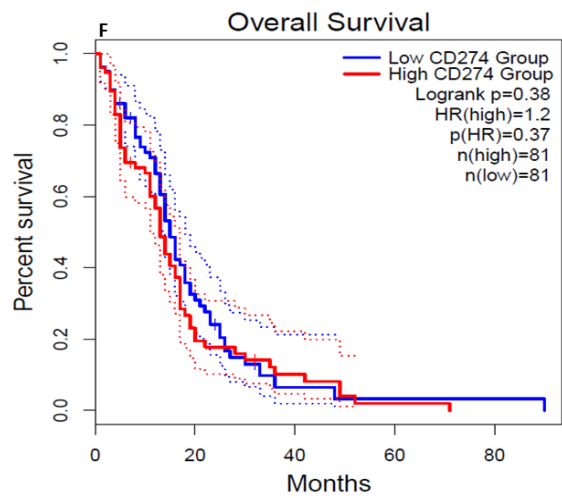
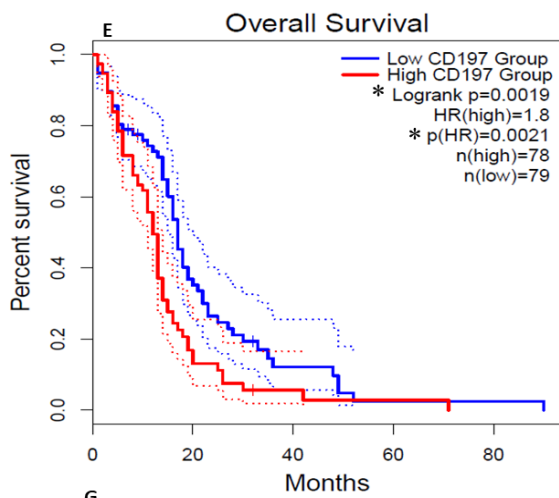
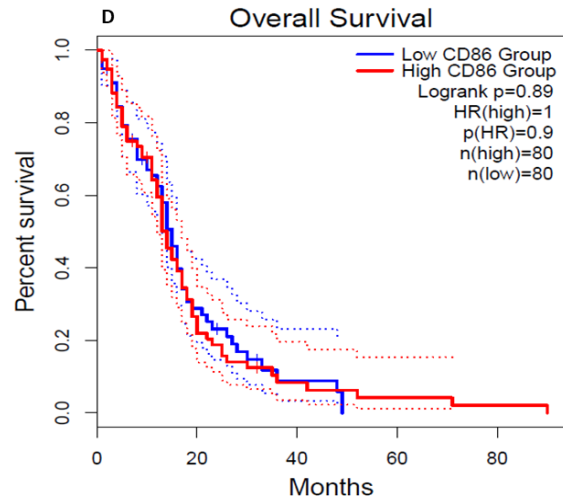
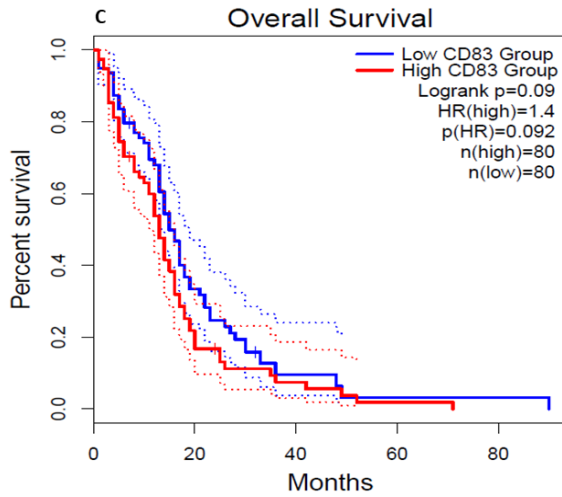
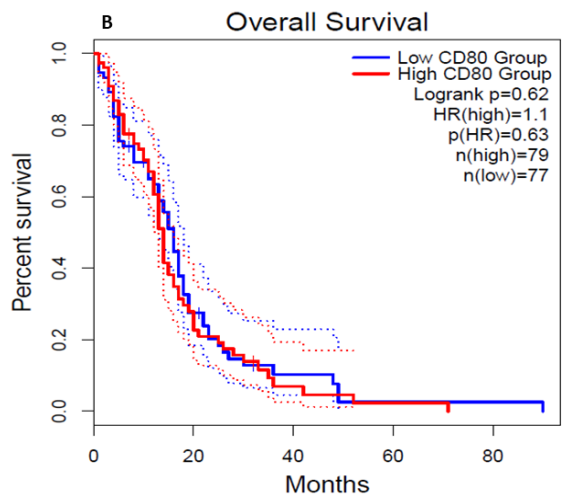
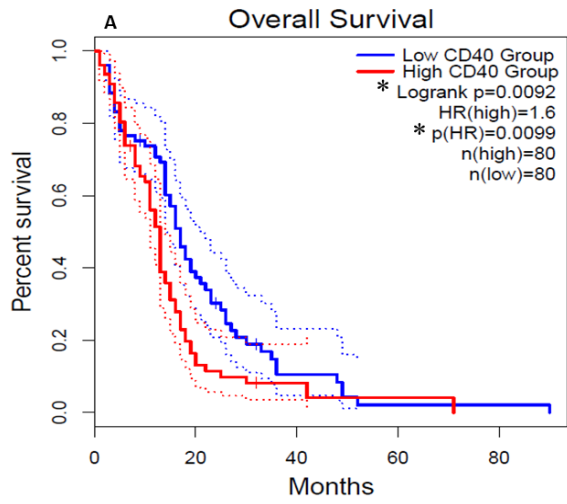


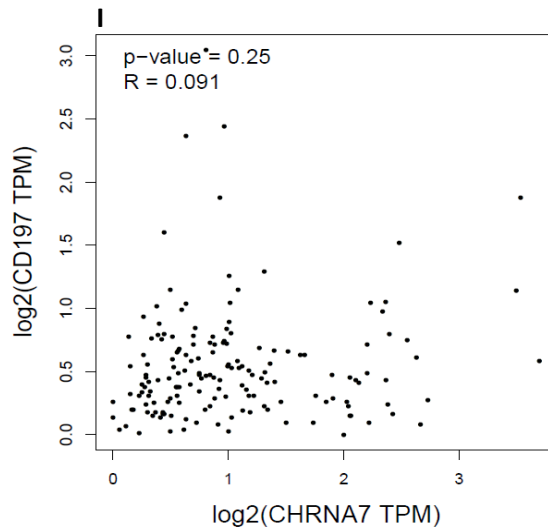
**Figura 15. Expressão gênica da  $\alpha 7$ nAChR no glioblastoma.** Índice de sobrevida a partir da expressão gênica da  $\alpha 7$ nAChR (A). Sobrevida analisada por gráfico de Kaplan Meier com teste de Logrank e modelo de riscos proporcionais de Cox. Linha vermelha corresponde a alta expressão e linha azul a baixa expressão da molécula em questão. Correlação entre a expressão gênica da  $\alpha 7$ nAChR e outras moléculas descritas como envolvidas na gênese e/ou desenvolvimento do GBM (B-I). Coeficiente de correlação de Pearson. Diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ . *Overall survival*, Sobrevida global. *Percent survival*, Porcentagem de sobrevivência. Onde 1.0 = 100%. *Months*, meses.

Buscando estabelecer possíveis paralelos entre os nossos achados no que tange aos resultados envolvendo Mo-DC com dados clínicos, analisamos a expressão gênica diferencial das moléculas CD40, CD80, CD83, CD86, CD197 e CD274. A alta expressão gênica de CD40 e CD197 (CCR7) em GBM são fatores de prognóstico ruim para a doença. Uma vez que, a elevada expressão (*high group*) de CD40 proporciona um aumento no risco de morte de 1,6x ( $p=0.0099$ ) em comparação ao grupo com baixa expressão dessa molécula (*low group*) e, por sua vez, CD197 um risco de morte 1,8x ( $p=0.0021$ ) maior em comparação àqueles que apresentam baixa expressão gênica desse receptor (Fig. 16 A e E). A alta expressão gênica das moléculas co-estimuladoras CD80, CD83, CD86, bem como da molécula co-inibidora CD274, não repercutem no índice de sobrevida global de pacientes com GBM.

Interessantemente, foi possível encontrar correlação positiva entre a expressão de CD40 e CD197 ( $p=1.9e-11$ ;  $R=0.49$ ) em amostras de GBM (Fig. 16 G e H). Ao realizarmos a correlação entre a expressão da  $\alpha 7$ nAChR com os preditores aqui descritos, foi possível obter uma correlação de Pearson positiva ( $p=0.0043$ ;  $R=0.22$ ) entre a expressão de  $\alpha 7$ nAChR e CD40. Não há correlação entre a expressão gênica da  $\alpha 7$ nAChR e o receptor de quimiocinas CCR7 (CD197) em amostras de GBM (Fig. 16 G e H).







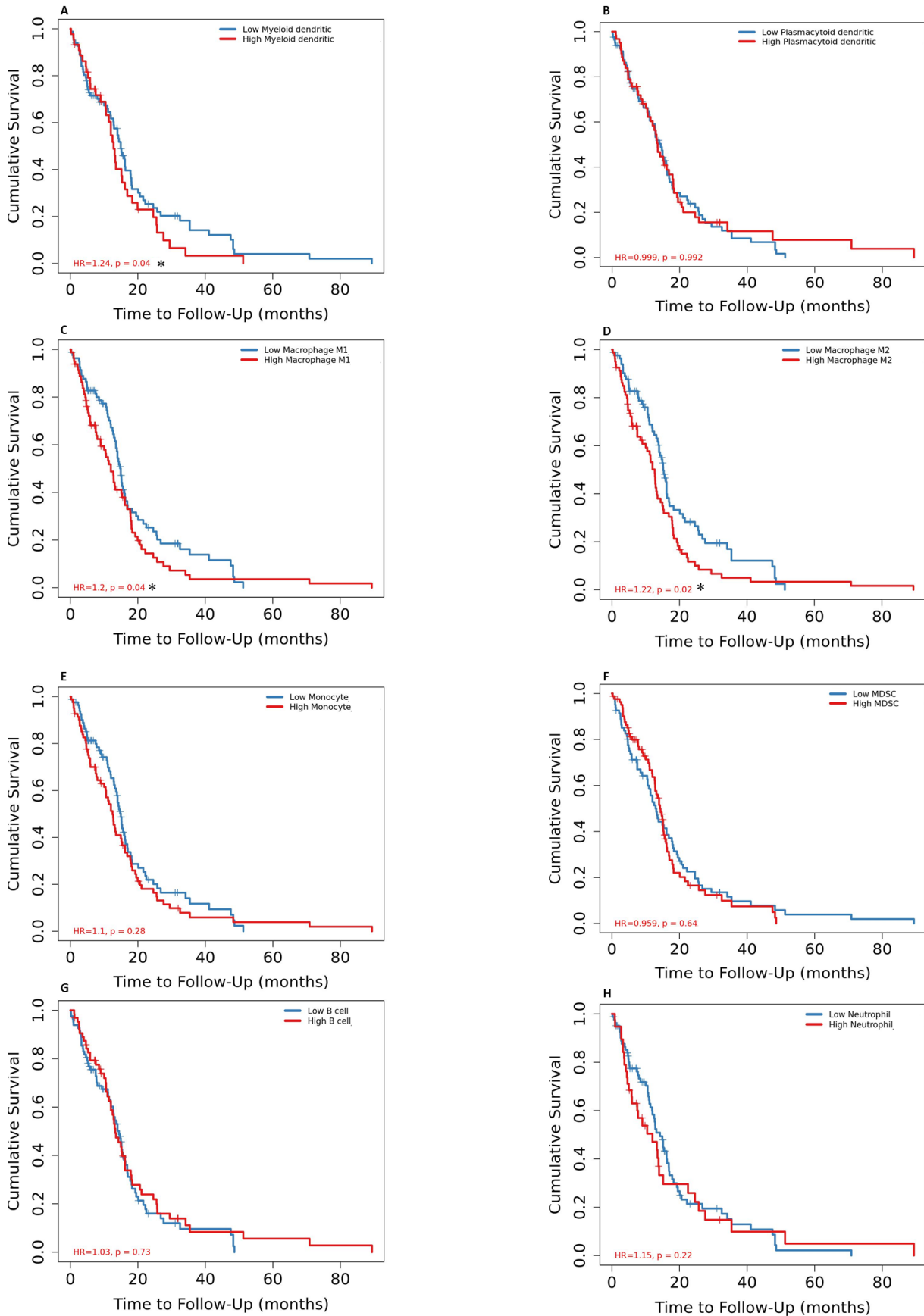
**Figura 16. Expressão gênica diferencial das moléculas CD40, CD80, CD83, CD86, CD197 e CD274 em biópsias de GBM.** Índice de sobrevida a partir da expressão gênica de CD40 (A), CD80 (B), CD83 (C), CD86 (D), CD197 (E) e CD274 (F). Sobrevida analisada por gráfico de Kaplan Meier com teste de Logrank e modelo de riscos proporcionais de Cox. Linha vermelha corresponde a alta expressão e linha azul a baixa expressão da molécula em questão. Correlação entre a expressão gênica de CD40 e CD197 (G). Correlação entre a expressão gênica da  $\alpha 7nAChR$  e CD40 (H) e CD197 (I). Coeficientes de correlação de Pearson. Diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ . *Overall survival*, Sobrevida global. *Percent survival*, Porcentagem de sobrevivência. Onde 1.0 = 100%. *Months*, meses.

