



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIEL DA SILVA CORDEIRO

TERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS MODULADAS PELO
SILDENAFIL (VIAGRA[®], PFIZER) PARA TRATAMENTO DO
CÂNCER

CAMPINAS

2020

GABRIEL DA SILVA CORDEIRO

**TERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS MODULADAS PELO
SILDENAFIL (VIAGRA[®], PFIZER) PARA TRATAMENTO DO CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na Área de Biologia Celular.

Orientadora: CATARINA RAPOSOS DIAS CARNEIRO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELO ALUNO GABRIEL DA SILVA CORDEIRO E
ORIENTADO PELA CATARINA RAPOSO DIAS
CARNEIRO.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C811t Cordeiro, Gabriel da Silva, 1996-
Terapia com células dendríticas moduladas pelo sildenafil (Viagra, Pfizer)
para tratamento do câncer / Gabriel da Silva Cordeiro. – Campinas, SP : [s.n.],
2020.

Orientador: Catarina Raposo Dias Carneiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Imunoterapia. 2. Adjuvantes imunológicos. 3. Reposicionamento de
medicamentos. 4. Câncer. 5. Células dendríticas. I. Carneiro, Catarina Raposo
Dias, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Therapy with dendritic cells modulated by sildenafil (Viagra ,
Pfizer) for cancer treatment

Palavras-chave em inglês:

Immunotherapy

Adjuvants, Immunologic

Drug repositioning

Cancer

Dendritic cells

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Catarina Raposo Dias Carneiro [Orientador]

Mary Ann Foglio

Karina Cogo Müller

Data de defesa: 15-12-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8740-0397>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1492392939117732>

Campinas, 15 de dezembro de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Catarina Raposo Dias Carneiro

Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Profa. Dra. Karina Cogo Müller

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

À vida, o dom mais importante que rege todos os organismos, os guiam e outrora os empurram para onde ela quiser. Aquela que sempre age por instinto, o motivo do seu sucesso.

Aos meus pais, Edicelia da Silva Cordeiro e Samuel Alves Cordeiro, os responsáveis por me ajudar, com amor, na construção de quem eu sou. A eles serei eternamente grato.

Às minhas irmãs, que me fizeram ser o homem que eu sou e que me serviram como espelho. A energia que vem delas me mantém vivo e feliz.

À minha orientadora Catarina Raposo Dias Carneiro. Pessoa essencial para a minha construção profissional e por muitas vezes pessoal que, com maestria, soube me guiar nessa trajetória acadêmica.

Aos professores do Instituto de Biologia e Faculdade de Ciências Farmacêuticas, que me ensinaram o que não aprendi com os livros e foram responsáveis por me ajudar, de forma intrínseca, a concluir esse trabalho.

Aos excelentes pesquisadores dos quais eu pude conhecer e aprender com eles, seja através de uma técnica nova ou de uma frase gentil.

Aos meus amigos de todos os lugares, que me aconselharam e cuidaram de mim nesse período seja de perto ou até mesmo de longe. Eles são como onda no mar que quebra às 18 h.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço também o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 158888/2018-9 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2015/04194-0.

“Para quem viaja ao encontro do sol, é sempre madrugada”

Helena Kolody

RESUMO

DCs com função defeituosa encontradas em pacientes com câncer possuem relação direta com o pobre prognóstico da doença. Com o desenvolvimento de novas imunoterapias, percebeu-se que alguns fármacos podem reduzir a ação supressora do microambiente tumoral (TME) e serem úteis como imunoadjuvantes no tratamento do câncer. O sildenafil (Viagra®) é um inibidor de fosfodiesterase 5 (PDE5-I) que aumenta a resposta antitumoral de linfócitos T, quando administrado sistemicamente. Porém, os efeitos desse medicamento nas DCs, células que determinam o fenótipo dos linfócitos T, ainda não são conhecidos. Portanto o objetivo geral dessa pesquisa foi avaliar o efeito do sildenafil como um modulador de DCs *in vitro*, visando o uso desse fármaco como um adjuvante em vacina de DCs contra adenocarcinoma mamário (EO771); foi objetivo paralelo padronizar um modelo experimental mais adequado, caracterizando o efeito do GM-CSF e do sobrenadante de L929 na diferenciação das DCs. DCs geradas da medula óssea de camundongos foram expostas ao lisado tumoral de EO771 e/ou ao sildenafil (0,1, 1 e 10 μ M) por 24 h *in vitro*, e posteriormente foi avaliada a expressão de marcadores de superfície (MHCII, CD11c e CD80) e a liberação de citocinas (IL1- β , IL-10 e TNF- α). Também foram analisadas as populações de linfócitos (CD4⁺ e CD8⁺) mantidas em cocultura com as DCs moduladas e, por fim, a capacidade desses linfócitos em matar a linhagem tumoral (EO771), quando colocados em cocultura, para avaliar a eficácia *in vitro* da modulação das DCs. O sildenafil aumentou a expressão de MHCII e de CD80, a secreção de IL-1 β e de TNF- α , enquanto diminuiu a expressão de IL-10, indicando a indução de um perfil ativado dessas células. O tratamento aumentou o percentual das populações de linfócitos duplo-positivos CD4⁺CD8⁺. Entretanto, não houve aumento da morte celular de EO771 em 24 h de cocultura com linfócitos diferenciados pelas DCs tratadas com o sildenafil. Como resultado paralelo, a concentração de 10 ng/mL de GM-CSF foi considerada a mais eficaz para diferenciar populações CD11c⁺ MHCII⁺ F4/80⁻. Nosso trabalho sugere que o sildenafil modulou as DCs para um perfil fenotípico e funcional ativado, porém não melhorou a capacidade dessas células em induzir uma resposta antitumoral *in vitro*, nas condições de tempo, linhagem tumoral e concentração estudadas. Outros testes são necessários para indicar se esse fármaco pode ser reposicionado como um imunoadjuvante em vacinas de DCs para o tratamento do câncer, o que pode representar uma estratégia de menor custo e tempo em comparação com o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Imunoterapia; imunoadjuvante; reposicionamento; neoplasias; quimioadjuvante.

ABSTRACT

Defective function of DCs found in cancer patients are directly related to the poor prognosis of the disease. With the development of new immunotherapies, it was realized that some drugs can reduce the suppressive action of the tumor microenvironment (TME) and be useful as immunoadjuvants in the treatment of cancer. Sildenafil (Viagra®) is a phosphodiesterase 5 (PDE5-I) inhibitor that increases the T lymphocyte antitumor response when administered systemically. However, the effects of this drug on DCs, cells that determine the phenotype of T lymphocytes, are not yet known. Therefore, the general objective of this research was to evaluate the effect of sildenafil as a DC modulator *in vitro*, aiming at the use of this drug as an adjuvant in a DC vaccine against breast adenocarcinoma (EO771); it was a parallel objective to standardize a more adequate experimental model, characterizing the effect of GM-CSF and L929 supernatant on the differentiation of DCs. DCs generated from the bone marrow of mice were exposed to the tumor lysate of EO771 and/or to sildenafil (0.1, 1 and 10 μ M) for 24 h *in vitro*, and subsequently the expression of surface markers (MHCII, CD11c and CD80) and the release of cytokines (IL1- β , IL-10 and TNF- α). Lymphocyte populations (CD4 and CD8) maintained in co-culture with modulated DCs were also analyzed, and finally, the capacity of these lymphocytes to kill the tumor line (EO771), when placed in co-culture, to evaluate the *in vitro* efficacy of the modulation of the DCs. Sildenafil was able to increase the expression of MHCII in 24 h of treatment and CD80 in 1 h, the secretion of IL-1 β in 1 h, that of TNF- α in 24 h and the percentage of CD4 + CD8 + populations. It also decreased the expression of CD11c in 1h, the secretion of IL-10 and was not related to cell death of EO771 in coculture with DCs and lymphocytes in 24 h of treatment. Our work suggests that sildenafil acts positively on the phenotype and function of DCs and has no chemotherapeutic action. Therefore, further studies may result in the repositioning of this drug as an immunoadjuvant in the treatment of cancer and this would represent a viable means in terms of cost and time to provide an improved immunotherapy for cancer patients.

Key phrases: Immunotherapy; immune adjuvant; repositioning; neoplasms; chemo adjuvant.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC: Antigen presenting cell
BMDC: Bone marrow derived cell
CD: Cluster of differentiation
cDC: Conventional dendritic cell
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CSF: Colony Stimulating Factor
CTL: Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
DC: Dendritic cell
DCV: Dendritic cell vaccine
DP: Duplo positive
EMA: European Medicines Agency
FDA: Food and Drug Administration
GCs: Guanylate cyclase soluble
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMPc: Guanosine monophosphate ciclic
HSC: Hematopoietic stem cell
IgE: Immunoglobulin E
IL: Interleukin
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Media
infDC: Inflammatory dendritic cell
INF γ : Interferon γ
LPS: lipopolysaccharide
MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells
MHC: Major histocompatibility complex
NK: Natural Killer
NO: Nitric oxide
PD-1: Programmed cell death - 1
pDC: Plasmacytoid dendritic cell
PDE: Phosphodiesterase
ROS: Reactive oxygen species
Th: T helper
TIDC: Tumor infiltrating DC
TME: Tumor microenvironmet
Treg: T regulatory

SUMÁRIO

Introdução.....	11
Objetivos.....	23
Material e métodos.....	24
Resultados.....	30
Discussão.....	45
Conclusão.....	51
Referências Bibliográficas.....	52
Anexo I – Produção científica.....	67
Anexo II – Certificado de autorização para uso de animais em pesquisa.....	68
Anexo III - Declaração de direito autoral.....	69

1. Introdução

1.1. A resposta imune e a imunoterapia no câncer

O câncer é a principal causa de morte em países desenvolvidos. Estima-se que serão 22,3 milhões de novos casos em 2030 comparados a 12,7 registrados em 2008 (BRAY et al., 2012). Contudo, as terapias convencionais falham em tratar adequadamente a maioria dos tumores e apenas 5% das drogas desenvolvidas para o tratamento do câncer que entram na fase de testes clínicos chegam efetivamente ao mercado, resultando em uma terapêutica insuficiente e potenciais alvos sem tratamento (COLLINS et al., 2006). Em razão desta grande necessidade, esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de novas estratégias para tratamento da doença. A imunoterapia é agora uma abordagem estabelecida para tratamento de vários tipos de tumores, quer isoladamente ou em combinação com outras opções de tratamento (GEORGOUDAKI et al., 2016). Tem crescido o interesse pela vacina com células dendríticas - DCs (DCV) (KIMURA et al., 2012; OKAMOTO et al., 2016), que apresenta potente capacidade de induzir linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos contra antígenos tumorais. Esse tratamento tem se mostrado promissor em combinação com a quimioterapia convencional (KIMURA et al., 2012), entretanto, como tratamento para tumores sólidos, a imunoterapia baseada em DC não foi tão eficaz como esperado.

O microambiente tumoral (*tumor microenvironment* - TME) é uma estrutura complexa que influencia a progressão do tumor, promovendo seu desenvolvimento e disseminação metastática. As células infiltrantes do TME incluem linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (*cytotoxic T lymphocytes* - CTLs) e células *natural killer* (NK), fundamentais para a resposta do sistema imunológico contra as células tumorais (OSTRAND-ROSENBERG e SINHA, 2009; YANG et al., 2010; SHIELDS et al., 2010). Entretanto, são encontradas também (e predominantemente) no TME, células supressoras, como células T regulatórias (Treg), um subtipo de linfócito T CD4⁺ capaz de suprimir as respostas imunes (FRYDRYCHOWICZ et al., 2017), e células mieloides imaturas com capacidade supressora (*myeloid-derived suppressor cells* - MDSCs) (OSTRANDROSENBERG et al., 2012). O número de MDSCs está elevado em virtualmente todos os pacientes e animais experimentais com malignidades. Essas células contribuem para o crescimento do tumor através da promoção de angiogênese (YANG et al., 2004) e da inibição tanto da resposta imune inata – reduzindo, por

exemplo, a citotoxicidade de células NK (LI et al., 2009; ELKABETS et al., 2010) – quanto da adaptativa. MDSCs inibem diretamente a ativação e função de células T através da produção de arginina 1 e espécies reativas de oxigênio (ROS) (EZERNITCHI et al., 2006; NAGARAJ et al., 2010), prejudicam a migração dessas células a partir dos linfonodos (HANSON et al., 2009), inibem a migração intratumoral de CTLs (MOLON et al., 2011) e promovem a expansão de Treg (HUANG et al., 2006; PAN et al., 2009; SERAFINI et al., 2008). Além desses mecanismos, que afetam diretamente linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, evidências mostram que o *cross-talk* MDSC-Célula Dendrítica (DC) pode ser ao menos parcialmente responsável pela disfunção das DCs comumente associada ao câncer.

DCs são células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APCs) que exercem um papel fundamental na tumorigênese (LUNDGREN et al., 2017). A principal função dessas células é processar e apresentar antígenos para ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺. Esses linfócitos possuem a capacidade de controlar o desenvolvimento do câncer, seja através da indução apoptótica ou da disfunção do estado e energia das células tumorais, e atualmente são alvos de estudo em aplicações imunoterapêuticas (SHANKARAN et al., 2001; KLEMM et al., 2015).

Apenas DCs são capazes de ativar linfócitos T naïve e direcionar o perfil de resposta para T helper (Th) 1, Th2, Th17 ou Th9 (LEVIN et al., 1993; GUERMONPREZ et al., 2002; SHORTMAN et al., 2002; EMMER et al., 2006; HEATH et al., 2009; HUANG et al., 2010; LU et al., 2012). As Ths são originadas a partir das células T CD4⁺ e são responsáveis por mediar as respostas humoral e celular. A diferença entre a Th1 e Th2 está nas citocinas secretadas (MOSMANN et al., 1986). A principal citocina secretada pela Th1 é INF γ , responsável pela ativação de macrófagos, enquanto Th2 secreta interleucina-4 (*Interleukin-4* - IL-4), IL-5, IL-10 e IL-13, que por sua vez induzem a produção de imunoglobulina E (IgE), o recrutamento de eosinófilos e a remoção de parasitas (SZABO et al., 2003; ANSEL et al., 2006). A Th17 é responsiva a infecções bacterianas e fúngicas e secretam IL-17a, IL-17f, IL-22 e IL-21 (HARRINGTON et al., 2005; PARK et al., 2005; WEAVER et al., 2007). Já a Th9 expressa principalmente IL-9, que estimula a proliferação celular e previne apoptose (PERUMAL & KAPLAN, 2011).

As DCs ativadas (maduras) expressam moléculas coestimulatórias (CD80 - *Cluster of differentiation 80*, CD86 e CD40), complexo principal de

histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC) de classes I e II e produzem citocinas, sendo a IL-12, mais especificamente, responsável pela diferenciação de CTLs, que promovem defesa contra infecções virais, patógenos intracelulares e células tumorais, e células Th1, que suprimem o crescimento tumoral (BALKWILL e MANTOVANI, 2001). As proteínas de superfície CD80 e CD86, presentes na membrana plasmática das APCs, se ligam à proteína de superfície CD28 na membrana plasmática dos linfócitos T aumentando a aderência da APC; assim como a CD40 se liga à CD40L da célula T, resultando na transdução de sinal desencadeada pelo reconhecimento do MHC pelo receptor de célula T, presente na superfície desses linfócitos (*T cell receptor* – TCR) (LINSLEY et al., 1993). As DCs em estado de repouso que não atuam como sentinelas são consideradas imaturas, sendo a maior característica dessa condição a alta taxa de endocitose, o que ocorre comumente em seu estado normal (SALLUSTO et al., 1995). DCs maduras não são tão eficientes na captura de antígenos, porém são melhores em estimular a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (YOUNG et al., 1990). Por outro lado, as DCs maduras ou imaturas podem estar em um estado tolerogênico, quando participam da aplicação da tolerância central e periférica, induzindo uma resposta supressora (com diferenciação de linfócitos Treg, por exemplo) (YOGEV et al., 2012; ZLOTNIKOV-KLIONSKY et al., 2015). Em muitos pacientes com câncer, entretanto, o número de DCs maduras está reduzido e a função dessas células é deficiente.