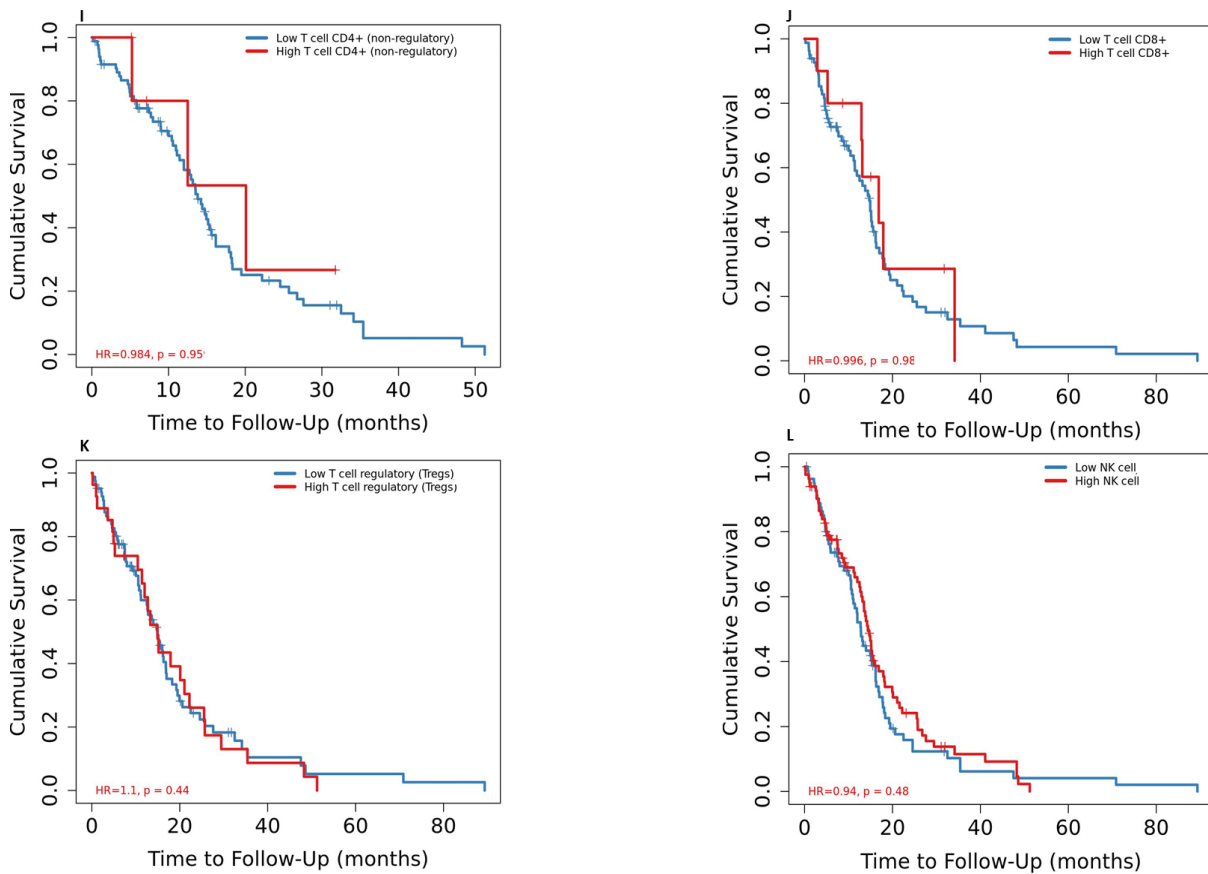
Motivados pelo resultado da expressão diferencial das moléculas CD40 e CD197 e sua relação com o índice de sobrevida global dos pacientes, bem como, tendo em mente a contribuição do infiltrado imunológico em tumores sólidos, tal como o GBM, para a “aceitação” ou “rejeição” local e sistêmica das células neoplásicas e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença. Investigamos, dispondo da plataforma TIMER, se o enriquecimento com assinaturas gênicas das principais células do sistema imune infiltrantes no microambiente do GBM (DAPASH *et al.*, 2021) poderia impactar de alguma forma no índice de sobrevida global dos pacientes.

Foram pesquisadas as assinaturas gênicas correspondentes as: i) células dendríticas mieloides (Fig. 10 A); ii) células dendríticas plasmocitoides (Fig. 10 B); iii) macrófagos M1 (Fig. 10 C); iv) macrófagos M2 (Fig. 10 D); v) monócitos (Fig. 10 E); vi) células supressoras mieloides (Fig. 10 F); vii) linfócitos B (Fig. 10 G); viii) neutrófilos (Fig. 10 H); ix) linfócitos TCD4+ (Fig. 10 I); x) linfócitos TCD8+ (Fig. 10 J); xi) linfócitos T regulatórios (Fig. 10 K) e xii) células NK (Fig. 10 L).

Dentre essas populações analisadas, o enriquecimento do microambiente tumoral do GBM com assinaturas gênicas correspondentes às células dendríticas mieloides, macrófagos M1 e/ou macrófagos M2 proporciona um prognóstico desfavorável, estatisticamente significativo, aumentando o risco de morte em 24% (HR=1,24;  $p=0.04$ ), 20% (HR=1,2;  $p=0.04$ ) e 22% (HR=1,22;  $p=0.02$ ), respectivamente, em comparação aos pacientes que apresentam uma baixa presença dessas assinaturas em suas biópsias (Fig. 17 A, C e D). Dessa forma, a conjunção do enriquecimento por esses marcadores pode representar um prognóstico consideravelmente desfavorável aos pacientes que

os possuem. Vale ressaltar, que todos os dados aqui apresentados são oriundos de banco de dados de expressão gênica (TCGA), sendo assim, possuindo limitações e demandas inerentes para a validação destas observações.





**Figura 17. Assinaturas gênicas diferenciais das principais células do sistema imune infiltrantes no microambiente do GBM e índice de sobrevida dos pacientes.** Assinaturas gênicas correspondentes as: células dendríticas mieloides (A); células dendríticas plasmocitoides (B); macrófagos M1; macrófagos M2 (D); monócitos (E); células supressoras mieloides (F); linfócitos B (G); neutrófilos (H); linfócitos TCD4+ (I); linfócitos TCD8+ (J); linfócitos T regulatórios (K) e células NK (L). Sobrevida analisada por gráfico de Kaplan Meier com teste de Logrank e modelo de riscos proporcionais de Cox. Linha vermelha corresponde a alta expressão e linha azul a baixa expressão das assinaturas em questão. Diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ . *Cumulative Survival*, Sobrevivência cumulativa. *Time to follow-up (months)*, Tempo de acompanhamento (meses).

## 5. DISCUSSÃO

O principal objetivo desse projeto de pesquisa foi fornecer subsídios experimentais iniciais para a investigação da hipótese de que a produção de ACh no microambiente do GBM pode contribuir tanto para a modulação da resposta imune local, facilitando a evasão tumoral ao sistema imune, quanto para a biologia dessa neoplasia favorecendo a proliferação/sobrevivência das células tumorais, através da sinalização pela subunidade  $\alpha 7$ nAChR do receptor de ACh. Dessa forma, o modo que buscamos para testar essa hipótese foi, inicial e principalmente, testando os efeitos da ACh, do agonista (PNU 282987) e antagonista (MLA) específicos da  $\alpha 7$ nAChR em Mo-DC e, em um experimento piloto, os efeitos da ACh e/ou MLA sobre a viabilidade mitocondrial de células de GBM humano (linhagem U87MG). Em posse desses resultados, buscamos possíveis correlatos clínicos *in silico* através da mineração de dados públicos de expressão gênica em amostras de pacientes com GBM, utilizando ferramentas *web* de bioinformática.

Esses esforços, fazendo coro ao crescente interesse em estudar interações neuroimunes em oncologia (MANCUSI *et al.*, 2023), visaram abrir caminhos para a investigação da possível relevância da subunidade  $\alpha 7$ nAChR no contexto do GBM. Além do mais, caso se viesse a confirmar a participação desta molécula na biologia do GBM, seria possível considerá-la um potencial novo alvo terapêutico, principalmente, de maneira conjunta a imunoterapia.

Como já introduzido, diversos achados reportados na literatura dão substrato para os diferentes aspectos que compõem a nossa hipótese, desde: (1) o envolvimento e crescente caracterização da  $\alpha 7$ nAChR com respostas imunossupressoras locais e/ou sistêmicas nos mais diferentes contextos fisiopatológicos, de artrite reumatoide a esquizofrenia (PAVLOV; TRACEY, 2012; LEE; VAZQUEZ, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2015; CORSI-ZUELLI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018), sendo capaz de promover respostas tolerogênicas ao alterar as funções de DC, macrófagos, micróglia e demais células do sistema imune (JONGE; ULLOA, 2009; WANG *et al.*, 2010; ZDANOWSKI *et al.*, 2015; ST-PIERRE *et al.*, 2016; LIU-DI. *et al.*, 2018); a (2) descrição de respostas pró-tumorais  $\alpha 7$ nAChR-mediadas em diferentes tipos de neoplasias (SCHULLER, 2007; LIN *et al.*, 2012; MEDJBER *et al.*, 2015; WANG; HU, 2018); como (3) observações epidemiológicas que sugerem um possível efeito protetor ao aparecimento e/ou migração de células do GBM para áreas do SNC que expressam menores níveis de receptores nicotínicos (PATERSON; NORDBERG, 2000; TOYOHARA *et al.*, 2010; TAMIMI; JUWEID, 2017; MUGHAL *et al.*, 2018; PERRIN *et al.*, 2019).

Isso posto, os resultados aqui descritos ainda não permitem comprovar o envolvimento direto da  $\alpha 7$ nAChR, seja no que tange aos resultados obtidos em termos das alterações fenotípicas (Fig. 5-

10) e funcionais (Fig. 11-12) apresentadas pelas Mo-DC ou pelo potencial efeito citotóxico (metabólico) exibido por células de GBM tratadas com ACh e MLA (Fig. 11). No entanto, de antemão é possível afirmar que a modulação colinérgica com PNU-282987, ACh e/ou MLA pode alterar o comportamento dessas células de maneira relevante em comparação aos seus controles. E para além disso, que nossos resultados muito embora limitados estão alinhados a um corpo de evidências depositadas na literatura - aqui já supracitadas - que demonstram os efeitos imunossupressores associados a agonistas nicotínicos, do mesmo modo, para a reversão desses efeitos a partir da utilização de fármacos antagonistas desses receptores (Tabela 1).

Em nossas mãos, isso fica mais palpável quando olhamos para os resultados tocantes as alterações fenotípicas apresentadas por Mo-mDC, com tendência a diferença estatística significativas, apenas de modo ACh ou  $\alpha 7$ nAChR-mediado. Isto é, a capacidade da ACh de causar uma redução de 40% no índice de expressão da molécula CD80 nas concentrações de 25 e 100  $\mu$ M ( $p=0,0625$ ). É ainda interessante notar a redução de 13% na expressão desta molécula ao compararmos o grupo ACh 100  $\mu$ M + MLA 25  $\mu$ M com o grupo tratado apenas com MLA a 25 $\mu$ M ( $p=0,0625$ ). Além do mais, os efeitos da ACh sobre a expressão desta molécula co-estimuladora parecem ser dependentes – ou ao menos bastante relacionados à subunidade  $\alpha 7$ nAChR do receptor, uma vez que observamos reduções de 45% (PNU 1  $\mu$ M), 36% (PNU 50  $\mu$ M) e 62% (PNU 200  $\mu$ M) na expressão de C80 nos experimentos conduzidos com o fármaco agonista específico da subunidade, PNU-282987.

Com tendências semelhantes de redução de expressão quando sob efeito da ACh apareceram as moléculas também co-estimuladoras, CD83 e CD40. CD83 com redução de aproximadamente 50% na expressão de CD83 nas concentrações de 25 e 100  $\mu$ M ( $p=0,0625$ ) e CD40 com redução de 40% com 1 $\mu$ M de ACh ( $p=0,0625$ ).

Procurando inferir sobre o significado biológico das reduções constatadas na expressão dessas importantes moléculas co-estimuladoras e quão relevante essas diminuições se mantinham ao compararmos ao índice de expressão da molécula co-inibidora CD274, ou seja, qual seria o “efeito líquido” dessas alterações, analisamos a razão entre CD274 por CD40, CD80, CD83 e CD86. Corroborando as reduções expressas por CD40, CD80 e CD83, foi possível observar um aumento de 6,7, 8,5 e 6,4 vezes na razão entre o índice de expressão de CD274 (PD-L1)/CD80 para os grupos de Mo-mDC tratadas com ACh 25 $\mu$ M, ACh 100 $\mu$ M e ACh 100 $\mu$ M + 50 $\mu$ M de MLA (Fig. 7), respectivamente. E apresentando todos os grupos um valor  $p=0,0625$  em comparação ao controle (veículo), que apresentou uma razão de 3,4 para as moléculas em questão. Ou seja, no mínimo duas vezes menor que a razão apresentada pelos grupos tratados com ACh citados. Isso também é verdade

para razão entre CD274/CD83, que na concentração de 25 $\mu$ M de ACh apresentou um índice 2 vezes maior ( $p=0,0625$ ) que o do controle.

Os resultados analisados em termos da razão entre CD274 (PD-L1), clássica molécula co-inibidora da resposta imune por, igualmente fundamentais para a sinapse imunológica, as moléculas co-estimuladoras aqui analisadas, *i. e.*, CD40, CD80, CD83 e CD86 (GREWAL *et al.*, 1996; KRUSE *et al.*, 2000; COLLINS *et al.*, 2002), permitem enriquecer nossas análises por dois principais motivos. Primeiro, pois por essa ótica é razoável concluir que há um papel imunodepressor concentração-reposta associado a exposição de DC a ACh em termos da razão entre CD274/CD80, 83 e, até mesmo, CD86. E, em segundo lugar, a redução no índice de expressão de CD274 nos grupos tratados com ACh a 1 $\mu$ M e 25 $\mu$ M (Fig. 7 F), com propensão a significância estatística, pode biologicamente não ser muito relevante, especialmente para a concentração de 25 $\mu$ M.

No que tange a razão CD274/CD86 para o grupo tratado com ACh a 100  $\mu$ M (Fig. 7 C), apesar de unicamente qualitativo o aumento de 23% observado, em conjunto com as demais constatações até o momento relatadas nesse trabalho, fortalece a hipótese de que as Mo-mDC expostas a ACh adquirem um fenótipo e plausível função imunotolerogênica.

Já para as Mo-mDC expostas ao PNU-282987 após estímulo inflamatório com TNF- $\alpha$ , olhar em termos da razão entre CD274 e as moléculas co-estimuladoras CD80, CD83 e CD86, sugere que os efeitos observados no fenótipo de membrana e função das Mo-DC expostas a ACh podem ser para além da participação da  $\alpha 7nAChR$ . Isso porque, diferentemente das células tratadas com ACh, não foi possível observar tendência a diferença estatística significativa para nenhuma das concentrações de PNU, tampouco, moléculas aqui estudadas. Mesmo em termos qualitativos, com exceção do grupo PNU 200  $\mu$ M, esse parâmetro parece ser relevantemente alterado em comparação ao seu controle (veículo).

A partir desses nossos achados é possível estabelecer um paralelo interessante com os resultados observados por LIU-Di *et al.* (2018) que constatou, por citometria de fluxo, redução na expressão de CD80 e MHC-II em Mo-iDC murinas, após utilização de um fármaco agonista específico da  $\alpha 7nAChR$  - GTS-21 - durante a diferenciação das Mo-DC. Efeito esse, revertido com a utilização do fármaco MLA em uma concentração de 10 $\mu$ M e numa proporção de 1:1 com o GTS-21. No entanto, os autores não conseguiram observar esse fenômeno quando aplicaram o GTS-21 apenas durante o processo de maturação das Mo-mDC. A utilização de lipopolissacarídeo (LPS) como sinal maturador, bem como, o fato de que os autores trabalharam com 24 horas de intervalo para a maturação, pode explicar a divergência com nossos dados, dado que os autores não constataram modulação de CD80 através da estimulação da  $\alpha 7nAChR$  apenas durante o período de maturação das

Mo-mDC. Apesar das discrepâncias, nossos resultados e os obtidos por LIU-Di *et al.* (2018) indicam que parece existir modulação de CD80 de forma colinérgica-mediada. O fato de que esta modulação ocorreu em modelo murino (LIU-Di *et al.*, 2018) e, em nossas mãos, com células humanas e após diferentes estímulos de maturação para as DC (LPS e TNF-alfa respectivamente), sugere que tal fenômeno possa ter real relevância biológica.

Objetivando determinar se o bloqueio da  $\alpha 7nAChR$  seria capaz de interferir nos efeitos mediados pela ACh e, com isso, eleger essa subunidade como alvo para controlar as ações da ACh nas Mo-mDC, tratamos as células com MLA, fármaco antagonista específico da  $\alpha 7nAChR$ , concomitantemente ou não a ACh. A partir desse desenho experimental, é possível sugerir certo efeito restaurador em comparação ao grupo controle, tanto em termos do índice de expressão das moléculas co-estimuladoras analisadas como para a razão entre CD274/CD40, 80, 83 e 86. Isso pois, não foi possível encontrar ao menos tendência a diferença estatística relevante quando realizamos a comparação entre o grupo controle e os grupos que receberam MLA, com exceção para o grupo tratado com ACh a 100 $\mu$ M + MLA 25 $\mu$ M, o qual, a razão entre CD274/CD80 é quase 2 vezes maior que a razão apresentada pelo veículo e possui tendência a significância estatística (Fig. 7 A).

Além do mais, apesar de não possuir relevância quantitativa, quando comparamos de modo geral os grupos tratados com ACh a 100 $\mu$ M com os grupos expostos a ACh 100 $\mu$ M + MLA a 25 ou 50 $\mu$ M, é perceptível a tendência a aproximação dos valores expressos pelo grupo controle manifestada pelas Mo-mDC que receberam ACh + MLA (linhas tracejadas em verde nas figuras e tabela 1), ou ainda, a propensão a alcançar os valores apresentados pelo grupo que foi exposto unicamente ao MLA. Ou seja, Mo-mDC expostas a ACh conjuntamente ao MLA não possuem diferença ou propensão a diferença estatística em relação ao grupo controle. Constatação notável, porém, não suficiente para ignorar as observações em termos qualitativos, talvez,  $\alpha 7nAChR$  mediados e possivelmente mais relevantes em um contexto *in vivo*, sistêmico.

Esse possível “efeito restaurador” atribuído ao antagonismo da  $\alpha 7nAChR$  através da utilização do MLA, é especialmente importante quando levamos em consideração os relatos na literatura que evidenciam o perfil disfuncional e/ou tolerogênico adotado por monócitos e DC provenientes de pacientes com alguns tipos de cânceres (BELLA *et al.*, 2003; ORSINI *et al.*, 2003; SATTHAPORN *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 2012; PATENTE *et al.*, 2019), de maneira STAT3-dependente em pacientes com leucemia linfóide crônica (TONIOLO *et al.*, 2016), por exemplo. E é justamente através do aumento da fosforilação e atividade de STAT3 que  $\alpha 7nAChR$  pode exercer suas funções imunossupressoras e pró-tumorais (JONGE; ULLOA, 2009; PAVLOV; TRACEY, 2012; LIN *et al.*, 2012; ZDANOWSKI *et al.*, 2015), como já apresentado abordado na introdução desse trabalho.



Buscando avaliar a relevância funcional das alterações fenotípicas até aqui discutidas, executamos os ensaios de fagocitose e de capacidade aloestimuladora de Mo-DC tratadas com ACh e/ou MLA, nas mesmas concentrações utilizadas nos experimentos de avaliação fenotípica e conforme configurações descritas em material e métodos. Corroborando as alterações fenotípicas observadas, Mo-iDC tratadas com ACh nas concentrações de 1 e 25 $\mu$ M parecem ser afetadas de maneira relevante, em comparação ao grupo controle, no que diz respeito a atividade endocítica avaliada através da captura do polissacarídeo Dextran conjugado ao fluorocromo FITC (Fig. 11).

Cientes que o ensaio de fagocitose com Dextran-FITC visa aferir a endocitose dependente de determinados receptores celulares, como o receptor de manose, CD206 (WOLLENBERG *et al.*, 2002), realizamos, nas Mo-iDC submetidas ao experimento, marcação dessa molécula que é um importante marcador de imaturidade (ou de maturidade indutora de imunotolerância) em DC (TORRES-AGUILAR *et al.*, 2010). Curiosamente, apesar de afetar a taxa de endocitose, os tratamentos com ACh não foram capazes de interferir no índice de expressão de CD206, indicando que a diminuição na taxa de endocitose observada nas Mo-iDC expostas a 1 e 25 $\mu$ M de ACh possa ocorrer de maneira CD206-independente. Essa hipótese é fortalecida quando olhamos para o grupo tratado com MLA a 25 $\mu$ M ou ACh 100 $\mu$ M + MLA 25 $\mu$ M que apresentam taxas de endocitose praticamente iguais ao controle. Porém, índices de expressão de CD206 32% e 18% menores, respectivamente, em comparação as Mo-iDC expostas apenas ao veículo. Ademais, as observações de tais fenômenos apontam para um possível efeito “pró-maturador” do MLA a 25 $\mu$ M.

Partindo dessa ótica, a ausência de diferença no índice de expressão de CD206 entre os grupos expostos a ACh e o grupo controle, pode apontar para um possível efeito “pró-imaturidade” e não necessariamente para uma redução na taxa de endocitose de modo CD206-independente. Principalmente em contraponto a constatação da redução da expressão de CD206 nos grupos tratados com MLA a 25 $\mu$ M. No entanto, para a confirmação dessas observações é necessário que se execute um número maior de repetições desse experimento, bem como, a avaliação da expressão de CD206 em Mo-mDC.

Apesar das alterações fenotípicas e funcionais até o momento discutidas, a capacidade aloestimuladora de Mo-mDC tratadas com ACh e/ou MLA parece não ser influenciada no tocante a proliferação de Linfócitos T CD3+CD8+ (Fig. 12 A-B), resultado antagônico ao esperado, considerando-se as alterações nos níveis de expressão das moléculas co-estimuladoras nas Mo-mDC após tratamento com estes fármacos. Por outro lado, os linfócitos TCD4+ apresentaram aumento de proliferação quando estimulados por Mo-mDC expostas a ACh 1 $\mu$ M, MLA 25 $\mu$ M ou ACh 100 $\mu$ M + MLA a 25 $\mu$ M ou 50 $\mu$ M (Fig. 12 C-D).

A modulação positiva, embora tênue, apenas para a proliferação de células TCD4+ em resposta a co-cultura com Mo-mDC maturadas na presença da ACh e/ou MLA é instigante, visto que é demonstrada na literatura a capacidade dessas células de produzirem e secretarem ACh (RINNER *et al.*, 1998; ROSAS-BALLINA *et al.*, 2011; FUJII *et al.*, 2017), assim como as DC (FUJII *et al.*, 2017), enquanto que a descrição dessa habilidade por linfócitos TCD8+ ainda é uma questão muito controversa, sendo apontada como viável para alguns autores e impossível para outros (RINNER *et al.*, 1998; ROSAS-BALLINA *et al.*, 2011; FUJII *et al.*, 2017). Conseqüentemente, a interação entre DC expostas a agonistas e/ou antagonistas colinérgicos com linfócitos TCD4+ pode ser mais complexa e de difícil interpretação do que imaginamos, pela possibilidade de secreção da ACh pelas próprias células. Por esse motivo, para que possamos melhor compreender esse fenômeno é mandatório um número maior de repetições desse ensaio e a observação de mais marcadores intra e/ou extracelulares de células T que permitam fazer conclusões mais precisas e fidedignas.

Buscando lançar luz sobre as possíveis vias intracelulares moduladas a partir da exposição das DC aos nossos tratamentos, Mo-iDC foram pré-tratadas por 48h com ACh e/ou MLA e, após estímulo inflamatório agudo com TNF- $\alpha$ , foram analisadas para a fosforilação de STAT3, STAT5 e STAT6. Isso, haja vista a importância desses fatores de transcrição para o processo de maturação de DC, bem como, seu envolvimento nas disfunções apresentadas por DC provenientes de pacientes com câncer (Toniolo *et al.* 2016) e na resposta induzida por  $\alpha 7nAChR$  (JONGE; ULLOA, 2009; PAVLOV; TRACEY, 2012). Como pode ser observado na figura 13, surpreendentemente, Mo-iDC expostas apenas ao fármaco antagonista específico da  $\alpha 7nAChR$ , MLA, apresentaram os maiores índices de fosforilação de STAT3 e STAT5. Enquanto Mo-iDC não tratadas (grupo veículo) apresentaram frequência de células positivas para pSTAT3 e pSTAT5 de 35,7% e 0,33%, respectivamente, o tratamento com MLA levou as frequências para 94,2% e 79,9%.

Especulávamos ver tal modulação, especialmente de STAT3, nos grupos tratados com ACh, onde todas nossas observações apontavam para a aquisição de um perfil imunotolerogênico das DC e não, como ocorreu, naqueles tratados com seu antagonista, o MLA. Esta expectativa seria coerente com a clara e já consolidada descrição na literatura da modulação de STAT3 de modo  $\alpha 7nAChR$ -mediada, bem como, do envolvimento desse fator de transcrição com respostas imunossupressoras ou tolerogênicas em DC (JONGE; ULLOA, 2009; PAVLOV; TRACEY, 2012; LIN *et al.*, 2012; ZDANOWSKI *et al.*, 2015), todavia, não se confirmou. Neste cenário, uma especulação plausível, seria que ao bloquearmos a subunidade  $\alpha 7nAChR$  com MLA outros receptores colinérgicos moduladores de STAT3, e possivelmente STAT5, tenham sido, aguda e excessivamente, acionados pela ACh endógena sabidamente produzida por DC (SALAMONE *et al.*, 2011; FUJII *et al.*, 2017), levando a fosforilação e ativação aberrante desses fatores de transcrição e, subseqüentemente, ao

acionamento de mecanismos contra-regulatórios que promovam a desfosforilação de STAT como, por exemplo, através do recrutamento de tirosinas-fosfatases da família SHP, como SHP-1 e/ou SHP-2, capazes de abortar a ativação de STAT3, assim como já descrito em células endoteliais por Marrero *et al.* (2009) e Chatterjee *et al.* (2009), por exemplo.

Isso parece ser minimamente plausível quando observamos o comportamento das Mo-iDC expostas a ACh 100 $\mu$ M + MLA 25  $\mu$ M muito semelhante as células que receberam apenas MLA a 25  $\mu$ M (Fig. 13), no mesmo sentido, ao notarmos que o grupo tratado com ACh a 100  $\mu$ M apresentou níveis de fosforilação de STAT 3 e 5 muito próximos aos exibidos pelo veículo (controle aos tratamentos). E, controversamente, sendo o tratamento que na conjunção de todos os dados aqui apresentados promoveu efeitos “pró-tolerogênicos” em Mo-DC de maneira mais reprodutível. Evidentemente, para a comprovação dessa suposição será necessária a confirmação da relevância estatística desse ensaio e um corpo de outros experimentos que permitam elucidar esse possível mecanismo intracelular.

O GBM frequentemente surge e/ou invade regiões supratentoriais, que são áreas ricamente inervadas por projeções colinérgicas (THOMPSON *et al.*, 2019). Paralelamente, é intrigante notar que um tumor conhecido justamente por seu alto potencial de invasão através do parênquima cerebral, raramente surge ou invade regiões onde a expressão de receptores nicotínicos e/ou da  $\alpha 7nAChR$  é significativamente menor em comparação a outras regiões do SNC (PATERSON; NORDBERG, 2000; TOYOHARA *et al.*, 2010; MUGHAL *et al.*, 2018; PERRIN *et al.*, 2019). Esta observação é coerente e pode ser correlacionada ao crescente o interesse e à descrição do envolvimento de diversos neurotransmissores, dentre eles a ACh, na fisiopatologia de diversos tipos de cânceres, sejam eles localizados dentro ou fora do SNC (THAKER *et al.*, 2006; JOBLING *et al.*, 2015; MANCUSI *et al.*, 2023).

Neste contexto, ao tratarmos células da linhagem U87MG com ACh e/ou MLA, foi possível notar de maneira preliminar e pioneira em nossos resultados, que a combinação da ACh com o antagonismo da  $\alpha 7nAChR$  tem potencial para diminuir a viabilidade mitocondrial de células de GBM da linhagem U87MG. Sendo o grupo exposto a 10 $\mu$ M de ACh + 20 $\mu$ M de MLA (1:2), o que exibiu maior redução na viabilidade celular em relação ao grupo controle. Esse resultado apesar de limitado devido ao número de repetições e a metodologia utilizada para inferir viabilidade celular, se alinha ao trabalho desenvolvido por Khalil *et al.* (2012), no qual é evidenciado os efeitos pró-tumorais da nicotina em células de glioma e de GBM, promovendo a proliferação celular, migração e radioresistencia das células tumorais. Apesar de preliminar, esse resultado aproxima-se dos achados

depositados na literatura científica no que diz respeito aos efeitos pró-tumorais da ACh e endossa a hipótese do valor imuno e oncológico do antagonismo da  $\alpha 7nAChR$ .

As necessárias restrições impostas pela pandemia da COVID-19, bem como, a dificuldade em importar o fármaco antagonista específico da  $\alpha 7nAChR$ , MLA, produziram entraves experimentais que incentivaram nossa busca por metodologias alternativas que permitissem complementar nosso estudo do papel da ACh em interações neuro-imuno-oncológicas no GBM. A partir dessa conjuntura, procuramos estabelecer possíveis extrapolações entre o que observamos *in vitro* e de maneira muito propedêutica nesse trabalho com aquilo que, de fato, pode ocorrer na clínica em pacientes com GBM, por meio da mineração de dados públicos de expressão gênica provenientes de biópsias de GBM usando ferramentas *web* de bioinformática.

Usufruindo da plataforma GEPIA2, encontramos que a alta expressão gênica das moléculas CD40 (Fig. 16 A) e CD197 (Fig. 16 E) repercutem em menores índices de sobrevida global em pacientes com GBM. A literatura já relata esse resultado e discute justamente o valor preditivo da alta expressão dessas moléculas para a evolução clínica de pacientes diagnosticados com GBM. Werner *et al.* (2019) analisaram por PCR em tempo real a expressão gênica de CD40 em biópsias de pacientes com gliomas de baixo e alto grau e observaram que independentemente do grau apresentado, a alta expressão de CD40 foi relevantemente associada a menores taxas de sobrevida livre de progressão, assim como, sobrevida global. Para os diagnosticados com GBM e alta expressão de CD40, a sobrevida global mediana (mSG) foi 2 meses menor em comparação aos pacientes com baixa expressão dessa molécula ( $p=0.0491$ ). O grupo demonstrou ainda que a expressão de CD40 era significativamente maior em pacientes GBM IDH *wild-type* em comparação a pacientes com GBM perfil molecular IDH mutante. Esse resultado contribui com o possível valor de prognóstico desfavorável associado a alta expressão gênica de CD40, uma vez que, o perfil molecular IDH *wild-type* é um marcador consolidado de pior curso clínico para essa doença (TAMIMI; JUWEID, 2017).

Já Geraldo *et al.* (2023) valendo-se do mesmo banco de dados públicos que a GEPIA2 faz uso, *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), porém por meio de análises de bioinformática mais sofisticadas, descreveram o mesmo fenômeno no tocante a expressão diferencial de CD197 e sua relação com a mSG de indivíduos com GBM. O grupo encontrou uma sobrevida global mediana de 11.2 meses para pacientes com alta expressão gênica de CCR7 *vs* 15.4 meses para a baixa expressão dessa molécula ( $p=0.01$ ). Dessa forma, se correlacionando ao nosso resultado no qual a alta expressão de CCR7 significou uma menor taxa de mSG e fortalecendo o possível valor de prognóstico ruim para a alta expressão de CD197 no glioblastoma.