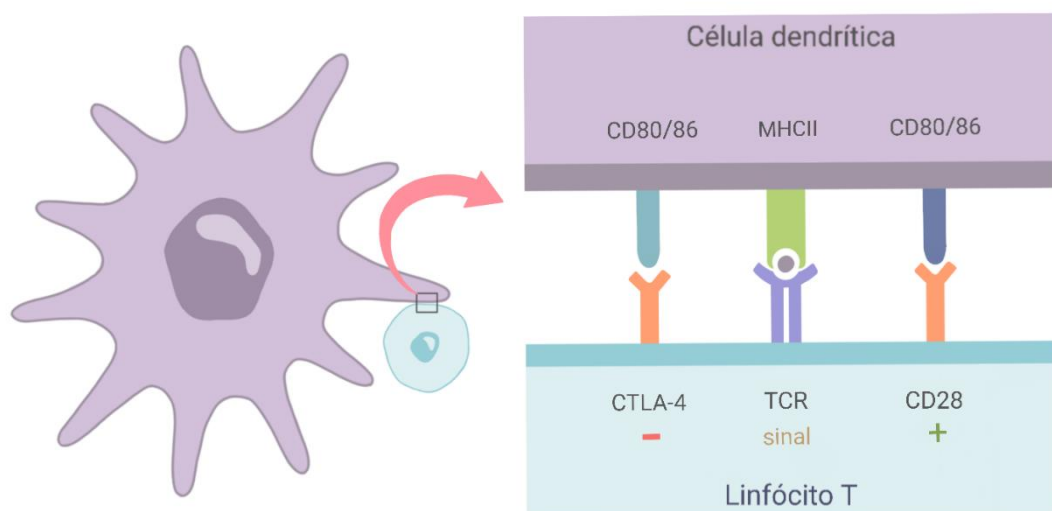


Fig. 1. Representação esquemática da DC aderida a um linfócito T mostrando a interação entre suas proteínas de membrana responsáveis pela transdução de sinais. Ilustração do próprio autor.

DCs com função defeituosa foram encontradas em muitos pacientes com uma variedade de cânceres, assim como na maioria dos camundongos com tumores transplantados ou espontâneos (GABRILOVICH, 2004; BELLONE et al., 2006; LEE et al., 2006; ORMANDY et al., 2006; PERROT et al., 2007; PINZON-CHARRY et al., 2007). O TME perturba sistemicamente o processo de ativação das DCs, aumentando o acúmulo de DCs imaturas (GABRILOVICH, 2004). Como resultado, essas células falham em ativar células T tumor-reativas e/ou tornam-se tolerogênicas. DCs infiltrantes do tumor (TIDC) mostram uma complexa variação fenotípica e foi reportado que TIDCs estão correlacionadas com pobre prognóstico no câncer quando expressam o marcador de DC imatura CD1a, ou podem ser benéficas para o prognóstico do câncer quando expressam os marcadores de DC madura DC-LAMP ou CD83 (CHAPUT et al., 2008). Lundgren et al. (2017) demonstraram que uma alta infiltração de DCs maduras em estado tolerogênico prediz, independentemente de outros fatores, uma curta sobrevivência de pacientes com adenocarcinoma periampolar. Múltiplas condições e fatores no TME, incluindo hipóxia, acúmulo de ácido lático e de adenosina, causam anormalidades nas DCs (revisão em GABRILOVICH; OSTRAND-ROSENBERG; BRONTE, 2012). Portanto, fármacos que modulem as DCs para um perfil ativo e as tornem mais resistentes e menos responsivas ao ambiente supressor do TME podem ser imunoadjuvantes úteis no tratamento de tumores.

Existe o desejo de encontrar tratamentos mais específicos para o câncer, que minimizem os danos às células saudáveis. As imunoterapias aproveitam o poder e a especificidade do sistema imunológico (particularmente do sistema imunológico adaptativo), manipulando a resposta imune para atacar tumores (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011; PALUCKA; BANCHEREAU, 2012; PARDOLL, 2012; RESTIFO; DUDLEY; ROSENBERG, 2012). A última década assistiu a uma grande expansão no número de imunoterapias experimentais contra o câncer testadas em ensaios clínicos (OSTRAND-ROSENBERG et al., 2012). Devido à capacidade das DCs de controlar a imunidade e a tolerância imune, e sua função em ligar as respostas imunes inata e adaptativa, as DCs se tornaram um alvo promissor nos esforços para gerar resposta imune contra várias formas de câncer (PALUCKA; BANCHEREAU, 2012). DCs pulsadas com peptídeos sintéticos derivados dos antígenos tumorais conhecidos (vacinas de DCs – DCVs) têm potente capacidade de induzir CTLs

específicas contra antígenos tumorais (MAYORDOMO et al., 1995; THURNER et al., 1999), além de ser importantes para inibir a supressão imune associada ao tumor causada pelos agentes quimioterapêuticos clássicos. DCVs parecem adequadas para enfrentar os desafios impostos pelo ambiente tumoral e, conseqüentemente, tem havido muito entusiasmo em torno do seu uso como adjuvante terapêutico no câncer (EAGLES et al., 2018; SITKOVSKY e OHTA, 2005; PALUCKA et al., 2011; KIMURA et al., 2012; RADFORD et al., 2014).

Entretanto, como tratamento para tumores sólidos, a imunoterapia baseada em DC não foi tão eficaz como esperado e vários relatos mostram que obstáculos devem ser superados antes que a imunoterapia baseada em DC possa ser usada como uma estratégia eficaz (NESTLE; FARKAS; CONRAD, 2005). Uma das maiores dificuldades em relação ao tratamento de tumores avançados parece ser que as células do TME, como as MDSCs e Treg, suprimem a resposta imune antitumoral do paciente. Além disso, Lundgren et al (2017) destacam a importância de levar em consideração o fenótipo das DCs (madura ou tolerogênica) na avaliação do resultado de ensaios clínicos com DCV. Assim, para um melhor resultado da DCV, tem sido sugerido o desenvolvimento de imunoterapias melhoradas baseadas em DC, que possam desviar da supressão do TME (JUNG et al., 2018).

Portanto, dois aspectos relevantes e com potencial para melhorar a eficácia da DCV são a obtenção de DCs com perfil morfológico e funcional maduro e que seja duradouro e resistente ao TME, bem como uma maior capacidade de provocar resposta linfocitária competente. Fármacos que induzam essas características podem ser imunoadjuvantes úteis no tratamento do câncer utilizando vacina de DCs.

1.2. O sildenafil como um agente imunomodulador e antitumoral

Confrontados com os custos para desenvolvimento de novos medicamentos, os pesquisadores estão procurando maneiras de reaproveitar os antigos. Pegar medicamentos que foram desenvolvidos para um distúrbio - e até mesmo alguns que fracassaram nos testes iniciais - e “reposicioná-los” para tratar outra doença é uma estratégia crescente na indústria e na academia (NOSENGO, 2016; PEIXOTO; NUNES; RAPÔSO, 2017). Os inibidores de fosfodiesterase (PDE-Is) são drogas que bloqueiam a atividade de uma ou mais das 12 isoformas de PDE (enzimas que

degradam os nucleotídeos cíclicos), modulando, assim, os níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). A PDE5 age principalmente na via de sinalização óxido nítrico (NO)/GMPc; a administração de PDE5-Is seletivos aumenta os níveis de GMPc, com efeitos em múltiplos órgãos e sistemas (HARTELL, 1996; PUERTA et al., 2009).

A enzima solúvel óxido nítrico sintetase (NOS), encontrada primeiramente em macrófagos, é a responsável pela síntese de NO a partir do aminoácido arginina; o NO se liga à guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte GTP (trifosfato de guanosina) em GMPc (RALL et al., 1958; HIBBS et al., 1988; MARLETTA et al., 1988; HEVEL et al., 1991). As transduções de sinais envolvidas na via de sinalização NO/GMPc são responsáveis pelos seguintes efeitos: relaxamento do músculo liso e regulação da pressão arterial, agregação e desagregação de plaquetas, neurotransmissão periférica em nervos não adrenérgicos e não colinérgicos e nos processos de depressão a longo prazo (WARNER et al., 1994; IVANOVA et al., 1994). Os componentes da via, GCs, NO e GMPc, podem influenciar na transformação de células normais em células tumorais e/ou auxiliar na progressão do tumor. Foi observado que a inibição de GCs diminui os níveis de GMPc e aumenta a apoptose em células de câncer de ovário através da regulação do gene que transcreve a proteína de supressão tumoral *p53*, e a alta concentração de NO foi responsável por criar um ambiente carcinogênico e induzir mutações no DNA, mais especificamente no gene que codifica a *p53* (AMBS et al., 1997; FRASER et al., 2006).

Até o momento, quatro PDE5-Is foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA): sildenafil, vardenafil, tadalafil e avanafil. A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou também o Lodenafil (HALLEVA®, Cristália), que foi desenvolvido no Brasil. O sildenafil foi o primeiro dos PDE5-Is a ser desenvolvido, no final dos anos 80 pela Pfizer. Ele foi originalmente planejado como um tratamento para *angina pectoris* e entrou nos primeiros testes clínicos em 1991 (NOSENGO, 2016; GHOFRANI; OSTERLOH; GRIMMINGER, 2006). Entre os efeitos colaterais relatados nesses estudos iniciais estavam ereções penianas. Naquela época, não havia tratamentos medicamentosos por via oral para a disfunção erétil; portanto, como o interesse em usar sildenafil para angina diminuiu, os primeiros testes em disfunção erétil foram iniciados em 1993. Esses testes foram bem-sucedidos e o sildenafil,

comercializado como Viagra® (Pfizer), foi aprovado pela FDA e EMA em 1998 (PANTZIARKA et al., 2018). Sob o nome comercial de Revatio® (Pfizer), também foi aprovado para terapia de hipertensão arterial pulmonar em junho de 2005 (ZHAO et al., 2002; GALIÈ et al., 2005) e, mais recentemente, para o fenômeno de Raynaud (ROUSTIT et al., 2013; FRIES; SHARIAT; WILMOWSKY, 2005). Está sendo testado atualmente para tratamento de hipertrofia cardíaca (SANDNER et al., 2007) e doenças neurodegenerativas e autoimunes (revisão em PEIXOTO; NUNES; RAPÔSO, 2017). Portanto, o sildenafil é uma clássica história de sucesso de reposicionamento.

Dados emergentes nos campos da farmacologia do câncer e da imunoterapia sugerem que os PDE5-Is podem ser agentes antitumorais eficientes, que atuam por diferentes mecanismos. O tratamento com sildenafil foi associado à melhora da sobrevida e reduziu em 50% o risco de desenvolver câncer colorretal em camundongos (ISLAM et al., 2017) e aumentou a eficácia da doxorrubicina no tratamento de câncer de próstata (DAS et al., 2016). O acúmulo de GMPc, como consequência da inibição da PDE5 pelo sildenafil, foi associada a uma alteração na atividade desse nucleotídeo cíclico, que se correlacionou com a indução da apoptose em células tumorais (PIAZZA et al., 2001).

Serafini et al primeiro delinearam os efeitos imunomoduladores dos PDE5-Is em relação ao câncer em 2006. Eles mostraram que, em vários modelos murinos, o tadalafil e o sildenafil atrasaram significativamente o crescimento do tumor em camundongos imunocompetentes, mas não em camundongos imunocomprometidos. Estudos posteriores demonstraram que o sildenafil melhorou a resposta das células T tumor-específicas, aumentou a infiltração e a ativação de células T CD8⁺ intratumorais e reduziu o número de linfócitos Treg específicos para tumores (revisão em PANTZIARKA et al., 2018). Também foi demonstrado que o sildenafil modulou o ambiente supressor do TME através da regulação negativa de populações MDSC, aumentando a imunidade antitumoral e inibindo o desenvolvimento de tumores e o surgimento de metástases (SERAFINI et al., 2006; CAPUANO et al., 2009; LIN et al., 2017). Booth et al. (2017) mostraram que a combinação de sildenafil e pemetrexede aumentou a morte celular mediada pelo sistema imunológico em um modelo de carcinoma de pulmão Lewis singênico em camundongo. O tratamento em combinação também aumentou a eficácia antitumoral dos anticorpos inibidores de *checkpoint*

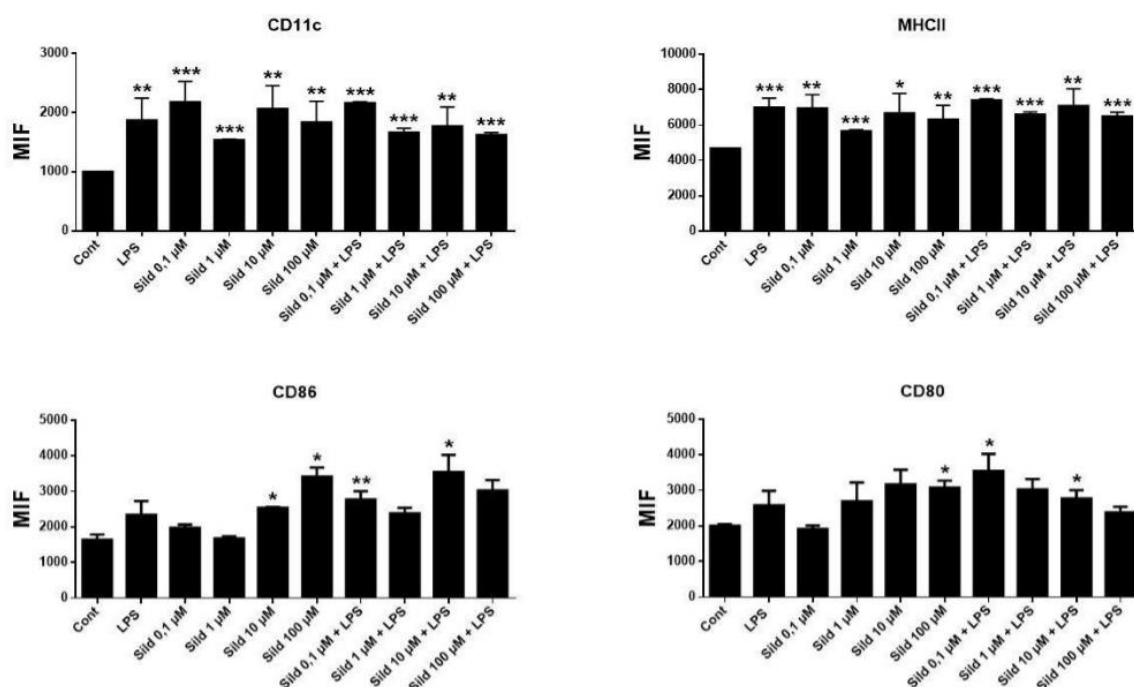
dirigidos contra Proteína 1 de morte celular programada (PD-1) ou contra antígeno associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4).

Diante desses resultados, vários estudos sugerem o uso de PDE5-Is em combinação com a quimioterapia tradicional para tratamento do câncer (MEYER et al., 2011; BOOTH et al., 2015; CONFINO et al., 2016). Entretanto, ainda há muito a ser esclarecido quanto aos efeitos dos PDE-Is na imunidade antitumoral, para uma melhor aplicação dessa classe de fármacos no contexto do câncer. Nesse âmbito, apesar dos relatos da ação do sildenafil sobre a resposta de células T, induzindo perfis citotóxicos a despeito de células Treg, não há nenhum trabalho, até onde sabemos, descrevendo o efeito do sildenafil sobre as DCs, que são células determinantes do fenótipo dos linfócitos T. Portanto, mais estudos são necessários para determinar o papel das DCs no efeito antitumoral dos PDE-Is, o que poderá apontar para outras aplicações, por exemplo, como adjuvantes na terapia com DCVs.

Estudos recentes do nosso grupo e de outros grupos de pesquisa por todo o mundo demonstram que o sildenafil tem um efeito anti-inflamatório, principalmente sobre a neuroinflamação (revisão em PEIXOTO; NUNES; RAPOSO, 2017). Surpreendentemente, no contexto do câncer tem sido relatado um aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6, VEGF, S100A9) (MEYER et al., 2011); no TME, os efeitos desses PDE5-Is são a favor de uma redução da supressão da resposta inflamatória. Nós hipotetizamos que esse efeito no TME poderia ser uma consequência da ativação de DCs pelo sildenafil. Antes de propor essa investigação, consideramos importante obter alguns resultados preliminares, a fim de constatar se o sildenafil seria capaz de ativar DCs para um perfil maduro, e se essas DCs moduladas seriam funcionais quando transferidas adotivamente para camundongos. Os experimentos preliminares realizados demonstraram que o fármaco induziu, de fato, um fenótipo ativado/maduro das DCs. O sildenafil, associado ou não com LPS (100 ng/mL), elevou a expressão dos marcadores de superfície CD11c e MHCII. O tratamento com sildenafil também aumentou a expressão de proteínas coestimulatórias, CD86 e CD80. Esses resultados indicaram que o sildenafil era capaz de ativar as DCs, induzindo um fenótipo maduro (**Fig. 2**).

Era necessário, entretanto, verificar se DCs ativadas pelo sildenafil *in vitro* seriam funcionais. Uma vez que o modelo de infecção sistêmica com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um modelo padronizado em nosso laboratório,

animais submetidos a essa infecção fúngica foram utilizados nesses ensaios preliminares. Os resultados demonstraram que DCs tratadas com sildenafil e transferidas adotivamente (via intravenosa) para camundongos infectados com Pb foram eficientes em combater o fungo, reduzindo significativamente as unidades formadoras de colônia isoladas do fígado dos animais infectados (**Fig. 3**).