Muito embora seja possível encontrar esses correlatos na literatura, a descrição da alta expressão de CD40 e/ou CD197 como preditores de prognóstico ruim para o GBM é relativamente recente e, conseqüentemente, a investigação sobre os mecanismos subjacentes a essas observações ainda é escassa. Isso se torna especialmente relevante se considerarmos o fato de que para além das células que compõem o microambiente tumoral, majoritariamente células do sistema imunológico (DAPASH *et al.*, 2021), as células de GBM também são capazes de expressar CD40 (CHONAN *et al.*, 2015) e CD197 (ZHENG *et al.*, 2017). Desse modo, tornando ainda mais complexo - e igualmente necessário - o entendimento do fenômeno biológico que pode ser a causa da relação entre a expressão dessas moléculas e a sobrevida dos pacientes diagnosticados com GBM.

Nesse âmbito, Berberich (2020) e colaboradores transfectaram células de linhagens humanas de GBM para a superexpressão de CD40 e a partir dessa metodologia notaram maior invasão, clonogenicidade, tumorigenicidade e resistência a quimioterapia com temozolomida nas células transfectadas, sendo esses eventos, CD40-NFκB mediados. Já ZHENG *et al.* (2017) demonstraram *in vitro* que os efeitos do fator de crescimento TGFβ1 em células de GBM, isto é, indução da transição epitélio-mesênquima (EMT), migração e invasão são dependentes de CD197. Uma vez que, o silenciamento da expressão gênica de CD197 ou a utilização de anticorpos neutralizantes dessa molécula, foram capazes de abortar a ação de TGFβ1 em células de GBM das linhagens U87 e U251. Além disso, a equipe descreveu a participação do NFκB e das metaloproteinases MMP2 e MMP9 nos fenômenos TGFβ1-CCR7 relacionados.

Ambos os trabalhos supracitados contribuem para o entendimento da possível participação de CD40 e CD197 na fisiopatologia do GBM e ainda, ao confortarmos os estudos, é possível concluir que NFκB pode ser um ponto de conexão entre os eventos intracelulares desencadeados pela modulação de ambas as moléculas. Interessantemente, em nossas análises, encontramos correlação positiva entre a expressão gênica de CD40 e CD197 ( $p=1.9e-11$  |  $R=0.49$ ) em biópsias de pacientes com GBM, dessa maneira, é razoável conjecturar um efeito sinérgico entre a atividade dessas proteínas. E caso essa cooperação de fato exista, as correlações observadas em nosso estudo entre a expressão gênica da α7nAChR e NF-κB1 (p50) ( $p=6.5e-05$  |  $R=0.31$ ), NF-κB2 (p52) ( $p=2.4e-07$  |  $R=0.39$ ), CD40 ( $p=0.0043$  |  $R=0.22$ ), TGFβ1 ( $p=1.6e-07$  |  $R=0.40$ ) e MMP2 ( $p=0.0055$  |  $R=0.22$ ) podem ter significado biológico nesse contexto CD40-CD197 mediado.

No entanto, como já dito anteriormente, células do microambiente tumoral e do GBM são hábeis em expressar CD40 e CD197. Assim sendo, os trabalhos supracitados possuem um viés e limitação inerente ao investigarem *in vitro* e apenas em células neoplásicas de GBM o papel de CD40 (Berberich *et al.*, 2020) e CD197 (ZHENG *et al.*, 2017) na complexa e imbricada natureza do

glioblastoma. Não apenas esses estudos, como também, os nossos dados e os resultados apresentados por Werner *et al.* (2019) e Geraldo *et al.* (2023) possuem limitações nesse sentido. Visto que, os dados de expressão gênica obtidos não são capazes de discriminar qual grupo celular seria o maior responsável pela alta expressão gênica dessas proteínas em biópsias de GBM e, por conseguinte, de maior contribuição para a redução na mSG constatada em pacientes com esse perfil de expressão para CD40/CD197. Conhecimento esse, fundamental não apenas do ponto de vista fisiopatológico, mas também, clínico/terapêutico na hipótese da causalidade e do valor prognóstico da expressão gênica dessas moléculas seja confirmado.

Na ausência dessa informação na literatura científica e dos recursos necessários para que pudéssemos respondermos especificamente a essa questão, alternativamente, procuramos determinar se o enriquecimento com assinaturas gênicas das células do sistema imune descritas como infiltrantes no microambiente do GBM (DAPASH *et al.*, 2021) poderiam influenciar na mSG dos pacientes com GBM, tal como já exposto no tópico resultados desse trabalho. Dentre todas as células do sistema imunológico pesquisadas, apenas o enriquecimento com assinaturas gênicas correspondentes a células apresentadoras de antígenos da linhagem mieloide, *i.e.*, células dendríticas mieloides, macrófagos M1 e M2 se mostraram, de modo estatisticamente significativo, associadas à sobrevida no GBM. Neste caso, as altas expressões dessas assinaturas correspondem, individualmente, a menores taxas de mSG nesses pacientes (Fig. 17).

Esse resultado é consistente com a literatura científica, pois a mesma é praticamente uníssona em estabelecer a participação substancial de células fagocíticas derivadas da linhagem mieloide na gênese e/ou progressão de diversos tipos de cânceres (SCHMID *et al.*, 2010; COTECHINI *et al.*, 2015; GOSWAMI *et al.*, 2022) e ao que tudo indica o GBM não foge a essa constatação (LINDAU *et al.*, 2013; LEO *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2022). Todavia, a população de células derivadas da linhagem mieloide é muito vasta fenotípica e funcionalmente, por esse motivo, avaliações mais individualizadas são requeridas para conclusões mais fidedignas. Nessa perspectiva, nossos achados continuam alinhados a literatura, dado que, Zhou *et al.* (2020) também observaram menor mSG em pacientes com GBM que apresentavam enriquecimento de suas biópsias por marcadores de expressão gênica de macrófagos do fenótipo M1. Da mesma maneira, Wang *et al.* (2022) demonstraram que o aumento na expressão gênica de marcadores correspondentes a macrófagos do fenótipo M2, conjuntamente a outros tipos celulares envolvidos em respostas imunossupressoras/tolerogênicas, estava positivamente correlacionado com pior prognóstico no GBM.

Macrófagos do fenótipo M1 são associados a funções imunorreativas e antitumorais (MOSSER *et al.*, 2008; BOUTILIER *et al.*, 2021), enquanto macrófagos do fenótipo M2 são descritos

como células relacionadas a respostas imunotolerogênicas e pró-tumorais (MOSSER *et al.*, 2008; BOUTILIER *et al.*, 2021). Por essa ótica, nossos resultados e a comparação dos trabalhos supramencionados parecem contraditórios em termos do fenótipo apresentados pelos macrófagos e a menor sobrevida associada ao enriquecimento, separadamente, de ambas as assinaturas gênicas supostamente antagônicas.

Entretanto, na verdade, esses achados podem sinalizar que o binarismo macrófagos M1/M2 talvez seja insuficiente para explicar os fenótipos adquiridos e/ou funções exercidas por macrófagos em tumores sólidos (LEO *et al.*, 2020). Afinal, essas células nos tecidos são altamente plásticas e dinâmicas sendo possível, até mesmo, um macrófago apresentar ambos os perfis de expressão gênica (MA *et al.*, 2022; BOUTILIER *et al.*, 2021), tal como observado por Gabrusiewicz *et al.* (2016) em amostras de GBM, onde poucas células puderam ser classificadas como estritamente M1 ou M2 e, por esse motivo, o grupo defende que a maioria dos macrófagos/micróglias presentes em amostras de GBM são, na prática, mais próximos de uma classificação M0 ou não-polarizada. Desta maneira, ao invés de antagônicos, nossos dados podem estar apontando no mesmo sentido do observado por Gabrusiewicz e colaboradores (2016).

Já em relação ao aumento no risco de morte (HR=1.24 | p = 0.04) associado a alta expressão gênica de marcadores de DC mieloides em pacientes com GBM, não há nenhum trabalho depositado na literatura, até a presente data, que descreva esse dado. No entanto, apesar de não possuir correlatos, essa observação possui respaldo teórico se levarmos em consideração a infiltração dessas células no microambiente caracteristicamente imussupressor do GBM (LINDAU *et al.*, 2013; GALATRO, 2016; SAXENA; BHARDWAJ, 2018; ROURA *et al.*, 2020) e a já consolidada descrição desse câncer como “frio” do ponto de vista da resposta imunológica, ou seja, com baixo potencial imunorreativo (ZHOU *et al.*, 2023). Desta forma, considerando a natureza do microambiente do GBM é factível imaginar que o enriquecimento por DC mieloides poderia contribuir com a progressão da doença por indução de imunotolerância local e sistêmica ao tumor e, conseqüentemente, significar uma menor sobrevida global para esses pacientes.

Em suma, a partir de uma análise global e integrativa dos dados obtidos nesse trabalho e do que já se tem descrito na literatura científica internacional, temos que:

- (i) A maior concentração de ACh (100  $\mu$ M) foi responsável por gerar dados mais reprodutíveis que apontam para a adoção de um perfil fenotípico e funcional imunotolerogênico pelas Mo-DC, exibindo, menor expressão de importantes moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD83; maior razão entre as moléculas

CD274/CD80 e CD274/CD83 e, possivelmente, maior potencial endocítico. O bloqueio da  $\alpha 7$ nAChR com MLA tem potencial para minimizar esses efeitos;

- (ii) Ao considerarmos as diferentes concentrações de ACh utilizadas e a expressão das moléculas CD40 e CD197, qualitativamente, é possível notar que o aumento na concentração da ACh promoveu uma tendência de elevação na expressão de ambas as proteínas, especialmente para CD40. Corroborando tal observação, a utilização do fármaco agonista específico da  $\alpha 7$ nAChR, PNU-282987, parece aumentar consideravelmente a expressão de CD197;
- (iii) A literatura relata a importância da interação entre CD40 e CD197 para a migração de DC (MOODYCLIFFE *et al.*, 1999; LAPTEVA *et al.*, 2007), assim como, de CD197 para a migração e invasão de células do GBM (ZHENG *et al.* 2017). Em nossas análises de bioinformática, constatamos que a alta expressão gênica dessas moléculas está, individualmente, associada a um pior prognóstico em pacientes com GBM. Para além disso, foi possível encontrar correlação positiva entre a expressão de CD40 e CD197, como também, entre a  $\alpha 7$ nAChR e CD40 ou moléculas descritas como a jusante da modulação de CD197 em células de GBM;
- (iv) O GBM frequentemente surge e/ou invade regiões supratentoriais que são ricamente inervadas por projeções colinérgicas (THOMPSON *et al.*, 2019). Em nossas mãos, o tratamento concomitante de células de GBM com ACh e MLA, antagonista específico da  $\alpha 7$ nAChR, tem potencial para reduzir a viabilidade metabólica dessas células.
- (v) O microambiente do GBM é majoritariamente composto por células mieloides (LEO *et al.*, 2020). Nossos estudos *in silico* sugerem que a maior expressão de assinaturas gênicas compatíveis com DC mieloides e macrófagos no microambiente de biópsias de pacientes com GBM correlacionam-se com menores índices de sobrevida.

Tendo em vista essa síntese, é possível tirar uma “especulação fisiopatológica” intrigante de que a ACh, inerentemente presente no interstício do SNC e, conseqüentemente no microambiente do GBM, pode ter ação sobre as células neoplásicas de maneira direta - através da modulação da  $\alpha 7$ nAChR por exemplo - ou indireta, ao modular a expressão de moléculas como CD40 e CD197 nas células do GBM. E de modo sinérgico, pode ter ação sobre células residente e infiltrantes que compõe o microambiente desse tumor, em especial, as células dendríticas. As DC ao serem moduladas pela ACh presente nesse ambiente seriam igualmente - ou mais - hábeis em endocitar os antígenos tumorais e migrar até os linfonodos drenantes (aumento da expressão de CD40/CD197) induzindo



imunotolerância local e sistêmica ao tumor (menor expressão de moléculas co-estimuladoras). Desta maneira, participando na fisiopatologia da doença, ou ainda, no aumento de sua malignidade.

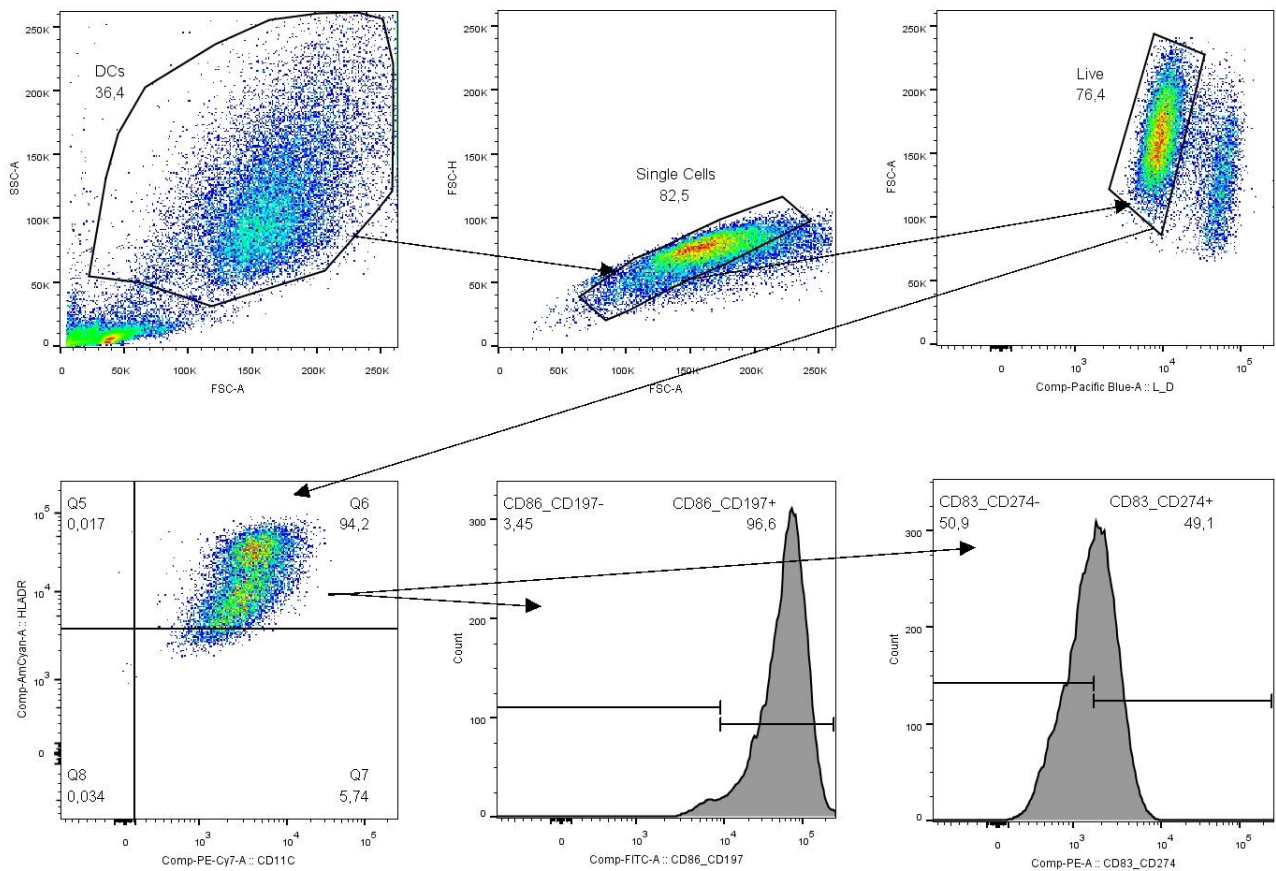
Por fim, vale destacar que esse trabalho não fornece subsídios experimentais suficientes para concluirmos de maneira sólida sobre o papel da ACh em DC e células do GBM. Tampouco, se é por meio da  $\alpha 7$ nAChR que a ACh exerce suas funções. Porém, a partir dos dados obtidos e discutidos é possível respaldar e justificar a continuidade dos estudos nesse campo tendo em mente a conjunção e originalidade dos resultados, assim como, a escassez de estudos que busquem entender as interações neuroimunológicas em tumores do SNC.

## 6. CONCLUSÃO

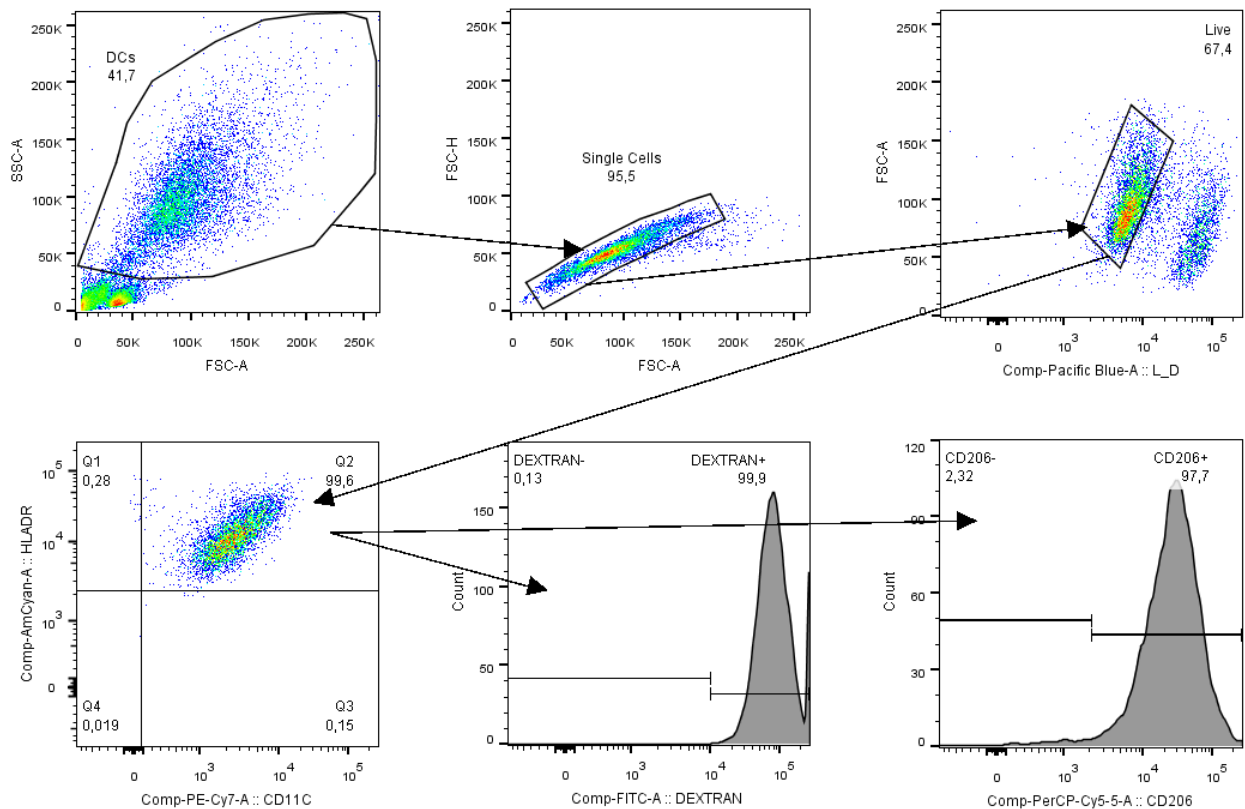
É possível concluir que a ACh tem potencial para modular o fenótipo e função de Mo-DC, promovendo a aquisição de um perfil fenotípico imunotolerogênico pelas DC expostas a esse neurotransmissor. A utilização do agonista específico da  $\alpha 7$ nAChR, PNU-282987, bem como de seu antagonista específico, MLA, sugerem que parte dos efeitos causados pela ACh em Mo-DC são  $\alpha 7$ nAChR-mediados. Já a exposição concomitante a ACh e ao MLA pode interferir na viabilidade metabólica de células de GBM da linhagem U87MG. Por fim, análises *in silico* aproximaram os dados obtidos *in vitro* nesse trabalho com o que de fato pode ocorrer em pacientes com GBM e, conjuntamente, fortalecem a suspeita de que moduladores colinérgicos podem contribuir com a malignidade do GBM através de um eixo neuro-imune-oncológico. Desta forma, abrindo caminhos para que mais estudos sejam desenvolvidos na área.

## 7. ANEXOS

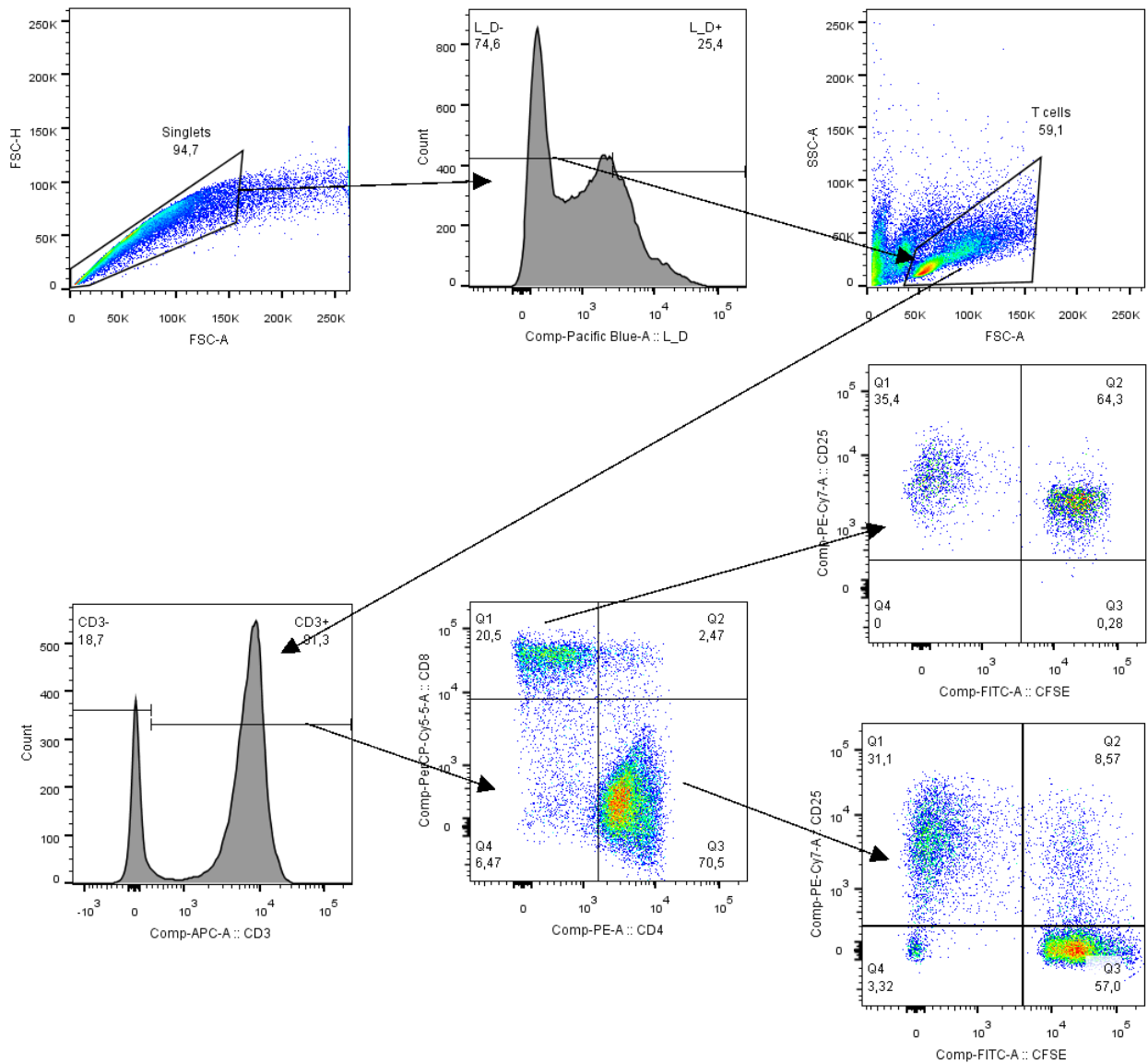
### ESTRATÉGIAS DE GATING UTILIZADAS



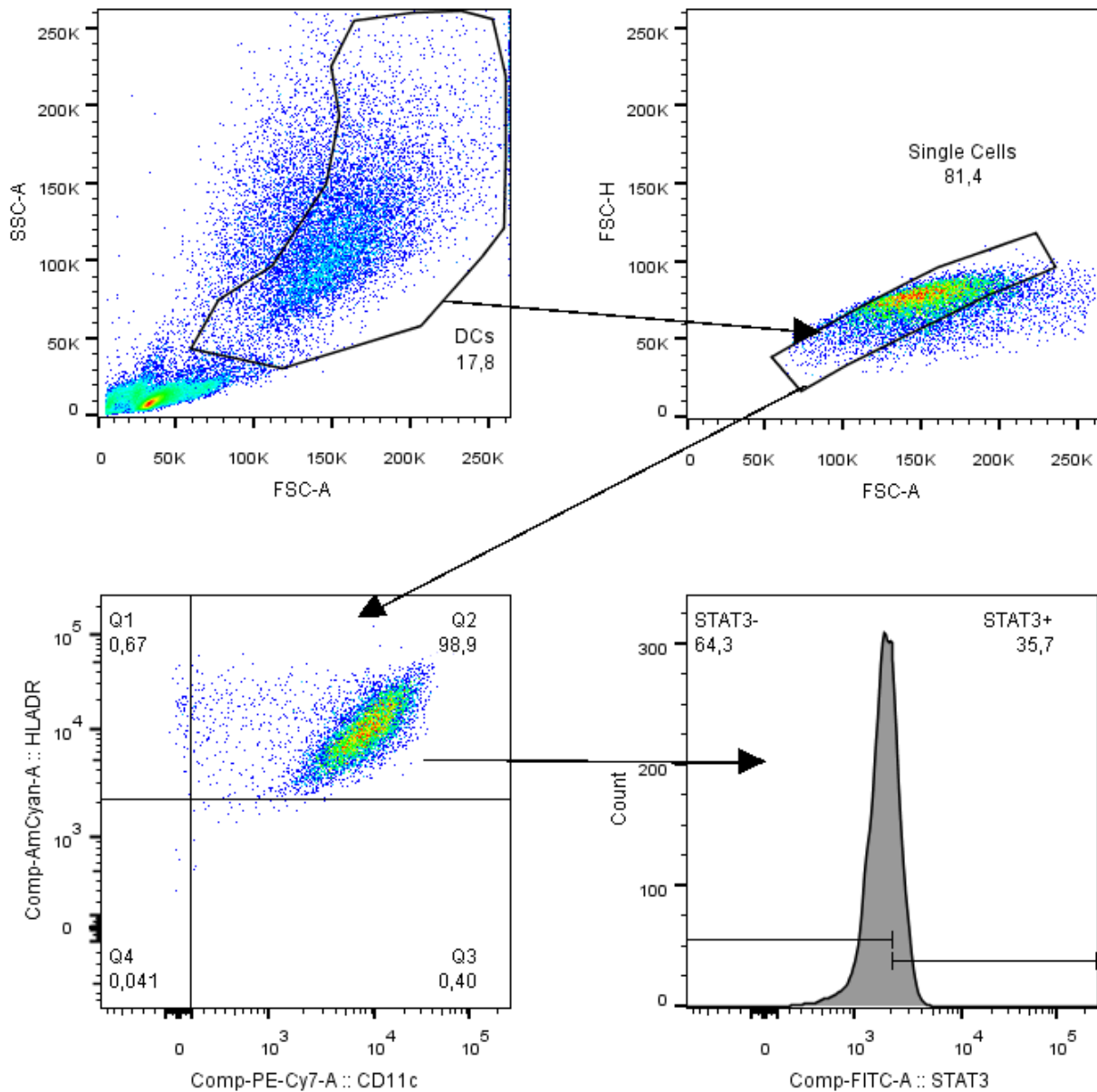
**Figura 1. Estratégia de Gating utilizada para a obtenção dos dados correspondentes a expressão das moléculas CD40, CD80, CD83, CD86, CD197 e CD274.** *Dot-plots* de granulidade por tamanho (SSC x FSC) indicando a seleção de monócitos, altura por tamanho de área (FSC-H x FSC-A) indicando *single cells*, o marcador de viabilidade (FSC-A x V450) indicando o *gating* de células vivas, HLA-DR por CD11c exemplificando a seleção de células duplo positivas para esses marcadores, histogramas representativos de células positivas para CD86 (Painel A - FITC+) e para CD274 (Painel B - PE). Foram utilizados dois painéis para a marcação das células. Painel A = L-D/HLA-DR/CD11c/CD80/CD83/CD86. Painel B = L-D/HLA-DR/CD11c/CD40/CD197/CD274. Amostra modelo de positividade para os marcadores analisados proveniente de Mo-mDC tratadas com o veículo (grupo controle).



**Figura 2. Estratégia de *Gating* utilizada para a obtenção dos dados correspondente aos ensaios de endocitose.** *Dot-plots* de granulosidade por tamanho (SSC x FSC) indicando a seleção de monócitos, altura por tamanho de área (FSC-H x FSC-A) indicando *single cells*, o marcador de viabilidade (FSC-A x V450) indicando o *gating* de células vivas, HLA-DR por CD11c exemplificando a seleção de células duplo positivas para esses marcadores, histogramas representativos de células positivas em para Dextran (FITC+) e para CD206 (PerCP-Cy5.5). Amostra modelo de positividade para os marcadores analisados proveniente de Mo-mDCs tratadas com o veículo (grupo controle).



**Figura 3. Estratégia de *Gating* utilizada para a obtenção dos dados correspondentes aos experimentos de alolinfoproliferação.** *Dot-plots* de altura por tamanho de área (FSC-H x FSC-A) indicando *single cells*, histograma para o marcador de viabilidade indicando o *gating* de células vivas, granulocidade por tamanho (SSC x FSC) indicando o *gating* para excluir os detritos e seleção de células de tamanho correspondente a linfócitos, histograma exemplificando a seleção de células positivas CD3 (APC+), CD8 (PerCPCy5.5+) por CD4 (PE+) para a seleção de células unicamente positivas para CD4 e CD8, seleção de células CD8+CD4- ou CD4+CD8- para a obtenção da população de células que proliferaram (CFSE-FITC-) e expressam CD25 (PE-Cy7) para ambos os marcadores. Amostra modelo de positividade para os marcadores analisados proveniente do grupo controle.