Análise preliminar, por citometria de fluxo, de DCs geradas a partir de precursores da medula óssea e tratadas *in vitro* com sildenafil (Viagra®, Pfizer), por 24 h, nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µM. *P<0.05, **P<0,01 e ***P<0.001, em comparação com o grupo controle (Cont – DCs, que não receberam nenhum estímulo). (Oneway Anova/Bonferroni; GraphPad Prism). LPS foi usado como controle positivo de ativação das DCs. MFI = Intensidade Média de Fluorescência.

O Pb sintetiza antígenos metabólicos que interagem com o sistema imune do hospedeiro, provocando uma resposta imunológica altamente complexa e multifatorial (BENARD, 2008). Estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos inatos e adaptativos de defesa na determinação da resistência ao Pb (MENDES-GIANNINI et al., 2008; CALICH et al., 2008). A importância da resposta Th1 na Paracoccidioidomicose (a micose sistêmica humana cujo agente etiológico é o Pb) foi demonstrada, *in vivo*, pelo desenvolvimento de doença disseminada em paciente portador de deficiência congênita do receptor de IL-12/IL-23 (MORAES-VASCONCELOS et al., 2005), citocinas essenciais também para a resposta

antitumoral por Th1. Portanto, embora a resposta antifúngica siga algumas vertentes diferentes da resposta antitumoral, há também pontos de intersecção, o que nos encorajou a continuar a investigação no contexto do câncer.

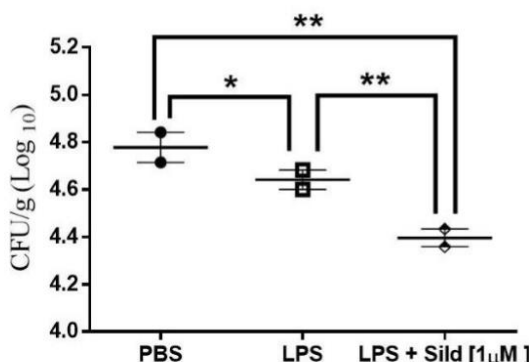


Fig. 3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) em fígado de animais infectados com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18), que receberam tratamento profilático por transferência adotiva de células dendríticas (DCs). 5×10^5 DCs previamente moduladas com LPS (100 ng/mL) + sildenafil (1 μ M) foram inoculadas, através do plexo retro orbital, em camundongos C57BL6/J. Outros animais receberam DCs moduladas com LPS (100 ng/mL; controle positivo) ou receberam apenas PBS (não receberam DCs; controle negativo). Após 4 dias, 106 leveduras de Pb18 foram inoculadas pela mesma via. 10 dias após a inoculação do fungo, os animais foram eutanasiados e o fígado, homogeneizado e mantido em placas de Petri durante 10 dias, quando foi feita a contagem das Unidades Formadoras de Colônia. Os resultados demonstraram que animais tratados com DCs estimuladas com LPS + Sild tiveram um número significativamente menor de CFU, em comparação com os animais que receberam DCs moduladas pelo LPS ou que receberam apenas PBS, demonstrando que DCs moduladas pelo sildenafil apresentam melhor eficácia terapêutica. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (one way anova/Bonferroni; GraphPad Prism).

Diante desses resultados preliminares, foi levantada a hipótese de que o sildenafil poderia induzir um perfil maduro de DCs, que direcionaria a resposta de células T em modelo de câncer. Esse mecanismo poderia ser responsável, em grande parte, pelos efeitos sobre a imunidade antitumoral observados em estudos prévios que utilizaram injeção sistêmica de sildenafil. A hipótese, se confirmada, apontaria para o uso de uma terapia celular com DCs moduladas pelo sildenafil e transferidas adotivamente para o paciente, como mais adequada do que a injeção sistêmica do fármaco, considerando que o mesmo também possui ação anti-inflamatória, o que não é interessante no contexto da terapia anticâncer.

1.3. Diferenciação de células dendríticas a partir dos precursores comuns da medula óssea

Células tronco hematopoiéticas (*Hematopoietic stem cells* - HSC) são encontradas na medula óssea e podem dar origem a DCs, macrófagos e eritrócitos (SEITA et al., 2010). As DCs podem ser diferenciadas a partir dos precursores comuns de DCs, progenitores linfoides e monócitos do sangue em condições inflamatórias, e seus subtipos são separados em três grandes grupos: plasmocitoide (pDC), convencional (cDC) e inflamatória (infDC) (COLLIN et al., 2018; MERAD et al., 2013; MILDNER et al., 2014; SCHLITZER et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018). Esses subtipos possuem diferentes moléculas coestimulatórias (marcadores de superfície), que resultam da diferenciação e guiam os eventos da resposta imune (SEGURA et al., 2016; STAINMAN et al., 1980).

Sabe-se que a diferenciação celular pode ser diretamente afetada por alguns fatores químicos e físicos, como os fatores de estimulação de colônias (CSF), temperatura e gravidade (NA et al., 2016; MASIELLO et al., 2018; MACE et al., 2011). Existem diversas alternativas na metodologia de diferenciação de DCs *in vitro* a partir das células derivadas da medula óssea (BMDC). O uso do fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é o mais recorrente em protocolos (INABA et al., 1992; XU et al., 2007; LACEY et al., 2012). Também é sabido que a concentração de GM-CSF influencia diretamente na porcentagem e no perfil das células diferenciadas (NA et al., 2016; MARIM et al., 2010).

L929, uma linhagem de fibroblasto, é conhecida por secretar ambos M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) e GM-CSF em diferentes concentrações (ENGLER et al., 1995). Alguns protocolos indicam o uso de meio de cultura condicionado com o sobrenadante de L929 para diferenciar macrófagos (BOLTZ-NITULESCU et al., 1987; TROUPLIN et al., 2013). Porém, não existe nenhum protocolo específico que mostre a mesma atividade com foco em DCs, mesmo sendo de conhecimento comum a produção de GM-CSF por essa linhagem específica. A concentração de 10 ng/mL de GM-CSF é a mais comumente usada para diferenciar DCs (NA et al., 2016). Por outro lado, o meio de cultura condicionado com 30% de sobrenadante de L929 é o método mais utilizado para diferenciar macrófagos. A

concentração dessas substâncias pode influenciar o tipo celular diferenciado, bem como a sua função (SUN et al., 2018; NA et al., 2016), entretanto a literatura é rarefeita a esse respeito. Conhecer essas propriedades e nuances da diferenciação de DCs e macrófagos é essencial na obtenção de um modelo experimental validado e confiável para o desenvolvimento de novas terapias focadas na modulação da resposta imune. Portanto, a nossa hipótese com relação à metodologia de diferenciação de DCs foi de que o GM-CSF e sobrenadante de L929 resultaria em perfis fenotípicos e percentuais populacionais distintos de DCs.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do sildenafil (Viagra®, Pfizer) como um adjuvante em vacina de DCs (DCVs) contra adenocarcinoma mamário (EO771). Paralelamente, para padronização de um modelo experimental mais adequado, foi caracterizado o efeito do GM-CSF e do sobrenadante de L929 na diferenciação de DCs.

2.2. Objetivos Específicos

Diferenciação das DCs: tratar as células precursoras da medula óssea de camundongos com concentrações diferentes de GM-CSF e do sobrenadante de L929 e avaliar/comparar:

- A expressão de MHC-II, CD11c e F4/80, utilizando citometria de fluxo;
- As populações CD11c⁺MHC-II⁺ (perfil característico de DCs) entre os grupos de tratamento;
- A presença das populações de F4/80 (marcação característica de macrófagos) entre os grupos de tratamento.

Modulação das DCs e análise fenotípica e funcional: tratar as DCs com sildenafil (Viagra®, Pfizer) e/ou lisado celular da linhagem de adenocarcinoma mamário EO771, bem como cultivar as DCs moduladas em sistema de cocultura com linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ totais do baço de camundongos e avaliar/comparar:

- A expressão de MHC-II, CD11c e CD80, utilizando citometria de fluxo;
- A secreção de IL-10, IL-1 β e TNF- α , através da dosagem de citocinas pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay);
- As populações de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁺CD8⁺;
- As populações de EO771 viáveis em cocultura com DCs e/ou linfócitos.

3. Material e métodos

3.1. Reagentes

Os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e os anticorpos, da eBioscience (Affymetrix - Santa Clara, CA, EUA). Os kits de dosagem de citocinas foram adquiridos da R&D (Mineápolis, MN, EUA). O Viagra® (Pfizer) foi adquirido comercialmente, macerado, dissolvido em solução salina estéril e filtrado imediatamente antes do uso.

3.2. Animais

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios de Ética em Pesquisa Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, com a aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa sobre o Uso de Animais (CEUA/UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas; número do protocolo: 5074-1/2018). Neste estudo, foram usadas fêmeas de camundongos C57BL/6, com 6–8 semanas de idade provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – UNICAMP. Os animais foram mantidos em condições livres de germes patogênicos específicos, num ambiente com temperatura e fotoperíodo controlado, com água e alimento autoclavados *ad libitum* durante o experimento. Os camundongos foram mantidos no Biotério de Animais SPF (*Specific Pathogen Free*), Área de Imunologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Instituto de Biologia, UNICAMP).

3.3. Diferenciação das DCs com fatores de estímulo de crescimento de colônias

3.3.1. L929 Supernatant

2×10^6 células de L929 foram colocadas em garrafas de cultura. O sobrenadante foi coletado no segundo dia após a confluência total. O pH foi mensurado e o sobrenadante de 10 garrafas foram utilizados para definir as concentrações de condicionamento (v-v 1%, 5%, 10% e 25%)

3.3.2. Diferenciação de DCs a partir de precursores da medula óssea

Após a eutanásia dos animais, que foi realizada por overdose de anestésico (300 mg/kg de ketamina + 30 mg/kg de xilazina, i.p.), células precursoras da medula óssea foram coletadas dos fêmures e tíbias dos camundongos, utilizando seringa e agulha de calibre 26G, conforme protocolo estabelecido por LUTZ et al. (1999). Após centrifugação (1500 rpm, 4°C por 10 min), as células foram contadas e foram transferidas 2×10^5 para cada poço de tratamento contendo meio de cultura IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) condicionado, ou seja, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 mg/mL de L-glutamina, penicilina e estreptomicina (Gibco Inc., Billings, MT, USA) e suplementado com GM-CSF (1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL ou 25 ng/mL) ou sobrenadante de L929 (v/v: 1%, 5%, 10% ou 25%). A cultura foi incubada por sete dias à 37°C, em estufa com 5% de CO₂. O controle do experimento é o grupo que não recebeu nenhum tipo de exposição à ambos os fatores de diferenciação. A cada dois dias, 40% do meio de cultura foi descartado e substituído por um novo. O processo de diferenciação celular foi acompanhado por imunomarcagem (CD11c⁺MHC-II⁺ - descrição dos anticorpos no próximo tópico) e análise por citometria de fluxo em dois experimentos independentes utilizando triplicatas.

3.3.3. Análise das populações por citometria de fluxo

Após o teste de viabilidade por Azul de Trypan (Sigma), os poços de tratamento foram individualmente homogeneizados em 1 mL de PBS estéril (salina tamponada com fosfato 0.02 M) para lavar e remover o meio de cultura. A imunomarcagem foi realizada com os seguintes anticorpos: anti-F4/80 (Clone BM8, PE-Cy7, #25-4801-82), anti-MHCII (Clone M5/114.15.2, PerCP Cy5.5, # 107626) e anti-CD11c (Clone N418, APC, # 117310). As amostras foram incubadas por 30 min (4° C em câmara escura), em seguida foram fixadas com paraformaldeído 1%, lavadas para retirar o excesso do fixador e ressuspensas para a aquisição. 20.000 eventos foram adquiridos de cada amostra no citômetro de fluxo (FACS Verse – BD Biosciences localizado no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, UNICAMP) e os dados foram analisados no software FlowJo VX.

3.4. Modulação das DCs

3.4.1. Modulação de DCs pelo sildenafil

Após os sete dias de diferenciação das DCs, seguindo a metodologia mencionada no item 3.3.2. com a concentração de 10 ng/mL de GM-CSF, o meio de cultura foi substituído por meio IMDM completo (contendo 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina) e as culturas, separadas em cinco grupos de acordo com o tratamento recebido:

- **Controle negativo (C)** – Na ausência de qualquer estímulo;
- **Controle positivo (LPS)** – As células foram expostas a LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* - cepa 026:B6/ 100ng/mL, Sigma) + lisado (10 x 10⁵ células tumorais da linhagem de adenocarcinoma mamário EO771 lisadas);
- **Controle lisado (Ly)** – As células foram expostas ao lisado tumoral de EO771;
- **Controle sildenafil (S)** – As células foram expostas ao sildenafil nas concentrações de 0.1, 1, 10 e 100 µM;
- **Sildenafil + lisado (S+Ly)** – As células foram expostas ao sildenafil, nas concentrações 0.1, 1, 10 e 100 µM e, concomitantemente, ao lisado tumoral.

As DCs foram incubadas com cada tratamento por 1 h e 24 h em estufa à 37°C contendo 5% de CO₂. Após a incubação, alíquotas dessas células foram coletadas e avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície e capacidade de apresentação de antígenos. Os sobrenadantes das culturas também foram coletados para análise da produção de citocinas secretadas pelas DCs, conforme procedimentos descritos abaixo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes para cada método descrito.

3.4.2. Análise de marcadores de superfície das DCs

Após os tratamentos, as células foram incubadas por 30 min, a 4°C, no escuro, com os anticorpos contra MHCII (clone M5/114.15.2, PE Cy7), CD11c (clone N418, APC) e CD80 (clone 16-10A1, FITC). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% e as preparações foram adquiridas em citômetro de fluxo (20.000 eventos/amostra) (FACS Verse – BD Biosciences localizado no Departamento de

Biologia Estrutural e Funcional, UNICAMP) e os dados foram analisados no software FlowJo VX.

3.4.3. Dosagem de citocinas por ELISA

Os sobrenadantes foram coletados e submetidos a ensaio para detecção de TNF- α (DY410-05), IL-1 β (DY401-05) e IL-10 (DY417-05), através do método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Esta caracterização foi realizada com o uso de kits de dosagem de citocinas da R&D Systems – DuoSet ELISA, segundo instruções do fabricante. A leitura foi feita em leitor de placas Thermo Scientific (Multiskan Go).

3.5. Análise das populações de linfócitos CD4+ e CD8+

Após a eutanásia dos animais, seus baços foram removidos com assepsia, transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura IMDM completo, diluídos com êmbolo de seringa e com o auxílio de peneira estéril e sedimentados por centrifugação. Foi usado o tampão de lise de células vermelhas ACK (0,15 M NH₄Cl, 1,0 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2) para eliminar as hemácias. Foi utilizado o método de separação de linfócitos por gradiente de Percoll com 2 densidades diferentes. Brevemente, as células totais do baço foram homogenizadas num tubo de centrífuga contendo o Percoll 30% e todo o volume foi passado delicadamente, com auxílio de uma pipeta pasteur, para outro tubo contendo o Percoll 70%. Posteriormente o tubo foi centrifugado a 450G, a 4°C por 30 min e o *pellet* entre os dois gradientes foi coletado, lavado com PBS e centrifugado novamente. Para análise do perfil de resposta celular de linfócitos T, uma alíquota de DCs (2×10^4 células/mL), já submetidas aos diferentes tratamentos descritos, foi colocada em cada poço de uma placa de 96 poços e, em seguida, foi adicionada uma alíquota de linfócitos T totais do baço (2×10^5 células/mL/poço) já separados (proporção 1:10 DC:T). Após o término da incubação, as células foram marcadas com anticorpos contra proteínas de superfície: anti-CD4 (clone RM4-4, PE Cy7) e anti-CD8 (clone 53-6.7, APC), fixadas com paraformaldeído 1% por 20 min e permeabilizadas com tampões comerciais da eBioscience.