**Figura 4. Estratégia de *Gating* utilizada para a obtenção dos dados correspondente ao ensaio de avaliação de STAT3, 5 e 6.** *Dot-plots* de granulocidade por tamanho (SSC x FSC) indicando a seleção de monócitos e células vivas\*, altura por tamanho de área (FSC-H x FSC-A) indicando *single cells*, HLA-DR por CD11c exemplificando a seleção de células duplo positivas para esses marcadores, histogramas representativos de células positivas em para pSTAT3 (FITC+). Amostra modelo de positividade para os marcadores analisados proveniente de Mo-iDC tratadas com o veículo (grupo controle). \*Exclusão de células mortas através do *gating* de granulocidade por tamanho dado que a marcação com o corante L/D não é possível em conjunto a intracelular.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2015;

ABSINTA, M. *et al.* Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *Elife*, v. 6, p. 485-501, 3 out. 2017;

ADAMS, H. *et al.* Adult Cerebellar Glioblastoma: Understanding Survival and Prognostic Factors Using a Population-Based Database from 1973 to 2009. *World Neurosurgery*, v. 80, n. 6, p. 237-243, dez. 2013;

AMELOT, A. *et al.* IDH-Mutation Is a Weak Predictor of Long-Term Survival in Glioblastoma Patients. *Plos One*, v. 10, n. 7, p. 596-606, 9 jul. 2015;

AMERICAN CANCER SOCIETY (USA). *Cancer Facts & Figures 2018*. Atlanta: American Cancer Society, 2018. 76 p. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2019;

ANSELMO, L. B. *et al.* Functional analysis of cells obtained from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of lung cancer patients. *Life Sciences*, v. 76, n. 25, p. 2945-2951, maio 2005;

ANTUNES, A. A. *et al.* Pure sarcomatous recurrence of clear cell renal carcinoma following radical nephrectomy and dendritic cell vaccination. *Sao Paulo Medical Journal*, v. 124, n. 3, p. 161-162, 2006;

AZUMA, T. *et al.* Dendritic cell immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: University of Tokyo experience. *International Journal Of Urology*, v. 9, n. 6, p. 340-346, jun. 2002;

BADY, P. *et al.* DNA fingerprinting of glioma cell lines and considerations on similarity measurements. *Neuro-Oncology*, v. 14, n. 6, p. 701-711, 8 maio 2012;

BALEEIRO, R. B. *et al.* Topical Vaccination with Functionalized Particles Targeting Dendritic Cells. *Journal Of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 8, p. 1933-1941, ago. 2013;

BANCHEREAU, J. *et al.* Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, v. 18, n. 1, p. 767-811, abr. 2000;

BARBUTO, J. A. M. *et al.* Dendritic cell tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 53, n. 12, p. 1111-1118, 4 jun. 2004;

BARBUTO, J. A. M. Are dysfunctional monocyte-derived dendritic cells in cancer an explanation for cancer vaccine failures? *Immunotherapy*, v. 5, n. 2, p. 105-107, fev. 2013;

BATCHELOR, T. T. *et al.* Phase III Randomized Trial Comparing the Efficacy of Cediranib As Monotherapy, and in Combination With Lomustine, Versus Lomustine Alone in Patients With Recurrent Glioblastoma. *Journal Of Clinical Oncology*, v. 31, n. 26, p. 3212-3218, 10 set. 2013;

BELLA, S. D. *et al.* Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *British Journal of Cancer*, v. 89, n. 8, p. 1463–1472, out. 2003;

BENT, M. J. D. *et al.* Randomized Phase II Trial of Erlotinib Versus Temozolomide or Carmustine in Recurrent Glioblastoma: EORTC Brain Tumor Group Study 26034. *Journal Of Clinical Oncology*, v. 27, n. 8, p. 1268-1274, 10 mar. 2009;

BERBERICH, A. *et al.* LAPTM5–CD40 Crosstalk in Glioblastoma Invasion and Temozolomide Resistance. *Frontiers In Oncology*, v. 10, p. 1-18, 5 jun. 2020;

BIRZU, C. *et al.* Recurrent Glioblastoma: from molecular landscape to new treatment perspectives. *Cancers*, v. 13, n. 1, p. 47, 26 dez. 2020;

BODNAR, A. L. *et al.* Discovery and Structure–Activity Relationship of Quinuclidine Benzamides as Agonists of  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal Of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 4, p. 905-908, fev. 2005;

BONAVIA, R. *et al.* Heterogeneity Maintenance in Glioblastoma: A Social Network. *Cancer Research*, v. 71, n. 12, p. 4055-4060, 31 maio 2011;

BOROVIKOVA, L. V. *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, v. 405, n. 6785, p. 458-462, maio 2000;

BOTTERO, V. *et al.* Monitoring NF- $\kappa$ B Transactivation Potential Via Real-Time PCR Quantification of I $\kappa$ B- $\alpha$  Gene Expression. *Molecular Diagnosis*, v. 7, n. 3, p. 187-194, set. 2003;

BOUTILIER, A. J. *et al.* Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 95-107, 29 jun. 2021;

BRANDNER, S. *et al.* MGMTpromoter methylation testing to predict overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide: a comprehensive meta-analysis based on a cochrane systematic review. *Neuro-Oncology*, v. 23, n. 9, p. 1457-1469, 30 abr. 2021;

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, 12 set. 2018;

BREGY, A. *et al.* Active immunotherapy using dendritic cells in the treatment of glioblastoma multiforme. *Cancer Treatment Reviews*, v. 39, n. 8, p. 891-907, dez. 2013;

BROWN, P. D. *et al.* Phase I/II Trial of Erlotinib and Temozolomide With Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: north central cancer treatment group study n0177. *Journal Of Clinical Oncology*, v. 26, n. 34, p. 5603-5609, 1 dez. 2008. American Society of Clinical Oncology (ASCO);



BRUDNO, J. N; KOCHENDERFER, J. N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 15, n. 1, p. 31-46, 31 ago. 2017;

CARAGHER, S. P. *et al.* Activation of Dopamine Receptor 2 Prompts Transcriptomic and Metabolic Plasticity in Glioblastoma. *The Journal Of Neuroscience*, v. 39, n. 11, p. 1982-1993, 16 jan. 2019;

CHAKRAVARTI, A. *et al.* RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. *International Journal Of Radiation Oncology*, v. 85, n. 5, p. 1206-1211, abr. 2013;

CHANG, S. M. *et al.* Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Investigational New Drugs*, v. 23, n. 4, p. 357-361, ago. 2005;

CHAO, M. *et al.* TGF- $\beta$  Signaling Promotes Glioma Progression Through Stabilizing Sox9. *Frontiers In Immunology*, v. 11, p. 1-18, 3 fev. 2021;

CHATTERJEE, P. K. *et al.* Cholinergic agonists regulate JAK2/STAT3 signaling to suppress endothelial cell activation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 297, n. 5, p. C1294–C1306, nov. 2009;

CHEN, J. *et al.* Acetylcholine receptors: Key players in cancer development. *Surgical Oncology*, v. 31, p.46-53, dez. 2019;

CHEN, R. *et al.* Rapid Activation of Stat3 and ERK1/2 by Nicotine Modulates Cell Proliferation in Human Bladder Cancer Cells. *Toxicological Sciences*, v. 104, n. 2, p.283-293, 30 abr. 2008;

CHEN, Z; HAMBARDZUMYAN, D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Frontiers In Immunology*, v. 8, n. 1, p.1-8, 8 maio 2018;

CHERNOV, Andrei V. *et al.* Epigenetic Control of the Invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 Axis in Cancer Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, v. 284, n. 19, p. 12727-12734, 13 mar. 2009;

CHIANG, C. L. *et al.* A Dendritic Cell Vaccine Pulsed with Autologous Hypochlorous Acid-Oxidized Ovarian Cancer Lysate Primes Effective Broad Antitumor Immunity: From Bench to Bedside. *Clinical Cancer Research*, v. 19, n. 17, p.4801-4815, 9 jul. 2013;

CHILTON, M. *et al.* Behavioral consequences of methyllycaconitine in mice: a model of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor deficiency. *Life Sciences*, v. 74, n. 25, p.3133-3139, maio 2004;

CHONAN, M. *et al.* CD40/CD40L expression correlates with the survival of patients with glioblastomas and an augmentation in CD40 signaling enhances the efficacy of vaccinations against glioma models. *Neuro-Oncology*, v. 17, n. 11, p. 1453-1462, 24 maio 2015;

CLOUGHESY, T. F. *et al.* Antitumor Activity of Rapamycin in a Phase I Trial for Patients with Recurrent PTEN-Deficient Glioblastoma. *Plos Medicine*, v. 5, n. 1, p.8-20, 22 jan. 2008;

CLOUGHESY, T. F; CAVENEE, W. K; MISCHEL, P. S. Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 9, n. 1, p.1-25, 24 jan. 2014;

COLLINS, Alison V. *et al.* The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity*, v. 17, n. 2, p. 201-210, ago. 2002;

CORSI-ZUELLI, F. M. G. *et al.* Neuroimmune Interactions in Schizophrenia: Focus on Vagus Nerve Stimulation and Activation of the Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Frontiers In Immunology*, v. 8, p.1-12, 31 maio 2017;

CORTES, M. *et al.*  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor signaling modulates the inflammatory phenotype of fetal brain microglia: first evidence of interference by iron homeostasis. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p.342-355, 6 set. 2017;

COTECHINI, T. *et al.* Myeloid Cells as Targets for Therapy in Solid Tumors. *The Cancer Journal*, v. 21, n. 4, p. 343-350, jul. 2015;

CURTSINGER, J. M. *et al.* CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine. *The Journal of Immunology*, v. 171, n. 10, p. 5165–5171, 15 nov. 2003;

CURTSINGER, J. M. *et al.* Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4+ and CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 6, p. 3256–3262, 15 mar. 1999;

DALL'OGGIO, M; SROUGI, M; BARBUTO, J. A. M. Complete response of metastatic renal cancer with dendritic cell vaccine. *International Braz J Urol*, v. 29, n. 6, p.517-519, dez. 2003;

DAPASH, M. *et al.* The Interplay between Glioblastoma and Its Microenvironment. *Cells*, v. 10, n. 9, p. 57-72, 31 ago. 2021;

DATSI, A; SORG, R. V. Dendritic Cell Vaccination of Glioblastoma: Road to Success or Dead End. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 770390, 2 nov. 2021;

DOJINDO. Cell Counting Kit-8, 2016. Technical Manual. Disponível em [https://www.dojindo.com/TechnicalManual/Manual\\_CK04.pdf](https://www.dojindo.com/TechnicalManual/Manual_CK04.pdf). Acesso em: 26 de mar. 2019;

DUNN, G. P. *et al.* Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & Development*, v. 26, n. 8, p.756-784, 15 abr. 2012;

EAGLES, M. atthew *et al.* Dendritic cell vaccines for high-grade gliomas. *Therapeutics And Clinical Risk Management*, v. 14, p.1299-1313, jul. 2018;

ENG, J. W. I. *et al.* A nervous tumor microenvironment: the impact of adrenergic stress on cancer cells, immunosuppression, and immunotherapeutic response. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 63, n. 11, p.1115-1128, 12 out. 2014;

ENGELHARDT, B; VAJKOCZY, P; WELLER, R. O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature Immunology*, v. 18, n. 2, p.123-131, 16 jan. 2017;

FILLEY, A. C; HENRIQUEZ, M; DEY, M. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. *Oncotarget*, v. 8, n. 53, p. 91779–91794, 31 out. 2017;

FRANCO, R. *et al.* The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends In Immunology*, v. 28, n. 9, p.400-407, set. 2007;

FRIEDMANN-MORVINSKI, D. *et al.* Targeting NF- $\kappa$ B in glioblastoma: a therapeutic approach. *Science Advances*, v. 2, n. 1, p. 1-11, jan. 2016;

FUJII, T. *et al.* Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Frontiers In Immunology*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 6 set. 2017;

GABRUSIEWICZ, K. *et al.* Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *Jci Insight*, v. 1, n. 2, p. 1-18, 25 fev. 2016;

GAHRING, L. C, ROGERS S. W. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression and Function on Non-Neuronal Cells. *The AAPS Journal*, v. 7, p. E885–E894, 2005;

GALATRO, T. F. A. Perfil de expressão gênica da micróglia humana e suas alterações relacionadas ao glioma. 2016. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Neurologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016;

GALLUZZI, L. *et al.* The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Science Translational Medicine*, v. 10, n. 459, p.807-822, 19 set. 2018;

GARON, E. B. *et al.* Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal Of Medicine*, v. 372, n. 21, p.2018-2028, 21 maio 2015;

GERALDO, L. H. *et al.* CCL21-CCR7 signaling promotes microglia/macrophage recruitment and chemotherapy resistance in glioblastoma. *Cellular And Molecular Life Sciences*, v. 80, n. 7, p. 1-18, 14 jun. 2023;

GILBERT, M. R. *et al.* A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal Of Medicine*, v. 370, n. 8, p. 699-708, 20 fev. 2014;

GODINHO-SILVA, C; CARDOSO, F; VEIGA-FERNANDES, H. Neuro–Immune Cell Units: A New Paradigm in Physiology. *Annual Review Of Immunology*, v. 37, n. 1, p.19-46, 26 abr. 2019;

GOLDSBY, R. A; KINDT, T. J; OSBORNE, B. A. *Imunologia de Kuby*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008;

GOSWAMI, S. *et al.* Myeloid cell-targeted therapies for solid tumours. *Nature Reviews Immunology*, v. 23, n. 2, p. 106-120, 13 jun. 2022;

GREWAL, Iqbal S. *et al.* The Role of CD40 Ligand in Costimulation and T-Cell Activation. *Immunological Reviews*, v. 153, n. 1, p. 85-106, out. 1996;

GROSCHE, L. *et al.* The CD83 Molecule – An Important Immune Checkpoint. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 721, 17 abr. 2020;

GROVER, A. *et al.* Intralymphatic Dendritic Cell Vaccination Induces Tumor Antigen-Specific, Skin-Homing T Lymphocytes. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 19, p.5801-5808, 1 out. 2006;

GUERESCHI, M. G. *et al.* Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. *European Journal Of Immunology*, v. 43, n. 4, p.1001-1012, 4 mar. 2013;

GULATI, S. *et al.* Survival and Treatment Patterns of Glioblastoma in the Elderly: A Population-Based Study. *World Neurosurgery*, v. 78, n. 5, p.518-526, nov. 2012;

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011;

HANIF, F. *et al.* Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*, v. 18, n. 1, p.1-7, jan. 2017;

HERTLER, Caroline *et al.* Long-term survival with IDH wildtype glioblastoma: first results from the eternity brain tumor funders collaborative consortium (eortc 1419). *European Journal Of Cancer*, v. 189, p. 913-923, ago. 2023;

HILF, N. *et al.* Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature*, v. 565, n. 7738, p.240-245, 19 dez. 2018;