Grupos de tratamento:

- **Célula dendrítica + Linfócitos (DC+L)** - As DCs foram mantidas em cocultura com os linfócitos totais do baço;
- **Célula dendrítica modulada com lisado tumoral + Linfócitos (DC (MLy)+L)**
- As DCs moduladas com lisado de EO771 foram mantidas em cocultura com os linfócitos totais do baço;
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 1 μ M + Linfócitos (DC (MS1) +L)**
- As DCs moduladas com sildenafil 1 μ M foram mantidas em cocultura com os linfócitos totais do baço;
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 10 μ M + Linfócitos (DC (MS10)+L)** - As DCs moduladas com sildenafil 10 μ M foram mantidas em cocultura com os linfócitos totais do baço;
- **Células dendríticas + linfócitos modulados com sildenafil 1 μ M (DC+L(MS1))** – As DCs foram mantidas em cocultura com os linfócitos totais do baço, modulados com sildenafil 1 μ M;
- **Células dendríticas + linfócitos modulados com sildenafil 10 μ M (DC+L(MS10))** – As DCs foram mantidas em cocultura com os linfócitos totais do baço, modulados com sildenafil 10 μ M;
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 1 μ M e lisado tumoral + Linfócitos modulados com sildenafil 1 μ M (DC (MS1Ly) +L(MS1))** – As DCs moduladas com sildenafil 1 μ M e lisado de EO771 foram mantidas em cocultura com linfócitos totais do baço modulados com sildenafil 1 μ M;
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 10 μ M e lisado tumoral + Linfócitos modulados com sildenafil 10 μ M (DC (MS10Ly) +L(MS10))** – As DCs moduladas com sildenafil 10 μ M e lisado de EO771 foram mantidas em cocultura com linfócitos totais do baço modulados com sildenafil 10 μ M.

3.6. Ensaio *Live and Dead* – linhagem EO771

Após a diferenciação das DCs (2×10^4 por poço) e exposição aos diferentes tratamentos, foi realizada a cocultura com linfócitos totais do baço (2×10^5) e EO771 (2×10^4) em placa de 96 poços. Após 72 h, as células foram marcadas com anticorpos contra proteínas de superfície anti-MHCII (Clone M5/114.15.2, PerCP Cy5.5) e anti-CD11c (Clone N418, APC), CD4 (clone RM4-4, PE Cy7), CD8 (clone 53-6.7, APC) e

Live and Dead (invitrogen - eBioscience, APC Cy7.7). Posteriormente, foi realizada análise por citometria de fluxo.

Grupos de tratamento:

- **Controle (C)** – As EO771 foram mantidas em cultura, sem nenhuma interferência.
- **Célula dendrítica (DC)** – As EO771 foram mantidas em cocultura com DCs não moduladas.
- **Célula dendrítica + linfócitos (DC+L)** – As EO771 foram mantidas em cocultura com DCs e linfócitos não modulados.
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 1 μ M (DC (MS1))** – As EO771 foram mantidas em cocultura com DCs moduladas com sildenafil 1 μ M.
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 10 μ M (DC (MS10))** – As EO771 foram mantidas em cocultura com DCs moduladas com sildenafil 10 μ M.
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 1 μ M e lisado (DC (MS1Ly))** – As EO771 foram mantidas em cocultura com DCs moduladas com sildenafil 1 μ M e lisado tumoral de EO771.
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 10 μ M e lisado (DC (MS10Ly))** – As EO771 foram mantidas em cocultura com DCs moduladas com sildenafil 10 μ M e lisado tumoral de EO771.
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 1 μ M + linfócito (DC (MS1) +L)** – As EO771 foram mantidas em cocultura com DCs moduladas com sildenafil 1 μ M e linfócitos.
- **Célula dendrítica modulada com sildenafil 10 μ M + linfócito (DC (MS10) +L)** – As EO771 foram mantidas em cocultura com DCs moduladas com sildenafil 10 μ M e linfócitos.

3.7. Análise estatística

O nível de significância foi analisado usando o teste de variância de uma via (*oneway* ANOVA) ou de duas vias (*twoway* ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnet. O teste t-student foi usado para comparar cada tratamento individual com o controle. O resultado foi demonstrado como a média $\pm$ erro padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Perfis populacionais oriundos dos tratamentos com GM-CSF ou sobrenadante de L929

Para análise do percentual de populações, as amostras foram marcadas com anti-MHCII, anti-CD11c e anti-F4/80 para realização de citometria de fluxo (n = 6 por grupo). Todos os experimentos seguiram as estratégias de *gating* mostradas na **Fig. 4**. Os dados sobre a expressão dos marcadores de superfície são mostrados na **Fig. 5**. Os resultados foram comparados com os dados do grupo GM-CSF 10 e L929 25%, um por ser o mais utilizado para diferenciar DCs e outro mais próximo da concentração utilizada para diferenciar macrófagos. Em Q1, a porcentagem de células MHCII⁺ em GM-CSF 25 ng/mL (10,03%) foi maior do que nos grupos controle (2,84%), GM-CSF

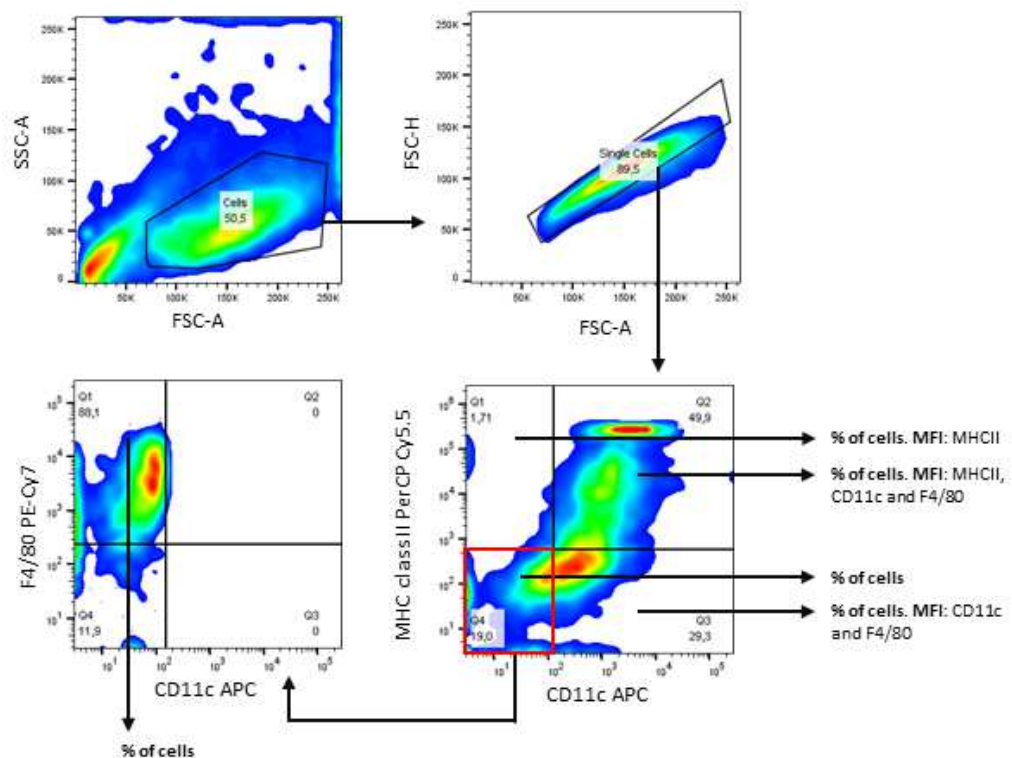


Fig. 4 Estratégia de gate: Cells> single cells > MHCII, CD11c. N = 6 por tratamento. Gate negativo (Q3) foi posteriormente preparado (F4/80⁺CD11c⁻) para mostrar a expressão de F4/80 nesse quadrante (Q1). A porcentagem (%) de células em todos os quadrantes foi analisada assim como o MFI (Intensidade de Fluorescência Média) de: MHCII (Q1 e Q2), CD11c (Q2 e Q3), F4/80 (Q2, Q3 e no *gate* posterior de F4/80+CD11c Q1).

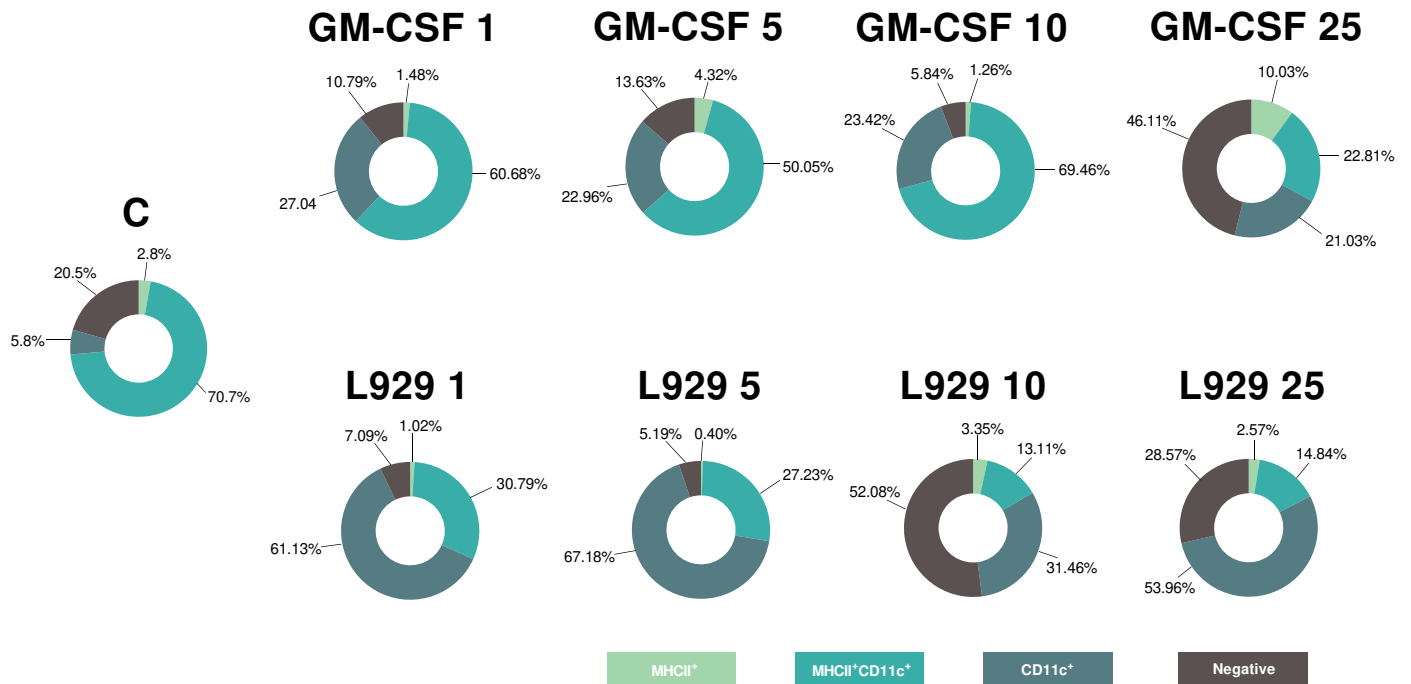


Fig. 5. Imagem representativa mostrando a porcentagem de células (%) em quatro quadrantes no *gate* MHCII/CD11c. GM-CSF 1 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng mostraram valores semelhantes na % da população de MHCII⁺CD11c⁺. A população negativa de GM-CSF 25 ng/mL mostrou valores semelhantes aos do L929 25%. O mesmo padrão foi observado na porcentagem populacional de CD11c⁺ em L929 1%, 5% e 25%, que apresentaram valores bem semelhantes, enquanto L929 10% teve um percentual menor. A maior porcentagem de MHCII⁺ foi encontrada em GM-CSF 25 ng/mL. Portanto, esses dados sugerem que o GM-CSF 10ng/mL é o mais indicado para induzir populações MHCII⁺CD11c⁺. Dados representativos de dois experimentos independentes totalizando um N=6 por tratamento.

10 ng/mL (1,26%) e L929 25% (2,57%). Em Q2, a porcentagem de células MHCII⁺CD11c⁺ (perfil mais característico de DCs) em L929 25% (14,84%) foi menor do que nos grupos controle (70,75%), GM-CSF 1 ng/mL (60,68%), 5 ng/mL (59,05%), 10 ng/mL (69,56%), L929 1% (30,73%) e 5% (27,23%). A porcentagem de células CD11c⁺, em L929 25% (53,96%) foi maior do que nos grupos GM-CSF 10 ng/mL (23,42%) e controle (5,85%). No quadrante negativo, a porcentagem de células em GM-CSF 25 ng/mL (46,11%) foi maior do que todos os grupos tratados com GM-CSF e mostram diferenças estatísticas quando comparados com GM-CSF 10 ng/mL (5,84%) e controle (20,55%). Esses resultados apontam os tratamentos com GM-CSF

10% como o mais eficiente em direcionar as células para um perfil apresentador de antígeno, com alta expressão de MHCII e CD11c; e os tratamentos com GM-CSF 10 ng/mL, L929 10% e 25%, como os menos eficientes em diferenciar células com perfil característico de DC, porém mais próximo do perfil de um macrófago pela elevada expressão de F4/80.

Na **Fig. 6**, a imagem representativa mostra a porcentagem da população de cada grupo. A média de 6 amostras foi utilizada para a construção do gráfico. A população de células MHCII⁺ em GM-CSF 25 ng/mL foi maior do que em todos os outros grupos de tratamento. A população de células MHCII⁺CD11c⁺ em GM-CSF 1 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL tem quase o mesmo valor, demonstrando que esses tratamentos parecem induzir igualmente células com característica de DCs; e os valores mais baixos foram encontrados em todos os grupos tratados com sobrenadante L929 e GM-CSF 25 ng/mL o que sugere que esses tratamentos não diferenciaram quantidades significativas de DCs. Todos os grupos tratados com GM-CSF mostraram porcentagem semelhante na população de células CD11c⁺ e foi menor do que as populações encontradas nos grupos L929 1%, 5% e 25%; entretanto, a presença de CD11c per se não significa que a célula se diferenciou em DC e nem que se trata de uma célula madura e capaz de apresentar antígenos. A população negativa não expressa nenhum desses marcadores de superfície (MHCII e CD11c) e os maiores percentuais dessa população foram encontrados nos grupos GM-CSF 25 ng/mL, L929 10% e 25%, sendo, portanto, esses os tratamentos menos eficientes em diferenciar DCs.

4.2. Intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores de superfície

As células progenitoras mieloides foram cultivadas *in vitro* durante 7 dias com diferentes concentrações de GM-CSF e sobrenadante L929 (n = 6). O MFI dos marcadores de superfície foi determinado por citometria de fluxo com anticorpos anti MHCII, anti CD11c e anti F4/80. No quadrante 1 (Q1) (**Fig.7**), o MFI de MHCII em L929 25% foi maior que o controle, GM-CSF 1 ng/mL, 5 ng/mL e 10ng/mL, mas os maiores valores foram encontrados em L929 1%, apontando esse tratamento como o mais eficaz em induzir células capazes de apresentar antígenos levando em consideração somente o MFI, porém como observado na **Fig. 6** a porcentagem dessa população é extremamente baixa. No Q2, a expressão de F4 / 80 (marcação característica de

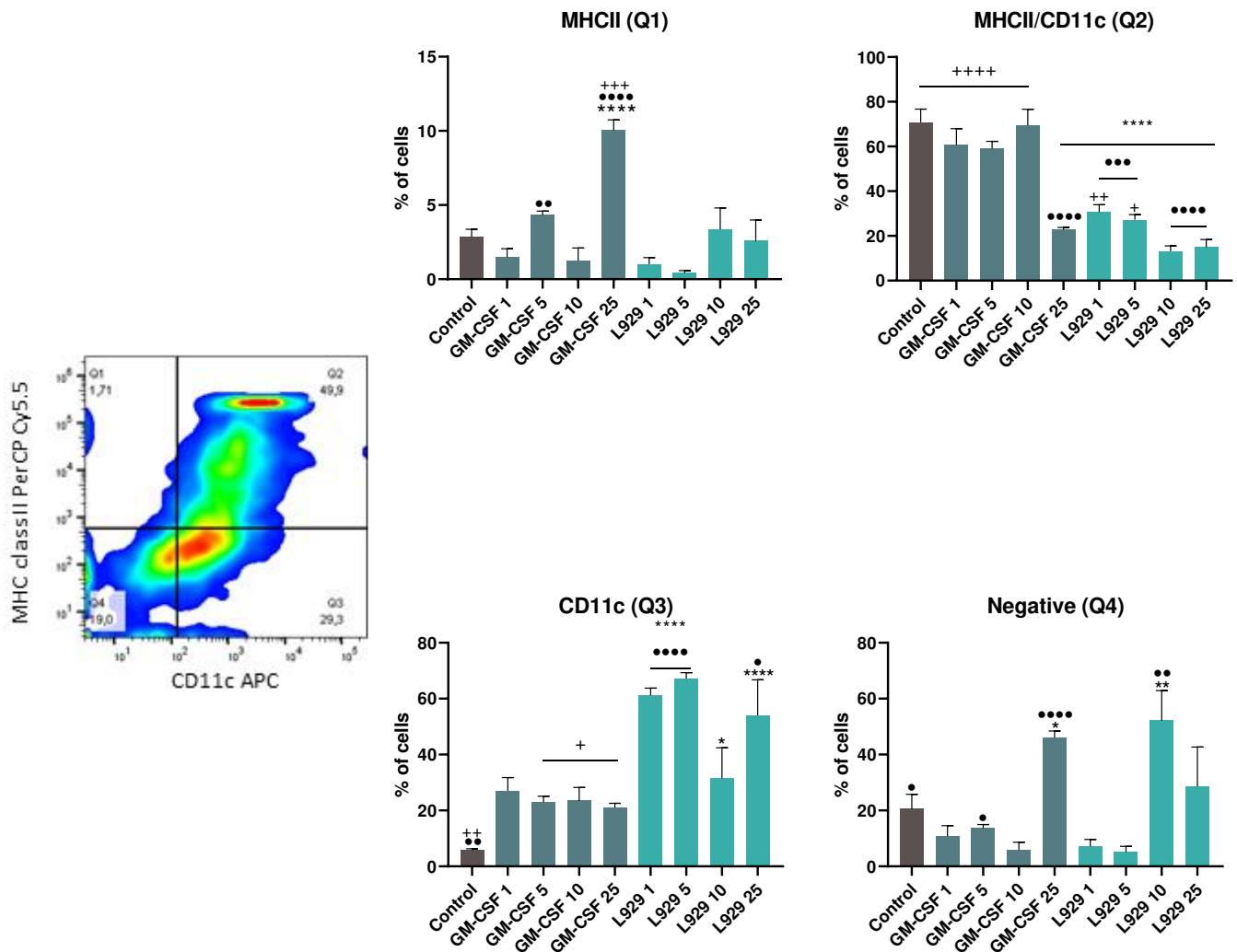


Fig. 6. O gráfico de barras mostra a porcentagem de células (%) em quatro quadrantes no *gate* MHCII/CD11c. No Q1, a porcentagem de células MHCII⁺ em GM-CSF 25% foi maior do que no controle, GM-CSF 10 ng/mL e L929 25%. Em Q2, a porcentagem de células em L929 25% foi menor do que no controle, GM-CSF 1-10 ng/mL, L929 1 e 5%. No Q3, a porcentagem de células que expressam CD11c em L929 25% foi maior do que o GM-CSF 10 ng/mL e controle. E no quadrante negativo a porcentagem de células em GM-CSF 25% foi maior do que todos os grupos GM-CSF e mostrou diferenças significativas quando comparado com GM-CSF 10 ng/mL e controle. Portanto, esses dados indicam que o GM-CSF foi mais eficiente em induzir células maduras (expressando mais MHCII), embora não seja possível determinar o percentual de DCs ou macrófagos. Todas as barras de erro dessa figura representam a média com desvio padrão. O valor de P foi calculado usando: ANOVA (*) comparado com o controle; T-test (•) comparado com GM-CSF 10 ng/mL; T-test (+) comparado com L929 25%. P-value: 0.1234 (ns), 0.0332*, 0.0021**, 0.0002***, <0,00001****.

macrófagos) no GM-CSF 1 ng/mL foi maior do que no controle, GM-CSF 10 ng/mL e L929 25%. O MFI de F4/80 em GM - CSF 25 ng /mL foi superior ao de 10 ng /mL. Não houve diferença entre GM-CSF 10 ng/mL e L929 25%.

No mesmo quadrante, o MFI de MHCII mostrou diferenças estatísticas entre GM-CSF 5 ng/mL e 25 ng/mL com os grupos controle, GM-CSF 10 ng/mL e L929 25%. O GM-CSF 10 ng/mL apresentou valores elevados quando comparado ao L929 1%, 5% e 10%. O MFI de CD11c no Q2 não mostrou diferenças estatísticas quando todos os grupos foram comparados. No Q3, o MFI de F4 / 80 de L929 25% foi maior do que

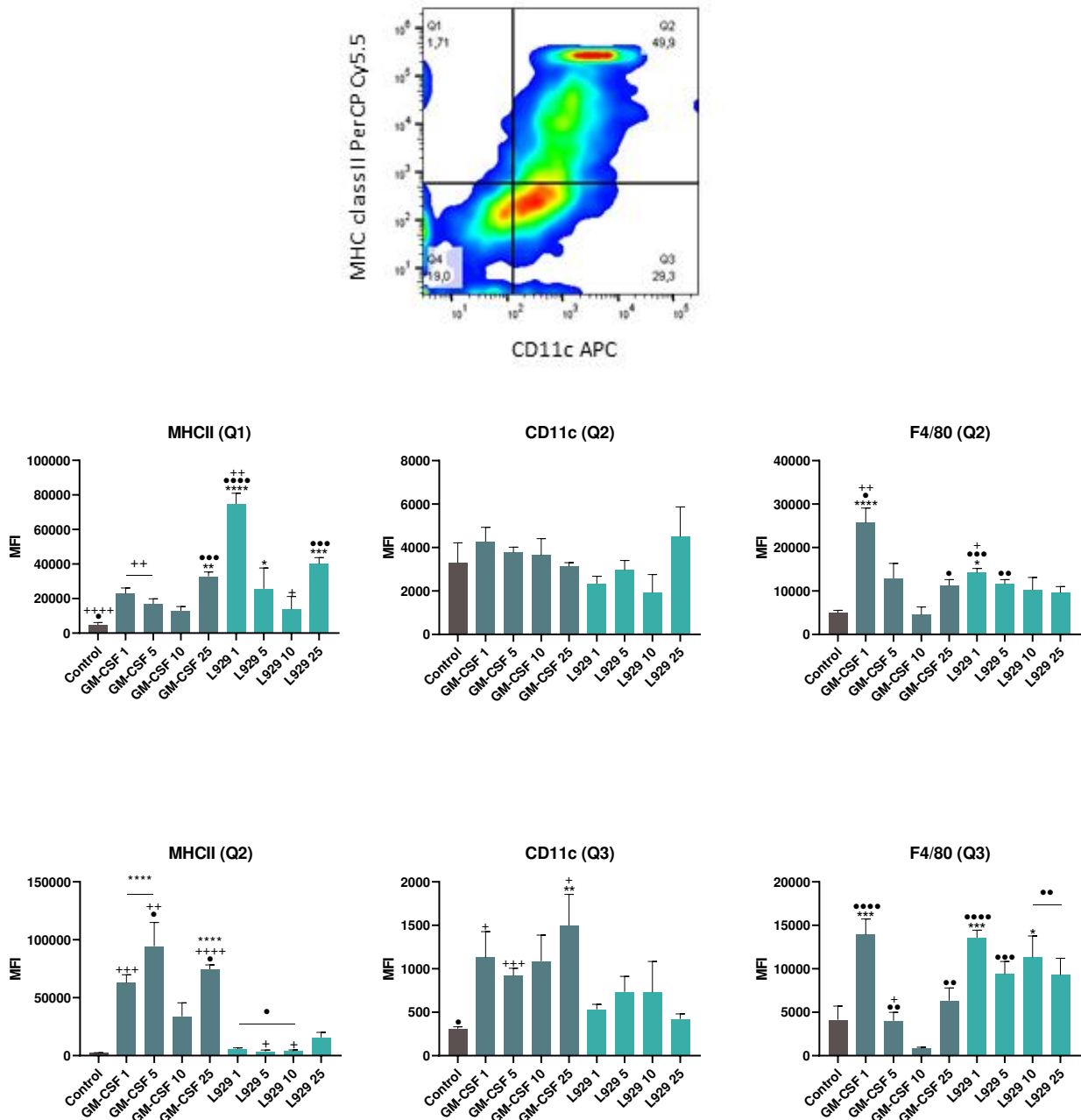


Fig. 7. As células precursoras da medula óssea foram mantidas em cultura em meio (IMDM) condicionado com GM-CSF ou sobrenadante de L929. O MFI dos marcadores de superfície foi determinado por citometria de fluxo. N = 6. Em Q1 o grupo L929 1% mostrou diferenças quando comparado com o controle, GM-CSF 10 ng/mL e L929 25%, e a expressão em GM-CSF 10 ng/mL foi

significativamente menor do que a encontrada em L929 25%. A expressão de F4/80 (Q2) em GM-CSF 1 ng/mL foi maior do que o controle, GM-CSF 10 ng/mL e L929 25%. No mesmo quadrante, foi encontrada diferença significativa no MFI de MHCII em GM-CSF 5 e 25 ng/mL quando comparados com o controle e L929 25%. A expressão de F4/80 no Q3 em L929 25% foi maior do que em GM-CSF 10 ng/mL, mas não houve diferenças quando comparado com GM-CSF 1 e 25 ng/mL. Portanto, esses resultados sugerem que a concentração de GM-CSF 10 ng/mL é a mais indicada para se obter populações com menor MFI de F4/80 (marcador característico de macrófagos). As barras de erro representam a média $\pm$ desvio padrão. O valor de P foi calculado usando: ANOVA (*) comparado com o controle; T-test (●) comparado com GM-CSF 10 ng/mL; T-test (+) comparado com L929 25%. P-value: 0.1234 (ns), 0.0332*, 0.0021**, 0.0002***, <0,00001****.

GM-CSF 5 ng/mL e 10 ng/mL. O MFI encontrado no grupo GM-CSF 10 ng/mL foi menor do que todos os grupos tratados com sobrenadante L929 e o valor de GM-CSF 1 ng/mL foi semelhante para todos os mesmos grupos. No Q3, o MFI de CD11c em GM-CSF 1 ng/mL, 5 ng/mL e 25 ng/mL foi maior do que o grupo L929 25%. Portanto, o L929 1% foi o tratamento mais eficiente em induzir células capazes de apresentar antígeno (positivas para MHCII) e esse tratamento também aumentou a marcação significativamente a marcação de F4/80, indicando que essas células maduras são macrófagos. O tratamento com GM-CSF 1 ng/mL também induziu aumento de F4/80 e aumento significativo de MHCII, indicando que esse tratamento também é eficaz em induzir macrófagos ativos na apresentação de antígenos.

Para saber mais sobre a população negativa de MHCII e CD11c foi realizado uma nova análise para observar a expressão de F4/80 e CD11c dessas populações como mostrado na **Fig. 8**. O MFI de Q1 foi analisado e o GM-CSF 10 ng/mL mostrou os menores valores de MFI de F4/80, apresentando diferença estatística quando comparado a todos os grupos. O MFI do grupo L929 25% não apresentou diferenças quando comparado aos grupos GM-CSF 1 ng/mL, 5 ng/mL e 25 ng/mL. Isso sugere que o tratamento com GM-CSF 10 ng/mL é a condição mais eficiente para obter células com baixa expressão de F4/80; essas células são provavelmente DCs, uma vez que esse é um marcador típico de macrófagos.

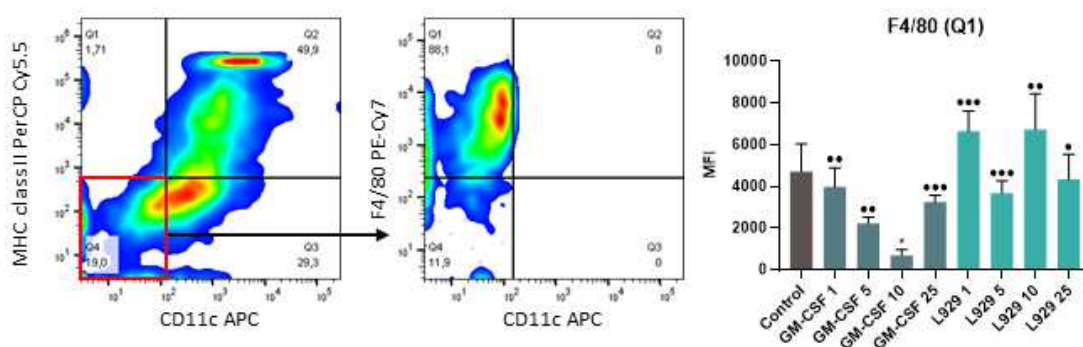


Fig. 8. As células precursoras da medula óssea foram mantidas em cultura em meio (IMDM) condicionado com GM-CSF ou sobrenadante de L9292. O MFI dos marcadores de superfície foi determinado por citometria de fluxo. N = 6. Os dados foram obtidos a partir do *gate* elaborado (F4/80/CD11c) dentro do quadrante negativo de MHCII/CD11c. A expressão de F4/80 em GM-CSF 10 ng/mL mostrou diferenças significativas quando comparado com todos os grupos. Não houve diferença significativa entre L929 25% com qualquer outro grupo. Portanto, esses dados sugerem que a concentração de GM-CSF 10 ng/mL é a mais indicada para se obter populações com MFI reduzido de F4/80. Todas as barras de erro dessa figura representam a média com desvio padrão. O valor de P foi calculado usando: ANOVA (*) comparado com o controle; T-test (●) comparado com GM-CSF 10 ng/mL. P-value: 0.1234 (ns), 0.0332*, 0.0021**, 0.0002***, <0,00001****.

4.3. Análise da expressão de marcadores de superfície em DCs moduladas por sildenafil e lisado de EO771

Para analisar o perfil fenotípico das DCs, as amostras foram marcadas com anticorpos anti-MHCII, anti-CD11c e anti-CD80. Foram realizados dois experimentos independentes (N=6). Todos os experimentos seguiram as estratégias de *gating* mostradas na **Fig. 9**. Os dados sobre a expressão dos marcadores de superfície são mostrados na **Fig. 10**.

A expressão de MHCII, em 1 h de tratamento, dos grupos tratados com LPS, lisado tumoral e lisado tumoral juntamente com o sildenafil 1 μ M, foi semelhante entre eles. Já em 24 h de tratamento, a expressão de MHCII no grupo tratado somente com o lisado tumoral foi menor significativamente do que todos os outros grupos. Enquanto a expressão de MHCII permaneceu significativamente alta nos grupos tratados com sildenafil, comparando ao lisado. A expressão de CD11c, em 1 h de tratamento, foi semelhante nos grupos tratados com lisado tumoral, lisado tumoral juntamente com o sildenafil 0,1 e 1 μ M. Houve diferenças significativas no grupo tratado com o lisado tumoral e o sildenafil 1 μ M quando comparado com Controle, LPS e S10+Ly. Em 24 h de tratamento, a expressão de CD11c do grupo S 0,1+Ly foi semelhante ao grupo

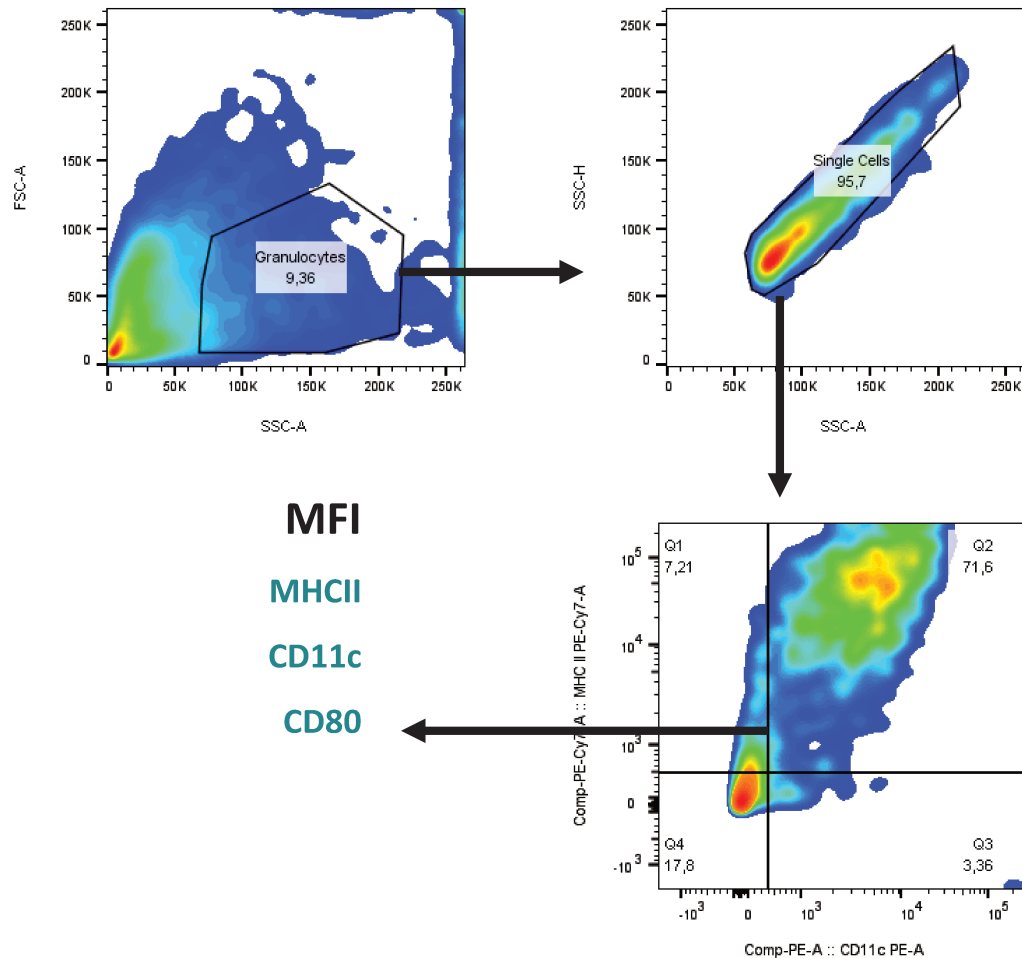


Fig. 9 Estratégia de gate: Granulocytes> Single Cells > MHCII, CD11c. N = 6. O MFI do duplo positivo dos marcadores MHCII, CD11c e CD80 foi analisado.