HO, Y. *et al.* Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NFκB activation and cyclin D1 up-regulation. *Toxicology And Applied Pharmacology*, v. 205, n. 2, p.133-148, 1 jun. 2005;

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) (Brasil). *Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2022. 130 p. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>>;

ISHIBASHI, M. *et al.* The cyclooxygenase inhibitor indomethacin modulates gene expression and represses the extracellular matrix protein laminin  $\gamma$ 1 in human glioblastoma cells. *Experimental Cell Research*, v. 302, n. 2, p. 244-252, jan. 2005;

JAIN, K. K. A Critical Overview of Targeted Therapies for Glioblastoma. *Frontiers In Oncology*, v. 8, p.1-19, 15 out. 2018;

JANEWAY, C. A. J. *et al.* *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007;

JOBLING, P. *et al.* Nerve-Cancer Cell Cross-talk: A Novel Promoter of Tumor Progression. *Cancer Research*, v. 75, n. 9, p.1777-1781, 20 mar. 2015;

JONGE, W. J; ULLOA, L. The  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *British Journal Of Pharmacology*, v. 151, n. 7, p.915-929, 17 fev. 2009;

KALPATHY-CRAMER, J. *et al.* Phase II study of tivozanib, an oral VEGFR inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *Journal Of Neuro-oncology*, v. 131, n. 3, p.603-610, 16 nov. 2016;

KHALIL, A. A. *et al.* Nicotine enhances proliferation, migration, and radioresistance of human malignant glioma cells through EGFR activation. *Brain Tumor Pathology*, v. 30, n. 2, p. 73-83, 22 maio 2012;

KIM, M. K; KIM, J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Advances*, v. 9, n. 20, p. 11230–11238, 2019;

KIM, T; KIM, S; LEE, S. Stimulation of the  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Protects Against Sepsis by Inhibiting Toll-like Receptor via Phosphoinositide 3-Kinase Activation. *The Journal Of Infectious Diseases*, v. 209, n. 10, p.1668-1677, 1 dez. 2013;

KOKOLUS, K. M. *et al.* Beta blocker use correlates with better overall survival in metastatic melanoma patients and improves the efficacy of immunotherapies in mice. *Oncoimmunology*, v. 7, n. 3, p.205-215, 21 dez. 2018;

KRELL, A. *et al.* MiR-16-5p is frequently down-regulated in astrocytic gliomas and modulates glioma cell proliferation, apoptosis, and response to cytotoxic therapy. *Neuropathology And Applied Neurobiology*, [S.L.], p. 1-12, 13 dez. 2018;

KRUSE, Monika *et al.* Inhibition of Cd83 Cell Surface Expression during Dendritic Cell Maturation by Interference with Nuclear Export of Cd83 mRNA. *Journal Of Experimental Medicine*, v. 191, n. 9, p. 1581-1590, 1 maio 2000;

KURTS, C. *et al.* CD4+ T Cell Help Impairs CD8+ T Cell Deletion Induced by Cross-presentation of Self-Antigens and Favors Autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 186, n. 12, p. 2057–2062, 15 dez. 1997;

- LAIGLESIA, N. *et al.* STAT3 Regulation of Glioblastoma Pathogenesis. *Current Molecular Medicine*, v. 9, n. 5, p. 580-590, 1 jun. 2009;
- LAPTEVA, N. *et al.* Enhanced Activation of Human Dendritic Cells by Inducible CD40 and Toll-like Receptor-4 Ligation. *Cancer Research*, v. 67, n. 21, p. 10528-10537, 1 nov. 2007;
- LEE, J. C. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Glioblastoma through Novel Missense Mutations in the Extracellular Domain. *Plos Medicine*, v. 3, n. 12, p.485-498, 19 dez. 2006;
- LEE, R. H; VAZQUEZ, G. Evidence for a prosurvival role of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in alternatively (M2)-activated macrophages. *Physiological Reports*, v. 1, n. 7, p.189-202, dez. 2013;
- LEO, A. de *et al.* Myeloid Cells in Glioblastoma Microenvironment. *Cells*, v. 10, n. 1, p. 18-29, 24 dez. 2020. MDPI AG;
- LEPSKI, G. *et al.* Adjuvant Vaccination with Allogenic Dendritic Cells Significantly Prolongs Overall Survival in High-Grade Gliomas: Results of a Phase II Trial. *Cancers*, v. 15, n. 4, p. 1239, 15 fev. 2023;
- LI, J. *et al.* Role of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in regulating tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) as revealed by subtype selective agonists. *Journal Of Neuroimmunology*, v. 239, n. 1-2, p.37-43, out. 2011;
- LI, T. *et al.* TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Research*, v. 77, n. 21, p.108-120, 31 out. 2017;
- LIAU, L. M. *et al.* 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*, v. 16, n. 1, p.1-16, 29 maio 2018;
- LIM, M. *et al.* Phase III trial of chemoradiotherapy with temozolomide plus nivolumab or placebo for newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter. *Neuro-Oncology*, v. 24, n. 11, p. 1935-1949, 2 maio 2022;
- LIN, W. *et al.* Role of  $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor in Normal and Cancer Stem Cells. *Current Drug Targets*, Setagaya, v. 13, n. 5, p.656-665, 2012;
- LIN, Ya-Jui *et al.* The Role of Myeloid Cells in GBM Immunosuppression. *Frontiers In Immunology*, v. 13, p. 1-21, 31 maio 2022;
- LINDAU, D. *et al.* The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*, v. 138, n. 2, p.105-115, 16 jan. 2013;
- LIU, K. Dendritic Cells. *Em: Encyclopedia of Cell Biology*. Elsevier, 2016. p. 741–749;
- LIU, M; GUO, F. Recent updates on cancer immunotherapy. *Precision Clinical Medicine*, v. 1, n. 2, p. 65–74, 1 set. 2018;

LIU, Q. *et al.*  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptor-mediated anti-inflammatory effect in a chronic migraine rat model via the attenuation of glial cell activation. *Journal Of Pain Research*, v. 11, p.1129-1140, jun. 2018;

LIU-Di *et al.* The effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway on collagen-induced arthritis involves the modulation of dendritic cell differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, v. 20, n. 1, p. 1-9, 28 nov. 2018;

LODICO, A. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Activity as a Switch for Glioblastoma Responsiveness to Temozolomide. *Frontiers In Oncology*, v. 8, p.1-12, 2 jul. 2018;

LOMBARDI, M. Y; ASSEM, M. Glioblastoma Genomics: A Very Complicated Story. *Glioblastoma*, p.3-25, 22 set. 2017;

LORENZO, G; BUONERBA, C; KANTOFF, P. W. Immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 8, n. 9, p.551-561, 24 maio 2011;

LOUIS, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, v. 131, n. 6, p. 803–820, jun. 2016;

LOUIS, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2 ago. 2021;

LOUVEAU, Antoine *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, v. 523, n. 7560, p.337-341, 1 jun. 2015;

MA, R.Y. *et al.* Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends In Immunology*, v. 43, n. 7, p. 546-563, jul. 2022;

MAGAÑA-MALDONADO, Roxana *et al.* Immunological Evasion in Glioblastoma. *Biomed Research International*, v. 2016, p.1-7, 2016;

MANCINO, M. *et al.* The neuronal influence on tumor progression. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Cancer*, v. 1816, n. 2, p.105-118, dez. 2011;

MANCUSI, R. *et al.* The neuroscience of cancer. *Nature*, v. 618, n. 7965, p. 467-479, 14 jun. 2023;

MANICASSAMY, S; PULENDRAN, B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological Reviews*, v. 241, n. 1, p. 206–227, maio 2011;

MANSOURI, Alireza *et al.* Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma. *Glioblastoma*, p.27-42, 22 set. 2017. Codon Publications;

MARRERO, M. B. *et al.* An  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor-Selective Agonist Reduces Weight Gain and Metabolic Changes in a Mouse Model of Diabetes. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, v. 332, n. 1, p.173-180, 28 set. 2009;

MARTIN-LIBERAL, J. *et al.* The expanding role of immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, v. 54, p.74-86, mar. 2017;

MASTORAKOS, P; MCGAVERN, D. The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. *Science Immunology*, v. 4, n. 37, p.492-502, 12 jul. 2019;

MATTOS, J. P. *et al.* Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 64, n. 1, p.132-135, mar. 2006;

MCDOWELL, Kelli A. *et al.* Targeting the AKT Pathway in Glioblastoma. *Current Pharmaceutical Design*, v. 17, n. 23, p. 2411-2420, 1 ago. 2011;

MCGRANAHAN, N; SWANTON, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, v. 168, n. 4, p.613-628, fev. 2017;

MCLENDON, R. *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, v. 455, n. 7216, p.1061-1068, 4 set. 2008;

MEDJBER, K. *et al.* Role of nicotinic acetylcholine receptors in cell proliferation and tumour invasion in broncho-pulmonary carcinomas. *Lung Cancer*, v. 87, n. 3, p. 258-264, mar. 2015;

MELHEM, J. M. *et al.* Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. *Neurotherapeutics*, v. 19, n. 6, p. 1705-1723, 31 maio 2022;

MONTALDI, A. P. L. Influência Do Gene *Ape1/Ref-1* Nas Respostas Celulares Das Linhagens De Glioblastoma Ao Quimioterápico Temozolomida. 2013. 167 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013;

MOODYCLIFFE, A. M. *et al.* Cd40–Cd40 Ligand Interactions in Vivo Regulate Migration of Antigen-Bearing Dendritic Cells from the Skin to Draining Lymph Nodes. *The Journal Of Experimental Medicine*, v. 191, n. 11, p. 2011-2020, 6 jun. 1999;

MOSSER, D. M. *et al.* Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 12, p. 958-969, dez. 2008;

MUGHAL, A. A. *et al.* Patterns of Invasive Growth in Malignant Gliomas—The Hippocampus Emerges as an Invasion-Spared Brain Region. *Neoplasia*, v. 20, n. 7, p. 643-656, jul. 2018;

NEVES, A. R. *et al.* 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*, v. 54, n. 1, p. 61-66, 14 set. 2004;

NEYNS, B. *et al.* Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Annals Of Oncology*, v. 20, n. 9, p. 1596-1603, set. 2009. Elsevier BV;

NOBEL PRIZE (Org.). The Nobel Prize in Physiology or Medicine. 2018. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/prize-announcement/>. Acesso em: 9 abr. 2019;



NODA, S. *et al.* Molecular Advances of Brain Tumors in Radiation Oncology. *Seminars In Radiation Oncology*, v. 19, n. 3, p. 171-178, jul. 2009;

NØRØXE, D. S; POULSEN, H. S; LASSEN, U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *Esmo Open*, v. 1, n. 6, p. 1-9, dez. 2016;

NOUSHMEHR, H. *et al.* Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*, v. 17, n. 5, p. 510-522, maio 2010;

NUSSENZWEIG, M. C. *et al.* Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, v. 152, n. 4, p. 1070–1084, 1 out. 1980;

NUTMA, E. *et al.* Neuroimmunology - the past, present and future. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 197, n. 3, p. 278-293, 11 mar. 2019;

OHGAKI, H; KLEIHUES, P. Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 64, n. 6, p. 479-489, jun. 2005;

OISETH, B. *et al.* Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. *Journal Of Immunology Research*, v. 2017, p.1-11, 2017;

OISETH, S. J; AZIZ, M. S. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal Of Cancer Metastasis And Treatment*, v. 3, n. 10, p. 250-262, 31 out. 2017;

OMURO, A. *et al.* Radiotherapy combined with nivolumab or temozolomide for newly diagnosed glioblastoma with unmethylated MGMT promoter: an international randomized phase iii trial. *Neuro-Oncology*, v. 25, n. 1, p. 123-134, 14 abr. 2022;

ORSINI, E. *et al.* The Circulating Dendritic Cell Compartment in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Is Severely Defective and Unable to Stimulate an Effective T-Cell Response. *Cancer Research*, v. 2, n. 63, p. 4497-4506, ago. 2003;

ORTEGA, A. A new role for GABA: inhibition of tumor cell migration. *Trends In Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 4, p. 151-154, abr. 2003;

PAN, Y. *et al.* Transforming growth factor beta induced (TGFBI) is a potential signature gene for mesenchymal subtype high-grade glioma. *Journal Of Neuro-oncology*, v. 137, n. 2, p. 395-407, 2 jan. 2018;

PARADA, E. *et al.* The Microglial  $\alpha 7$ -Acetylcholine Nicotinic Receptor Is a Key Element in Promoting Neuroprotection by Inducing Heme Oxygenase-1 via Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19, n. 11, p. 1135-1148, 10 out. 2013;

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 4, p. 252-264, abr. 2012;

PARSONS, D. W. *et al.* An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*, v. 321, n. 5897, p. 1807-1812, 26 set. 2008;

PATENTE, T. A. *et al.* Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Frontiers In Immunology*, v. 9, p. 1-18, 21 jan. 2019;

PATERSON, D; NORDBERG, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress In Neurobiology*, v. 61, n. 1, p. 75-111, maio 2000;

PAVLOV, V. A; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, n. 12, p. 743-754, dez. 2012;

PAVLOV, V; TRACEY, K. J. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nature Neuroscience*, v. 20, n. 2, p. 156-166, 16 jan. 2017;

PEARSON, J. R. D; REGAD, T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, v. 2, p. 17040-17051, 29 set. 2017;

PERRIN, S. L. *et al.* Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochemical Society Transactions*, v. 47, n. 2, p.625-638, 22 mar. 2019;

PHUPHANICH, S. *et al.* Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 62, n. 1, p.125-135, 31 jul. 2012;

PICCIOTTO, M. R; HIGLEY, M. J; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*, v. 76, n. 1, p.116-129, out. 2012;

PINHEIRO, N. M. *et al.* Pulmonary Inflammation Is Regulated by the Levels of the Vesicular Acetylcholine Transporter. *Plos One*, v. 10, n. 3, p. 41-51, 27 mar. 2015;

PINHO, M. P. *et al.* Dendritic-tumor cell hybrids induce tumor-specific immune responses more effectively than the simple mixture of dendritic and tumor cells. *Cytotherapy*, v. 18, n. 4, p.570-580, abr. 2016;

PINHO, M. P. *et al.* Near-Complete Remission of Glioblastoma in a Patient Treated with an Allogenic Dendritic Cell-Based Vaccine: the role of tumor-specific cd4+t-cell cytokine secretion pattern in predicting response and recurrence. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 23, n. 10, p. 539-549, 12 maio 2022.