Controle. Já os grupos LPS, Ly e S1+Ly tiveram uma queda na expressão de CD11c em 24 h quando comparados com o grupo controle. Portanto, a modulação com sildenafil induziu uma ativação mais duradoura da DC, uma vez que as mesmas permaneceram com expressão alta de MHCII e CD11c em relação às células expostas apenas ao lisado tumoral. Houve um aumento na expressão de CD80, em 1 h de tratamento, nos grupos modulados com sildenafil 1 e 10 μ M quando comparados com o grupo controle. O grupo LPS, Ly e S0,1+Ly não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o controle.

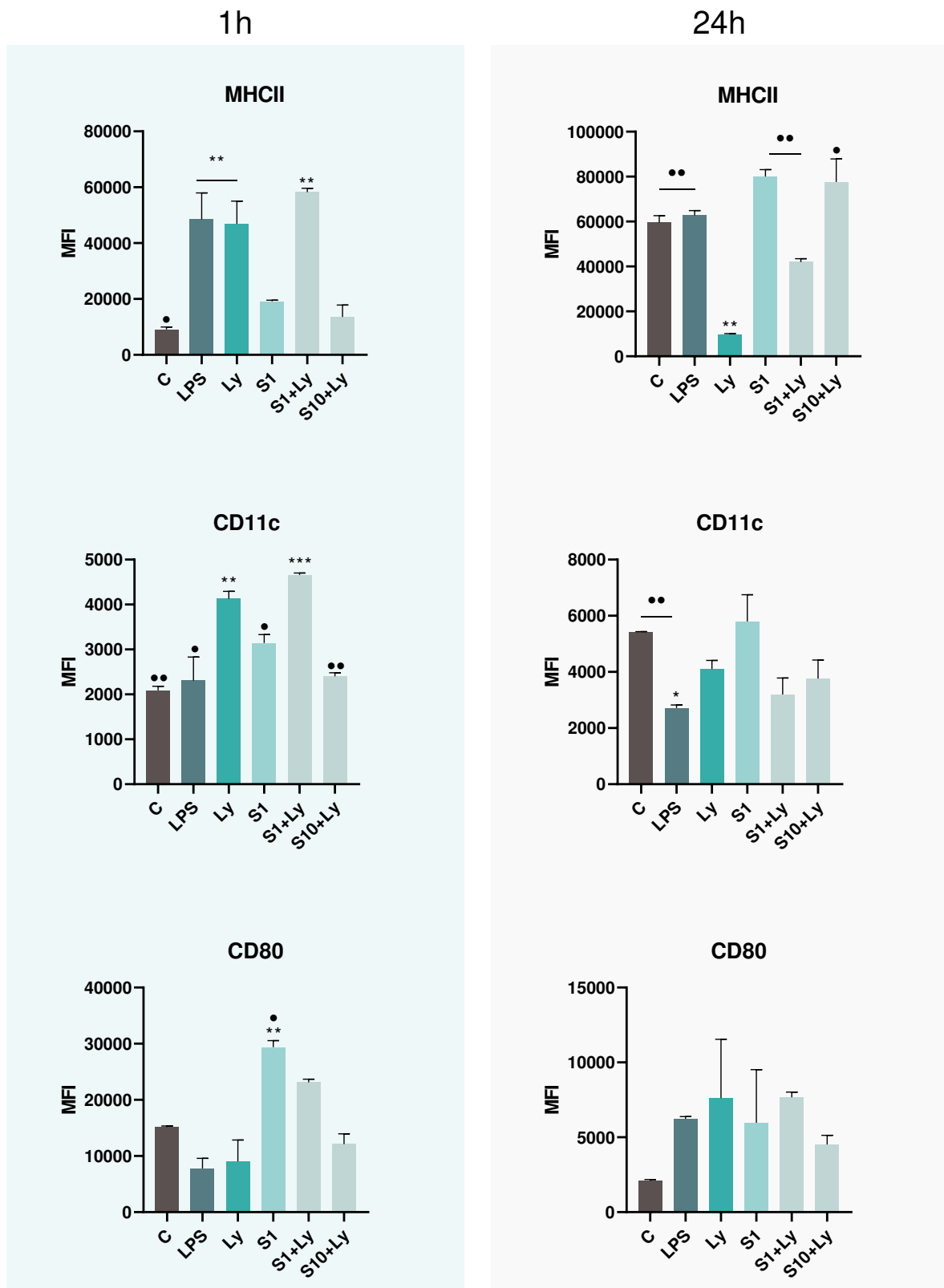


Fig. 10. As células precursoras da medula óssea foram mantidas em cultura em meio (IMDM) condicionado com GM-CSF por 7 dias. O MFI dos marcadores de superfície foi determinado através citometria de fluxo. N = 6. O tratamento com sildenafil concomitantemente ao lisado tumoral diminuiu a expressão de CD11c em 1 h de tratamento, aumentou a expressão de MHCII depois de 24 h de tratamento e de CD80 em 1 h de tratamento (no grupo tratado somente com o sildenafil) quando comparados com os grupos modulados somente com o lisado tumoral. Isso sugere que o sildenafil foi

capaz de alterar positivamente a expressão de MHCII e CD80 (proteínas de superfície importantes para determinar o fenótipo maduro de DCs). **C** – controle; **LPS** – lipossacarídeo; **Ly** – lisado; **S1/10** – sildenafil 1/10 μ M. Os dados foram obtidos a partir do gate elaborado (**fig. 8.**) dentro do quadrante do duplo positivo de MHCII/CD11c em dois tempos de tratamento (1h e 24h). Todas as barras de erro dessa figura representam a média com desvio padrão. O valor de P foi calculado usando: ANOVA (*) comparado com o controle; T-test (●) comparado com Lysate. P-value: 0.1234 (ns), 0.0332*, 0.0021**, 0.0002***, <0,00001****.

4.4. Secreção de citocinas pela DCs moduladas

Para avaliar a secreção de citocinas pela DC, o sobrenadante das culturas expostas aos diversos tratamentos, em dois tempos (1 h e 24 h), foi coletado e armazenado em Biofreezer (-80°C). Este experimento foi realizado em duas duplicatas independentes totalizando um N=4. O método de ELISA sanduiche foi utilizado para a obtenção dos resultados. Esses resultados são apresentados na **Fig. 11.**

A secreção de IL1- β em 1 h do grupo S1+Ly foi maior significativamente do que o controle e o grupo Ly. Porém em 24 h de tratamento, não houve diferença significativa entre o grupo Ly com os demais grupos tratados com sildenafil, com exceção do grupo S10+Lys e LPS. A secreção de IL-10 em 1 h de tratamento nos grupos tratados com sildenafil juntamente com o lisado tumoral foi menor significativamente quando comparados com o grupo que foi exposto somente ao lisado. Porém, em 24 h de tratamento essas diferenças não foram observadas nesses grupos. A secreção de TNF- α , em 1 h, de todos os grupos tratados com o lisado e o LPS foi superior a encontrada nos demais grupos. O tratamento com sildenafil+Lisado aumentou significativamente a secreção de TNF- α em relação ao lisado após 24 h de tratamento e essa diferença não foi observada em 1 h; o sildenafil sozinho não induziu expressão de TNF- α . Portanto, esses dados sugerem que o sildenafil foi capaz de reduzir a secreção de citocina anti-inflamatória (IL-10) e aumentar a secreção das pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α).

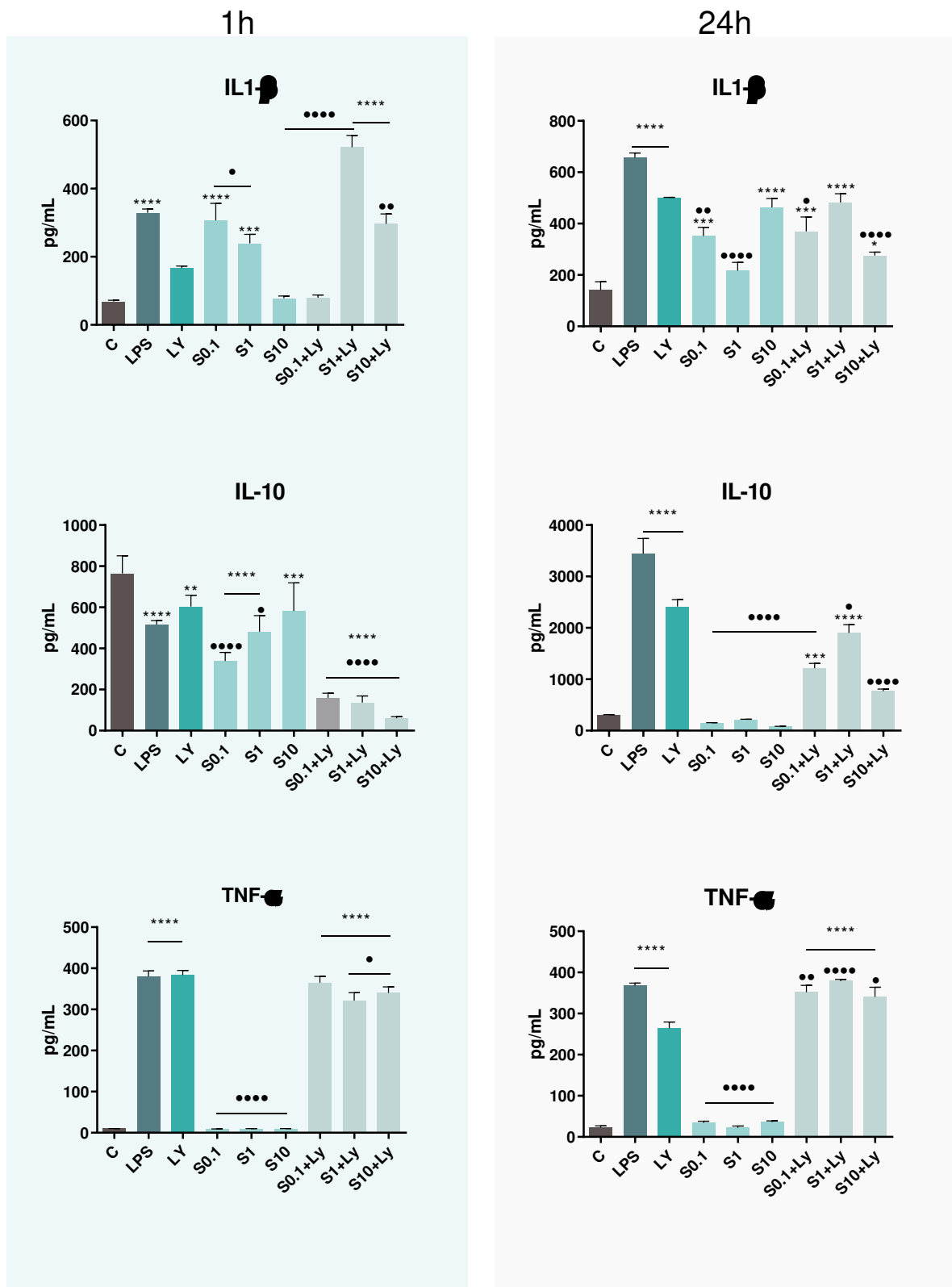


Fig. 11. O sobrenadante das células expostas aos diversos tratamentos foi coletado e analisado através do método de ELISA (n=4). Os gráficos de barra mostram a expressão das citocinas IL1- β , TNF- α e IL-10 em dois tempos (1h e 24h). As DCs moduladas com o sildenafil concomitantemente ao lisado tumoral apresentaram os seguintes resultados quando comparadas com as DCs moduladas somente com o lisado tumoral: aumento da secreção de IL-1 β nos tratamentos com sildenafil 0,1 e 1 μ M e diminuição nos tratamentos com sildenafil 10 μ M, em 1 h de tratamento; diminuição da secreção de IL-10 (com as concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M de sildenafil + lisado) em 1 h e 24 h de tratamento; e

aumento da expressão de TNF- α (com as concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M de sildenafil) em 24 h de tratamento. Portanto, esses dados sugerem que o sildenafil foi capaz de reduzir a secreção de citocina anti-inflamatória (IL-10) e aumentar a secreção das pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α). **C** – controle; **DC** – célula dendrítica; **L** – linfócito; **Ly** – lisado; **S1/10** – sildenafil 1/10 μ M; **M** – modulado. Todas as barras de erro dessa figura representam a média com desvio padrão. O valor de P foi calculado usando: ANOVA (*) comparado com o C; T-test (●) comparado com Ly. P-value: 0.1234 (ns), 0.0332*, 0.0021**, 0.0002***, <0,00001****

4.5. Populações linfocitárias CD4⁺ e CD8⁺ estimuladas pelas DCs moduladas

As DCs moduladas foram mantidas em cocultura com linfócitos totais do baço durante 3 dias. Ao final do experimento, as células marcadas com anti-CD4 e CD8 foram analisadas por citometria de fluxo. A **Fig. 12** apresenta os dados percentuais das populações CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁺CD8⁺ em dois tempos de tratamento.

Houve redução significativa nas populações CD4⁺ em 1 h de tratamento nos grupos DC(MLy)+L, DC(MS1)+L, DC(MLyS1)+L(MS1) e DC(MLyS10)+L(MS10) quando comparados com o grupo DC+L (**Fig. 12**). Já em 24 h, o grupo DC(MLy)+L apresentou um percentual maior significativamente em comparação com os grupos DC(MLyS1)+L(MS1) e DC(MLyS10)+L(MS10). Nesse mesmo tempo de experimento os grupos DC(MLy)+L, DC+L(MS1), DC+L(MS10) DC(MLyS1)+L(MS1) e DC(MLyS10)+L(MS10) mostraram uma população de CD4⁺ inferior ao grupo DC+L.

Nenhum dos grupos de tratamento apresentou diferenças significativas com relação ao percentual da população CD8⁺ quando comparados com o grupo DC+L em 1 h de tratamento modulatório (**Fig. 12**). Houve diminuição significativa no percentual dessa população no grupo DC(MLyS10)+L(MS10) em relação ao grupo DC(MLy)+L em 1 h e 24 h de tratamento.

A população de CD8⁺CD4⁺ do grupo DC(MLyS10)+L(MS10) foi o único a apresentar redução significativa do percentual em 1 h e 24 h de tratamento (**Fig. 12**). Essa população nos grupos DC(MS1)+L, DC+L(MS10) DC(MLyS1)+L(MS1) e DC(MLyS10)+L(MS10) apresentou aumento significativo com relação ao grupo DC(MLy)+L em 1 h de tratamento. Em 24 h somente DC(MLyS1)+L(MS1) e

DC(MLyS10)+L(MS10) apresentaram aumento significativo quando comparado com o DC(ML)+L.

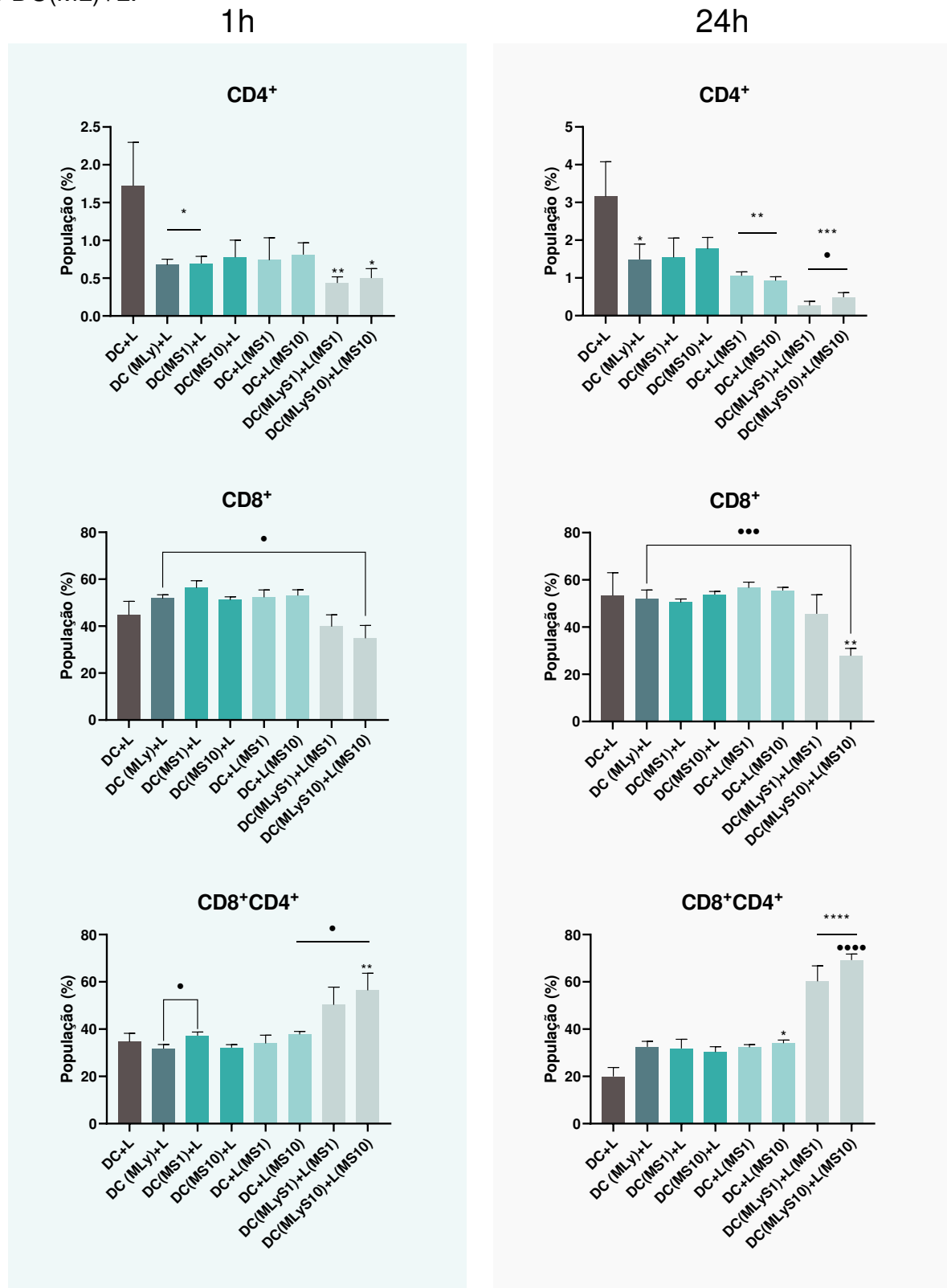


Fig. 12. Os linfócitos foram mantidos por 72h em cocultura com as DCs moduladas por 1h e 24h. Ao final do experimento, os linfócitos foram marcados com anticorpos anti CD4 e anti CD8 e analisados por citometria de fluxo (n=6). O sildenafil foi responsável por aumentar o percentual das populações de

CD4+CD8+ (duplo positivo) nos grupos tratados concomitantemente com lisado tumoral, quando comparados com o grupo tratado somente com o lisado tumoral. **C** – controle; **DC** – célula dendrítica; **L** – linfócito; **Ly** – lisado; **S1/10** – sildenafil 1/10 μ M; **M** – modulado. Todas as barras de erro dessa figura representam a média com desvio padrão. O valor de P foi calculado usando: ANOVA (*) comparado com DC+L; T-test (•) comparado com DC+(MLy)+L. P-value: 0.1234 (ns), 0.0332*, 0.0021**, 0.0002***, <0,00001****.

4.6. Ensaio *Live and Dead* nas células tumorais EO771 em cocultura com DCs e linfócitos

Para analisar a porcentagem de células EO771 afetadas pela ação das DCs e/ou linfócitos, foi utilizado o kit *Live and Dead* para marcar as populações em processo de morte celular. Foram realizados dois experimentos independentes (N = 6). A **Fig. 13** mostra a porcentagem de células marcadas positivamente pelo Live and

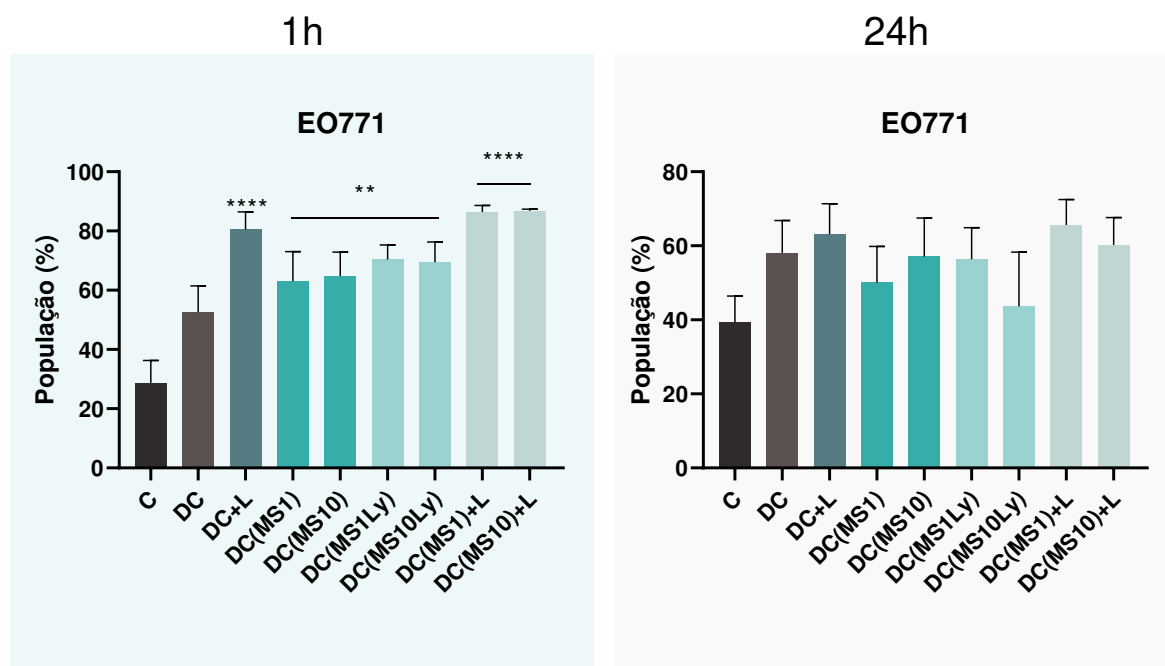


Fig. 13. As células tumorais foram colocadas em cocultura com DCs e linfócitos tratados e posterior a 1h ou 24h de tratamento elas foram marcadas com *Live and Dead*. Os gráficos mostram a porcentagem de células que expressaram a proteína a qual o anticorpo Live and Dead se liga. Esses resultados sugerem que o sildenafil não foi capaz de aumentar a eficácia na eliminação das EO771 quando comparados com os resultados dos grupos que não foram modulados com o sildenafil (com exceção do grupo C e DC). Legenda: **C** – controle; **DC** – célula dendrítica; **L** – linfócito; **Ly** – lisado; **S1/10** – sildenafil 1/10 μ M; **M** – modulado. Todas as barras de erro dessa figura representam a média com desvio padrão. O valor de P foi calculado usando: ANOVA (*) comparado com o controle. P-value: 0.1234 (ns), 0.0332*, 0.0021**, 0.0002***, <0,00001****.

Dead. Todos os grupos, com exceção do grupo DC apresentaram aumento significativo quando comparados com o grupo C, no tratamento de 1 h. Não houve diferenças significativas entre os grupos DC+L e DC+L (MS1 e 10) em 1 h. Em 24 h de tratamento não houve nenhuma alteração significativa. Esses resultados sugerem que o sildenafil não foi capaz de aumentar a eficácia na eliminação das EO771 quando comparados com os resultados dos grupos que não foram modulados com o sildenafil (com exceção do grupo C e DC). Porém, esses resultados *in vitro* não são suficientes para observar os efeitos benéficos que o sildenafil apresentou na melhora de expressão de marcadores de superfície, secreção de citocinas e aumento populacional de linfócitos, por conta da mimetização simplória de um microambiente tumoral, sugerindo que outros testes, de preferência *in vivo*, sejam realizados para que novos resultados sejam observados.

5. Discussão

Com relação aos experimentos para caracterizar os fenótipos diferenciados a partir de precursores da medula óssea utilizando concentrações de GM-CSF e o sobrenadante de L929, os tipos de perfis celulares obtidos se mostraram vastos. É importante ter conhecimento do quanto uma célula expressa determinado marcador de superfície, especialmente quando isso é necessário para prover algum tipo de resposta. Por exemplo, para desenvolver uma terapia celular eficiente, os pesquisadores precisam escolher o perfil mais apropriado, tendo como foco os marcadores que trarão melhores respostas. Baseado nisso, os dados do presente trabalho mostraram que necessita haver cautela ao escolher o modelo de diferenciação dos precursores da medula óssea, visto que o perfil molecular da célula pode ser diverso e é preciso levar essas variantes em consideração ao escolher qual método será utilizado.

Há um problema em tentar definir as DCs mieloides e linhagens de macrófagos porque elas podem compartilhar os mesmos marcadores de superfície, o que significa que alguns marcadores não são exclusivos para elas (YANG et al., 2007; MURRAY et al., 2011; RÓSZER et al., 2015). O CD11c, encontrado na superfície das DCs, é utilizado para distinguir essas duas populações, porém alguns macrófagos podem expressar pequenas quantidades desses marcadores (ONO et al., 2018; SANDOR et al., 2016; BERNARDO et al., 2018). Denning et al. (2011) mostraram que DCs e macrófagos isolados do mesmo órgão podem ser efetivos em ativar células T naive. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que essa complexa variação de perfis pode ser alterada de acordo com a concentração dos fatores de crescimento de colônias assim como Na et al. (2016) mostraram em seus estudos usando algumas concentrações de GM-CSF. Neste trabalho, escolhemos diferenciar DCs a partir de BMDC e obter um perfil expressando MHCII e CD11c, que é comumente usado em terapias celulares assim como as diferenciadas a partir de monócitos do sangue.

O GM-CSF já é conhecido por diferenciar granulócitos, macrófagos e DCs (INABA et al., 1993). Para selecionar a melhor concentração para a realização de um experimento deve-se levar em consideração o MFI e a porcentagem de células que expressam esses marcadores de superfície. Conforme mostrado no presente estudo, o grupo controle apresentou valores semelhantes aos grupos tratados com GM-CSF (1 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL) em porcentagem de células que expressaram MHCII

e CD11c, mas o MFI apresentou valores extremamente baixos nesses tratamentos. Dentro das populações que expressaram apenas CD11c ou aquelas que não expressaram nenhum marcador (negativo), podem ser inseridos os macrófagos e as maiores porcentagens referentes a essas populações foram encontradas em todos os grupos tratados com sobrenadante L929 e GM-CSF 25 ng/mL (ONO et al., 2018). O MFI de CD11c nas populações MHCII⁺CD11c⁺ foi semelhante em todos os grupos de tratamento, incluindo o controle. Isso sugere que o principal fator na composição dessa população, considerando esse marcador, é a porcentagem de células que o expressam.

Os grupos tratados com GM-CSF, com exceção do GM-CSF 25 ng/mL, apresentaram os maiores percentuais das populações MHCII⁺ e CD11c⁺. Essas populações podem certamente ser DCs ao invés de macrófagos, no entanto, essas populações apresentam grandes diferenças no MFI de F4/80 (MERAD et al., 2013; ONO et al., 2018). O MFI de F4/80 do grupo GM-CSF 1 ng/mL foi significativamente maior do que todos os grupos de tratamento e apresentou o valor de 25.683,08 contra 4.540,05 para o grupo GM-CSF 10 ng/mL e 9.595,83 para L929 25%, sugerindo que essa seja a melhor concentração para se obter populações com alta expressão de F4/80 (macrófagos). Não houve diferença significativa no MFI de MHCII das populações MHCII⁺CD11c⁺ dos grupos GM-CSF 10 ng/mL e 25% L929, mas todos os outros grupos tratados com GM-CSF obtiveram valores significativamente maiores do que os grupos tratados com o sobrenadante de L929. Isto sugere que GM-CSF 25% tem efeitos semelhantes ao sobrenadante L929 nesta população. O MFI de F4/80 foi analisado na população MHCII⁻CD11c⁻. Observou-se que o grupo tratado com GM-CSF 10 ng / mL apresentou valores significativamente menores do que todos os outros grupos de tratamento. Isso sugere que essa concentração é a melhor indicada para quando o intuito é ter uma população de DCs, uma vez que reduziu a expressão de F4/80 (um marcador de macrófagos) na população total. Portanto, os resultados apontam para o uso de GM-CSF 10 ng/mL como a melhor entre as utilizadas para diferenciar uma população de DCs, com a menor contaminação por macrófagos. Entretanto, o tratamento com GM-CSF 25 ng/mL ou L929 25% induziram uma maior população de células maduras e capazes de apresentar antígenos, enquanto as condições que se apresentaram mais eficazes para diferenciação de macrófagos foi L929 10%, 25% e GM-CFS 25 ng/mL.

As DCs desempenham um papel fundamental na iniciação da resposta imune contra tumores, porém o TME tem a capacidade de torná-las tolerogênicas com perfil quiescente e essa ação compromete a eficácia de imunoterapias baseadas em DCs. Extrair as DCs do paciente e expô-las ao lisado tumoral, as preparando para responder efetivamente ao patógeno, tem sido a alternativa mais eficaz quando se diz respeito à ativação dessas células (APETOH et al., 2011). Diversos estudos clínicos vêm sendo desenvolvidos atualmente utilizando diferentes estratégias como, por exemplo, a transferência adotiva de DCs carregadas com antígenos associados a tumores (*Tumor-associated antigens* – TAAs) em câncer de mama, porém se mostraram limitados aos HLAs (*Human leukocyte antigen*) específicos de pacientes dependendo dos TAAs escolhidos (MITTENDORF et al., 2008; VLAD et al., 2004; BROSSART et al., 2000). O uso de drogas, como os quimioadjuvantes, têm potencial para melhorar a resposta imune. DCs ativadas *in vitro* e mantidas em cocultura com MCF-7 (linhagem de câncer de mama) moduladas por doxorrubicina foram capazes de aumentar a porcentagem de CTLs quando comparadas com as MCF-7 não modulas (ZHENG et al., 2012). O uso de fármacos que melhorem o desempenho do sistema imune pode significar um aumento de sobrevida de pacientes e até mesmo a remissão do quadro.

Com relação à caracterização fenotípica das DCs expostas ao lisado tumoral e às diferentes concentrações de sildenafil, realizada no presente trabalho, observamos que quando tratadas com o sildenafil concomitantemente com o lisado tumoral, as células não apresentaram diferenças no MFI das proteínas avaliadas em relação às DCs tratadas somente com o lisado, em 1 h de tratamento. Porém, em 24 h de tratamento, as DCs estimuladas pelo lisado tumoral e o sildenafil mantiveram a expressão aumentada do MHCII por mais tempo em suas superfícies, em comparação com as DCs que somente foram moduladas com o lisado tumoral. O tempo de retenção do MHCII já foi observado em macrófagos por Baumgart et al. (1998) e, como observado pelos autores, a expressão dessa proteína reduziu drasticamente com o tempo sem nenhum estímulo em cultura celular. O fato de as DCs manterem a expressão dessa molécula por mais tempo é benéfico para manter seu perfil maduro e função celular. Esses dados sugerem que a inibição da PDE-5 pode ter ação direta ou indireta sobre a atividade dos corpos vesiculares dos endossomos, que são os responsáveis por promover degradação, reciclagem e a montagem do MHCII, e/ou

com o controle da ubiquitinação dessa proteína, como observado por Wilson et al. (2009). Um estudo prévio em 140 pacientes com câncer gástrico mostrou que o aumento da expressão de CD11c está diretamente relacionado com o prognóstico favorável da doença, mas não como um fator de risco independente (WANG et al., 2015). Portanto, a modulação positiva de CD11c observada no tratamento com sildenafil pode ser favorável em diversos tipos de câncer. O aumento significativo na expressão de CD80 nos grupos tratados com o sildenafil juntamente com o lisado pode desfavorecer o desenvolvimento de DCs com perfil tolerogênico dependendo do ambiente, como relatado por Jiga et al. (2004); por exemplo, Onishi et al. (2008) observaram que a interação entre CTLA-4 nas Tregs com o CD80/CD86 nas APCs está relacionada com a perda na capacidade de apresentar antígenos e, considerando o ambiente supressor e rico em Treg do TME, essa interação DC/Treg deve ser considerada.