POON, C. C. *et al.* Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. *Brain*, v. 140, n. 6, p.1548-1560, 4 fev. 2017;

PRIDHAM, K. J. *et al.* PIK3CB/p110 $\beta$  is a selective survival factor for glioblastoma. *Neuro-oncology*, v. 20, n. 4, p.494-505, 16 set. 2017;

PRINS, R. M. *et al.* Gene Expression Profile Correlates with T-Cell Infiltration and Relative Survival in Glioblastoma Patients Vaccinated with Dendritic Cell Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 6, p.1603-1615, 6 dez. 2010;

PULIYAPPADAMBA, V. T. *et al.* The role of NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of glioma. *Molecular & Cellular Oncology*, v. 1, n. 3, p. 78-89, 15 set. 2014;

QIAO, G. *et al.* Adrenergic Signaling: A Targetable Checkpoint Limiting Development of the Antitumor Immune Response. *Frontiers In Immunology*, v. 9, p.325-332, 6 fev. 2018;

QUAIL, D. F; JOYCE, J. A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell*, v. 31, n. 3, p.326-341, mar. 2017;

RAMOS, R. N. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Journal Of Leukocyte Biology*, v. 92, n. 3, p.673-682, 25 maio 2012;

RAMOS, R. N. *et al.* CD163 + tumor-associated macrophage accumulation in breast cancer patients reflects both local differentiation signals and systemic skewing of monocytes. *Clinical & Translational Immunology*, v. 9, n. 2, p. 1-12, jan. 2020;

RAPP, M. *et al.* A randomized controlled phase II trial of vaccination with lysate-loaded, mature dendritic cells integrated into standard radiochemotherapy of newly diagnosed glioblastoma (GlioVax): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, v. 19, n. 1, p.1-14, 25 maio 2018;

REAVIS, Hunter D. *et al.* Tumor Innervation: cancer has some nerve. *Trends In Cancer*, v. 6, n. 12, p. 1059-1067, dez. 2020;

RIBAS, A. Clinical Development of the Anti-CTLA-4 Antibody Tremelimumab. *Seminars In Oncology*, v. 37, n. 5, p.450-454, out. 2010;

RICH, J. N. *et al.* Phase II Trial of Gefitinib in Recurrent Glioblastoma. *Journal Of Clinical Oncology*, v. 22, n. 1, p. 133-142, 1 jan. 2004;

RILEY, R. S. *et al.* Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 18, n. 3, p.175-196, 8 jan. 2019;

RINNER, Ingo *et al.* Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. *Journal Of Neuroimmunology*, v. 81, n. 1-2, p. 31-37, jan. 1998;

ROMANI, M. *et al.* Immune Checkpoints and Innovative Therapies in Glioblastoma. *Frontiers In Oncology*, v. 8, p.1-12, 23 out. 2018;

ROSAS-BALLINA, M; TRACEY, K. J. Cholinergic control of inflammation. *Journal Of Internal Medicine*, v. 265, n. 6, p.663-679, jun. 2009;

ROSAS-BALLINA, M. *et al.* Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science*, v. 334, n. 6052, p. 98-101, 15 set. 2011;

ROSENBERG, J. e *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*, v. 387, n. 10031, p.1909-1920, maio 2016;

RÖTERING, S. *et al.* Imaging of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in brain and cerebral vasculature of juvenile pigs with [18F]NS14490. *Ejnm Research*, v. 4, n. 1, p.1-11, 5 ago. 2014;

ROURA, Adria-Jaume *et al.* Identification of the immune gene expression signature associated with recurrence of high-grade gliomas. *Journal Of Molecular Medicine*, v. 99, n. 2, p. 241-255, 19 nov. 2020;

RUSSANO, M. *et al.* Immunotherapy for Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: therapeutic advances and biomarkers. *Current Oncology*, v. 30, n. 2, p. 2366-2387, 16 fev. 2023;

SAITO, M. *et al.* Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 2, p. 235–249, 14 fev. 2011;

SAITO, R. F. *et al.* Fundamentos de oncologia molecular. São Paulo, SP: Atheneu: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, 2015;

SALAMONE, G. *et al.* Cholinergic modulation of dendritic cell function. *Journal Of Neuroimmunology*, v. 236, n. 1-2, p. 47-56, jul. 2011. Elsevier BV;

SANSOM, David M. *et al.* What's the difference between CD80 and CD86? *Trends In Immunology*, v. 24, n. 6, p. 313-318, jun. 2003;

SARNAIK, A. A. *et al.* Extended Dose Ipilimumab with a Peptide Vaccine: Immune Correlates Associated with Clinical Benefit in Patients with Resected High-Risk Stage IIIc/IV Melanoma. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 4, p.896-906, 24 nov. 2010;

SATHORNSUMETEE, S. *et al.* Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer*, v. 110, n. 1, p.13-24, 2007;

SATTHAPORN, S. *et al.* Dendritic cells are dysfunctional in patients with operable breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 53, n. 6, p.510-518, 1 jun. 2004;

SAXENA, M; BHARDWAJ, N. Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment. *Trends In Cancer*, v. 4, n. 2, p.119-137, fev. 2018;

SCHADENDORF, D. *et al.* Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized

phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Annals Of Oncology*, v. 17, n. 4, p.563-570, 16 jan. 2006;

SCHMID, M. C; VARNER, J. A. Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment: Modulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Inflammation. *Journal of Oncology*, v. 2010, p. 1–10, 2010;

SCHMIDT, E. V. Developing combination strategies using PD-1 checkpoint inhibitors to treat cancer. *Seminars in Immunopathology*, v. 41, n. 1, p. 21–30, jan. 2019;

SCHREIBELT, G. *et al.* Effective Clinical Responses in Metastatic Melanoma Patients after Vaccination with Primary Myeloid Dendritic Cells. *Clinical Cancer Research*, v. 22, n. 9, p.2155-2166, 28 dez. 2015;

SCHULLER, Hildegard M. Neurotransmitter Receptor-Mediated Signaling Pathways as Modulators of Carcinogenesis. *Neuronal Activity In Tumor Tissue*, p. 45-63, 2007;

SERRANO-GÓMEZ, S. J. *et al.* The novel acetylcholinesterase inhibitor NPD-001 protects against peripheral and central acute neurotoxic effects of carbaryl in a mouse model. *Archives Of Toxicology*, v. 90, n. 2, p. 297-306, 20 jul. 2015;

SHAASHUA, L. *et al.* Perioperative COX-2 and  $\beta$ -Adrenergic Blockade Improves Metastatic Biomarkers in Breast Cancer Patients in a Phase-II Randomized Trial. *Clinical Cancer Research*, v. 23, n. 16, p.4651-4661, 10 maio 2017;

SHARMA, P. *et al.* Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, v. 168, n. 4, p.707-723, fev. 2017;

SINGH, D. *et al.* Transforming Fusions of FGFR and TACC Genes in Human Glioblastoma. *Science*, v. 337, n. 6099, p.1231-1235, 26 jul. 2012;

STEINMAN, R. M; COHN, Z. A. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 137, n. 5, p. 1142–1162, 1 maio 1973;

STEINMAN, R. M; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 75, n. 10, p. 5132–5136, out. 1978;

STEINMAN, R. M. The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annual Review of Immunology*, v. 9, n. 1, p. 271–296, abr. 1991;

STEINMAN, R. M. *et al.* Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Human Immunology*, v. 60, n. 7, p.562-567, jul. 1999;

STEINMAN, R. M; HAWIGER, D; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, v. 21, n. 1, p. 685–711, abr. 2003;

STEPULAK, A. *et al.* Glutamate and its receptors in cancer. *Journal Of Neural Transmission*, v. 121, n. 8, p.933-944, 9 mar. 2014;

STOITZNER, P. The Langerhans cell controversy: are they immunostimulatory or immunoregulatory cells of the skin immune system? *Immunology & Cell Biology*, v. 88, n. 4, p. 348–350, maio 2010;

ST-PIERRE, S. *et al.* Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Bone Marrow-Derived Pro-Inflammatory Monocyte Production and Survival. *Plos One*, v. 11, n. 2, p.30-48, 29 fev. 2016;

STUPP, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal Of Medicine*, v. 352, n. 10, p. 987-996, 10 mar. 2005;

TAKENAKA, M. C. *et al.* Norepinephrine Controls Effector T Cell Differentiation through  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor–Mediated Inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 in Dendritic Cells. *The Journal Of Immunology*, v. 196, n. 2, p.637-644, 11 dez. 2015;

TAMIMI, A. F; JUWEID, M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. *Glioblastoma*, p. 143-153, 22 set. 2017;

TAN, M. S. Y. *et al.* A STAT3-based gene signature stratifies glioma patients for targeted therapy. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 1-15, 9 ago. 2019;

TANG, Z. *et al.* GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. 1, p.556-560, 22 maio 2019;

THAKER, P. H *et al.* Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Medicine*, v. 12, n. 8, p.939-944, 23 jul. 2006;

THAKKAR, J. P. *et al.* Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 30 set. 2014;

THOMPSON *et al.* Acetylcholine Receptor Activation as a Modulator of Glioblastoma Invasion. *Cells*, v. 8, n. 10, p. 1203-1220, 5 out. 2019;

TONIOLO, P. A. *et al.* Deregulation of SOCS5 suppresses dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, v. 7, n. 29, p.1-9, 15 jun. 2016;

TORRES-AGUILAR, Honorio *et al.* Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4+ T Cells. *The Journal Of Immunology*, v. 184, n. 4, p. 1765-1775, 18 jan. 2010;

TOYOHARA, J. *et al.* In Vivo Evaluation of  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists [11C]A-582941 and [11C]A-844606 in Mice and Conscious Monkeys. *Plos One*, v. 5, n. 2, p.961-974, 1 fev. 2010;

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. *Nature*, v. 420, n. 6917, p.853-859, dez. 2002;

TROMBINO, S. *et al.*  $\alpha$ 7-Nicotinic Acetylcholine Receptors Affect Growth Regulation of Human Mesothelioma Cells. *Cancer Research*, v. 64, n. 1, p.135-145, 1 jan. 2004;

TUCCI, S; GENN, R; FILE, S. Methyllycaconitine (MLA) blocks the nicotine evoked anxiogenic effect and 5-HT release in the dorsal hippocampus: possible role of  $\alpha 7$  receptors. *Neuropharmacology*, v. 44, n. 3, p.367-373, mar. 2003;

ULASOV, I. *et al.* Inhibition of MMP 14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas. *Cancer Medicine*, v. 2, n. 4, p. 457-467, 30 jun. 2013;

VAN MAANEN, M. A. *et al.* The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 5, n. 4, p.229-232, abr. 2009;

VAN SOLINGE, T. S; NIELAND, L; CHIOCCA, E. A; BROEKMAN, M. L. D. Advances in local therapy for glioblastoma — taking the fight to the tumour. *Nature Reviews Neurology*, v. 18, n. 4, p. 221-236, 11 mar. 2022;

VERHAAK, R. G. W. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, v. 17, n. 1, p.98-110, jan. 2010;

VIVANCO, I. *et al.* Differential Sensitivity of Glioma- versus Lung Cancer-Specific EGFR Mutations to EGFR Kinase Inhibitors. *Cancer Discovery*, v. 2, n. 5, p.458-471, 31 mar. 2012;

VLEESCHOUWER, S. *et al.* Glioblastoma. Brisbane: Codon Publications, 2017. Codon Publications. <http://dx.doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017>. 452 p. Disponível em: <https://codonpublications.com/index.php/codon/catalog/view/35/133/282-1>. Acesso em: 11 mar. 2019;

WANG, D. *et al.* Stimulation of alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor by Nicotine Increases Suppressive Capacity of Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Mice In Vitro. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, v. 335, n. 3, p.553-561, 15 set. 2010;

WANG, H. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, v. 421, n. 6921, p.384-388, 22 dez. 2002;

WANG, L. *et al.* A single-cell atlas of glioblastoma evolution under therapy reveals cell-intrinsic and cell-extrinsic therapeutic targets. *Nature Cancer*, v. 3, n. 12, p. 1534–1552, 20 dez. 2022;

WANG, S; HU, Y.  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in lung cancer (Review). *Oncology Letters*, 2018;

WANG, X; ZHANG, H; CHEN, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2019;

WERNER, J.-M. *et al.* Expression of CD40 Correlates Negatively with Overall and Progression-Free Survival of Low- and High-Grade Gliomas. *World Neurosurgery*, v. 130, p. e17–e25, out. 2019;

WESTPHAL, M. *et al.* A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *European Journal Of Cancer*, v. 51, n. 4, p. 522-532, mar. 2015. Elsevier BV;

WICK, W. *et al.* MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology*, v. 10, n. 7, p. 372-385, 10 jun. 2014;

WOLLENBERG, A. *et al.* Expression and Function of the Mannose Receptor CD206 on Epidermal Dendritic Cells in Inflammatory Skin Diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 118, n. 2, p. 327–334, fev. 2002;

WONG, H. P. S. *et al.* Nicotine promotes cell proliferation via  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicology And Applied Pharmacology*, v. 221, n. 3, p.261-267, jun. 2007;

WOOD, H. Addition of bevacizumab fails to improve on temozolomide alone for glioma therapy. *Nature Reviews Neurology*, v. 14, n. 10, p.570-570, 29 ago. 2018;

WU, C; LEE, C; HO, Y. Nicotinic Acetylcholine Receptor-Based Blockade: Applications of Molecular Targets for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 11, p.3533-3541, 28 mar. 2011;

XU, H. *et al.* Geographic Variations in the Incidence of Glioblastoma and Prognostic Factors Predictive of Overall Survival in US Adults from 2004–2013. *Frontiers In Aging Neuroscience*, v. 9, p.1-9, 7 nov. 2017;

YAN, Y. *et al.* Recombinant Newcastle disease virus rL-RVG enhances the apoptosis and inhibits the migration of A549 lung adenocarcinoma cells via regulating alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in vitro. *Virology Journal*, v. 14, n. 1, p.1-13, 3 out. 2017;

YANG, Z; DENG, F; MENG, L. Effect of dendritic cell immunotherapy on distribution of dendritic cell subsets in non-small cell lung cancer. *Experimental And Therapeutic Medicine*, p.1-5, 30 mar. 2018;

YOUNG, J. S. *et al.* Management of glioblastoma in elderly patients. *Journal Of The Neurological Sciences*, v. 380, p. 250-255, set. 2017;

YU, Xin *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology*, v. 10, n. 1, p. 48-57, 16 nov. 2008;



YU, Y; CUI, J. Present and future of cancer immunotherapy: A tumor microenvironmental perspective (Review). *Oncology Letters*, p.1-9, 26 jul. 2018;

ZAHALKA, Ali H; FRENETTE, Paul S. Nerves in cancer. *Nature Reviews Cancer*, p.1-12, 23 jan. 2020;

ZAHREDDINE, H. *et al.* Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers In Pharmacology*, v. 4, p. 1-12, 2013;

ZANDERS, E. D; SVENSSON, F; BAILEY, D. S. Therapy for glioblastoma: is it working? *Drug Discovery Today*, p.1-9, mar. 2019;

ZDANOWSKI, R. *et al.* Role of  $\alpha 7$  nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. *Central European Journal Of Immunology*, v. 3, p.373-379, 2015;

ZHENG, Y. *et al.* CCR7 Mediates TGF- $\beta$ 1-Induced Human Malignant Glioma Invasion, Migration, and Epithelial–Mesenchymal Transition by Activating MMP2/9 Through the Nuclear Factor KappaB Signaling Pathway. *Dna And Cell Biology*, v. 36, n. 10, p. 853-861, out. 2017;

ZHOU, S. *et al.* Reprogramming systemic and local immune function to empower immunotherapy against glioblastoma. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 1-23, 26 jan. 2023;

ZHOU, Z. *et al.* Increased M1 Macrophages Infiltration Correlated With Poor Survival Outcomes and Radiation Response in Gliomas. *Dose-Response*, v. 18, n. 4, p. 15-26, 1 out. 2020.