A elevada secreção da citocina pró-inflamatória IL1- β em tecido tumoral de mama (modelo murino humanizado de metástase óssea de câncer de mama) aumenta as chances de indução de metástase em tecido ósseo, como relatado por Tullota et al, (2019). Isso sugere que a redução na secreção dessa citocina em 24 h de tratamento no grupo modulado com o sildenafil juntamente com o lisado dificultaria a colonização secundária das células cancerosas. Diversos estudos mostram que a presença de IL-10 no TME pode resultar no prognóstico negativo de melanoma, câncer de pulmão e linfomas de células T/NK (BOYANO et al., 2000; LI et al., 2014; BOULLAND et al., 1998). Steinbrink et al. (1999) mostraram que o aumento de IL-10 induziu uma queda na expressão e regulação de MHCII de APCs e que muitas vezes essa citocina pode ser secretada pela própria célula tumoral. A secreção de IL-10 das DCs tratadas com o sildenafil concomitantemente ao lisado tumoral foram inferiores à encontrada nas DCs tratadas somente com o lisado tumoral, o que tem potencial para resultar em uma melhora da resposta contra o câncer. O TNF- α é conhecido por ser uma citocina que promove morte celular (AGGARWAL et al., 2002; ¹AGGARWAL et al., 2006; ² AGGARWAL et al., 2006); no presente trabalho, a secreção de TNF- α das DCs moduladas com o lisado tumoral concomitantemente ao sildenafil, no tratamento de 24 h, foi maior do que a encontrada nas DCs moduladas somente com o lisado tumoral. Os resultados das secreções de citocinas sugerem que o sildenafil é capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e diminuir as de anti-

inflamatórias, o que favoreceria o desenvolvimento de um ambiente mais inflamatório e no aumento da resposta imune mediada por citocinas.

Com relação aos resultados obtidos das coculturas de DCs com linfócitos totais do baço, DCs moduladas com sildenafil induziram uma maior diferenciação de linfócitos duplo positivos para CD4 e CD8. Sabe-se que os linfócitos maturados geralmente expressam CD4 ou CD8. Entretanto, a existência de populações que expressam ambos, CD4⁺CD8⁺ (DP), já foi documentada em diversas doenças infecciosas, autoimunes e em cânceres humanos (WEISS et al., 1998; PAREL et al., 2007; DESFRANÇOIS et al., 2009). Não existe uma explicação consensual entre os pesquisadores sobre qual é a função dessas células ou como e porque elas são desenvolvidas, pois os mecanismos pelos quais elas são influenciadas ainda são desconhecidos. Desfrancois et al. (2009) observaram que essas populações possuíam o mesmo fenótipo e potencial citotóxico que as células T efectoras e de memória CD8⁺ e que secretam IL-5 e IL-13 em grandes quantidades. Esse mesmo grupo de pesquisa observou um aumento dessa população no TME de melanoma quando comparado com o sangue (DESFRANÇOIS et al., 2010). As células CD4⁺CD8⁺ (DP) mostraram aumento na secreção de TNF- α , em relação às CD8⁺, sugerindo uma atividade antitumoral *in vitro* (DESFRANÇOIS et al., 2010). Entretanto, outro estudo em câncer colorretal metastático apresentou capacidade supressora relacionada à secreção de grandes quantidades de TNF- α *in vitro*; além disso, os pesquisadores observaram que a presença elevada dessa citocina está associada com o pobre prognóstico em câncer colorretal metastático (SARRABAYROUS et al., 2011). Portanto, os efeitos da presença dessa população em diversos tipos de cânceres ainda é muito heterogêneo, o que reforça a necessidade de novos estudos que visem esclarecer seus mecanismos para que, de fato, a terapia celular seja eficaz e não comprometa os componentes celulares do sistema imune que já estão debilitados. No presente estudo o sildenafil foi capaz de aumentar o percentual das populações CD4⁺CD8⁺ (DP), o que provavelmente resultaria numa melhora da resposta imune.

Em relação aos ensaios com cocultura de DCs, linfócitos e células EO771, o presente trabalho visou detectar os efeitos quimioadjuvantes, e não os quimioterápicos, do sildenafil. Conforme foi demonstrado aqui, não foram encontradas diferenças significativas na morte de EO771 dos grupos contendo DCs moduladas

com o sildenafil. Isso sugere, fortemente, que a ação do sildenafil é adjuvante e seria necessária a associação com alguma droga para observação dos efeitos, conforme relatado por Das et al. (2010) que observaram esses efeitos em conjunto com o quimioterápico doxorubicina.

No presente estudo, um novo adjuvante que pode servir para melhorar a terapia celular baseada em DCs foi estudado, o sildenafil (Viagra[®], Pfizer), um fármaco que já é utilizado comercialmente para tratamento de outras doenças. Futuros experimentos pré-clínicos em modelo murino serão necessários para compreender os efeitos dessa terapia no microambiente tumoral e nos componentes do sistema imune, em decorrência da complexidade do ambiente *in vivo*, para avaliar a eficácia, segurança e prognóstico visando sua aplicação clínica.

6. Conclusão

É possível inferir dos presentes resultados que o sildenafil (Viagra®, Pfizer) se mostrou um bom candidato à modulação de DCs, com possível aplicação na terapia celular para o tratamento do câncer. O fármaco induziu uma ativação mais intensa e prolongada das DCs, bem como uma diminuição na secreção de citocinas anti-inflamatórias e aumento na secreção das pró-inflamatórias e também foi capaz de aumentar o percentual das populações de CD4⁺CD8⁺ (DP). Contudo, novos estudos devem ser realizados para melhor compreender os efeitos desse fármaco diretamente no TME, bem como o efeito da terapia com DCV modulada pelo sildenafil em modelo *in vivo* e em associação com outros imunomoduladores e/ou quimioterápicos.

7. Referências

- AGGARWAL, Bharat B. et al. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochemical pharmacology*, v. 72, n. 11, p. 1605-1621, 2006.
- AGGARWAL, Bharat B. et al. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, v. 1, n. 4, p. 327-341, 2002.
- AGGARWAL, Bharat B. et al. TNF blockade: an inflammatory issue. In: *Cytokines as potential therapeutic targets for inflammatory skin diseases*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. p. 161-186.
- AMBS, Stefan; HUSSAIN, S. Perwez; HARRIS, Curtis C. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *The FASEB Journal*, v. 11, n. 6, p. 443-448, 1997.
- ANSEL, K. Mark et al. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 24, p. 607-656, 2006.
- APETOH, Lionel et al. Harnessing dendritic cells in cancer. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, 2011. p. 42-49.
- APOSTOLOPOULOS, Vasso et al. A role for IL-5 in the induction of cytotoxic T lymphocytes in vivo. *European journal of immunology*, v. 30, n. 6, p. 1733-1739, 2000.
- BALKWILL, Fran; MANTOVANI, Alberto. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The Lancet*, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.
- BAUMGART, Martin et al. Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with T cell cytokine profile and protective/suppressive effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 12, p. 6936-6940, 1998.
- BELLONE, Graziella et al. Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 5, p. 3448-3460, 2006.
- BENARD, Gil. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4-5, p. 209-221, 2008.

- BOLTZ-NITULESCU, George et al. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *Journal of leukocyte biology*, v. 41, n. 1, p. 83-91, 1987.
- BOOTH, Laurence et al. [pemetrexed+ sildenafil], via autophagy-dependent HDAC downregulation, enhances the immunotherapy response of NSCLC cells. *Cancer Biology & Therapy*, v. 18, n. 9, p. 705-714, 2017.
- BOOTH, Laurence et al. PDE5 inhibitors enhance celecoxib killing in multiple tumor types. *Journal of Cellular Physiology*, v. 230, n. 5, p. 1115-1127, 2015.
- BOULLAND, Marie-Laure et al. Human interleukin-10 expression in T/natural killer-cell lymphomas: association with anaplastic large cell lymphomas and nasal natural killer-cell lymphomas. *The American journal of pathology*, v. 153, n. 4, p. 1229-1237, 1998.
- BOYANO, M. D. et al. Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. *British journal of cancer*, v. 83, n. 7, p. 847-852, 2000.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology*, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.
- BROSSART, Peter et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 96, n. 9, p. 3102-3108, 2000.
- CALICH, Vera Lúcia et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4-5, p. 223-236, 2008.
- CHAPUT, N. et al. The Janus face of dendritic cells in cancer. *Oncogene*, v. 27, n. 45, p. 5920, 2008
- COLLIN, Matthew; BIGLEY, Venetia. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, v. 154, n. 1, p. 3-20, 2018.
- COLLINS, Ian; WORKMAN, Paul. New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nature Chemical Biology*, v. 2, n. 12, p. 689, 2006.

- CONFINO, Hila et al. Inhibition of mouse breast adenocarcinoma growth by ablation with intratumoral alpha irradiation combined with inhibitors of immunosuppression and CpG. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 65, n. 10, p. 1149-1158, 2016.
- DAS, Anindita et al. Sildenafil (Viagra) sensitizes prostate cancer cells to doxorubicin-mediated apoptosis through CD95. *Oncotarget*, v. 7, n. 4, p. 4399, 2016.
- DAS, Anindita et al. Sildenafil increases chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in prostate cancer and ameliorates cardiac dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 42, p. 18202-18207, 2010.
- DENNING, Timothy L. et al. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *The Journal of Immunology*, v. 187, n. 2, p. 733-747, 2011.
- DESFRANÇOIS, Juliette et al. Double positive CD4CD8 $\alpha\beta$ T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PLoS One*, v. 5, n. 1, p. e8437, 2010.
- DESFRANÇOIS, Juliette et al. Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 $\alpha\beta$ T cells in human breast pleural effusions. *International journal of cancer*, v. 125, n. 2, p. 374-380, 2009.
- EAGLES, Matthew E. et al. Dendritic cell vaccines for high-grade gliomas. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 14, p. 1299, 2018.
- ELKABETS, Moshe et al. IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *European Journal of Immunology*, v. 40, n. 12, p. 3347-3357, 2010.
- EMMER, Peter M. et al. Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation*, v. 81, n. 10, p. 1451-1459, 2006.

- ENGLÉN, M. D. et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. *Journal of immunological methods*, v. 2, n. 184, p. 281-283, 1995.
- EZERNITCHI, Analía V. et al. TCR ζ down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 7, p. 4763-4772, 2006.
- FRASER, M. et al. Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells. *Oncogene*, v. 25, n. 15, p. 2203-2212, 2006.
- FRIES, Roland et al. Sildenafil in the treatment of Raynaud's phenomenon resistant to vasodilatory therapy. *Circulation*, v. 112, n. 19, p. 2980-2985, 2005.
- FRYDRYCHOWICZ, Magdalena et al. The dual role of Treg in cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 86, n. 6, p. 436-443, 2017.
- GABRILOVICH, Dmitry I.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne; BRONTE, Vincenzo. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 4, p. 253, 2012.
- GABRILOVICH, Dmitry. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n. 12, p. 941, 2004.
- GALIÈ, Nazzareno et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 20, p. 2148-2157, 2005.
- GEORGOUDAKI, Anna-Maria et al. Reprogramming tumor-associated macrophages by antibody targeting inhibits cancer progression and metastasis. *Cell Reports*, v. 15, n. 9, p. 2000-2011, 2016.
- GHOFRANI, Hossein A.; OSTERLOH, Ian H.; GRIMMINGER, Friedrich. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 8, p. 689, 2006.
- GUERMONPREZ, Pierre et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v. 20, n. 1, p. 621-667, 2002.

- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HANSON, Erica M. et al. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *The Journal of Immunology*, p. jimmunol. 0804253, 2009.
- HARRINGTON, Laurie E. et al. Interleukin 17–producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*, v. 6, n. 11, p. 1123-1132, 2005.
- HARTELL, Nick A. Inhibition of cGMP breakdown promotes the induction of cerebellar long-term depression. *Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 9, p. 2881-2890, 1996.
- HEATH, William R.; CARBONE, Francis R. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature Immunology*, v. 10, n. 12, p. 1237, 2009.
- HEVEL, Joan M.; WHITE, Kimberly A.; MARLETTA, Michael A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *Journal of biological chemistry*, v. 266, n. 34, p. 22789-22791, 1991.
- HIBBS JR, John B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 157, n. 1, p. 87-94, 1988.
- HUANG, Bo et al. Gr-1⁺ CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumorinduced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research*, v. 66, n. 2, p. 1123-1131, 2006.
- HUANG, Hui et al. Tolerogenic dendritic cells induce CD4⁺ CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cell differentiation from CD4⁺ CD25[–]/loFoxp3[–] effector T cells. *The Journal of Immunology*, p. 0903446, 2010.
- INABA, Kayo et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine*, v. 176, n. 6, p. 1693-1702, 1992

- INABA, Kayo et al. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 7, p. 3038-3042, 1993
- ISLAM, Bianca N. et al. Sildenafil suppresses inflammation-driven colorectal cancer in mice. *Cancer Prevention Research*, p. canprevres. 0015.2017, 2017.
- IVANOVA, Krassimira et al. Soluble Guanylyl Cyclase and Platelet Function a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 714, n. 1, p. 151-157, 1994.
- JIGA, Lucian P. et al. Generation of tolerogenic dendritic cells by treatment with mitomycin C: inhibition of allogeneic T-cell response is mediated by downregulation of ICAM-1, CD80, and CD86. *Transplantation*, v. 77, n. 11, p. 1761-1764, 2004.
- JUNG, Nam-Chul et al. Dendritic Cell-Based Immunotherapy for Solid Tumors. *Translational Oncology*, v. 11, n. 3, p. 686-690, 2018.
- KIMURA, Yukino et al. Clinical and immunologic evaluation of dendritic cell-based immunotherapy in combination with gemcitabine and/or S-1 in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Pancreas*, v. 41, n. 2, p. 195-205, 2012.
- KLEMM, Florian; JOYCE, Johanna A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends in cell biology*, v. 25, n. 4, p. 198-213, 2015.
- LACEY, Derek C. et al. Defining GM-CSF-and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by *in vitro* models. *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 11, p. 5752-5765, 2012
- LEE, Bang-Ning et al. Deficiencies in myeloid antigen-presenting cells in women with cervical squamous intraepithelial lesions. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, v. 107, n. 5, p. 999-1007, 2006.
- LEVIN, Ditzia et al. Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *The Journal of Immunology*, v. 151, n. 12, p. 6742-6750, 1993.

- LI, Hequan et al. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 1, p. 240-249, 2009.
- LIN, Shiyong et al. Phosphodiesterase-5 inhibition suppresses colonic inflammation-induced tumorigenesis via blocking the recruitment of MDSC. *American Journal of Cancer Research*, v. 7, n. 1, p. 41, 2017.
- LINSLEY, Peter S.; LEDBETTER, Jeffrey A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annual review of immunology*, v. 11, n. 1, p. 191-212, 1993.
- LU, Yong et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 11, p. 4160-4171, 2012.
- LUNDGREN, Sebastian et al. The clinical importance of tumour-infiltrating macrophages and dendritic cells in periampullary adenocarcinoma differs by morphological subtype. *Journal of Translational Medicine*, v. 15, n. 1, p. 152, 2017.
- MACE, Thomas A. et al. Differentiation of CD8+ T cells into effector cells is enhanced by physiological range hyperthermia. *Journal of leukocyte biology*, v. 90, n. 5, p. 951-962, 2011.
- MARIM, Fernanda M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PloS one*, v. 5, n. 12, 2010.
- MARLETTA, Michael A. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chemical research in toxicology*, v. 1, n. 5, p. 249-257, 1988.
- MASIELLO, Maria Grazia et al. Physical constraints in cell fate specification. A case in point: Microgravity and phenotypes differentiation. *Progress in biophysics and molecular biology*, v. 134, p. 55-67, 2018.
- MAYORDOMO, J. I. et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature Medicine*, v. 1, n. 12, p. 1297, 1995.

- MCKENZIE, Brent S.; KASTELEIN, Robert A.; CUA, Daniel J. Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway. *Trends in Immunology*, v. 27, n. 1, p. 17-23, 2006.
- MELLMAN, Ira; COUKOS, George; DRANOFF, Glenn. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, v. 480, n. 7378, p. 480, 2011.
- MENDES-GIANNINI, Maria José Soares et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4-5, p. 237-248, 2008.
- MERAD, Miriam et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*, v. 31, p. 563-604, 2013.
- MEYER, Christiane et al. Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 41, p. 17111-17116, 2011.
- MILDNER, Alexander; JUNG, Steffen. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*, v. 40, n. 5, p. 642-656, 2014.
- MITTENDORF, Elizabeth A. et al. The E75 HER2/neu peptide vaccine. *Cancer immunology, immunotherapy*, v. 57, n. 10, p. 1511-1521, 2008.
- MOLON, Barbara et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 10, p. 1949-1962, 2011.
- MORAES-VASCONCELOS, Dewton et al. *Paracoccidioides brasiliensis* disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, p. e31-37, 2005.
- MOSMANN, Timothy R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of immunology*, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.
- NA, Yi Rang et al. GM-CSF Grown bone marrow derived cells are composed of phenotypically different dendritic cells and macrophages. *Molecules and Cells*, v. 39, n. 10, p. 734-741, 2016.

- NAGARAJ, Srinivas et al. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of Immunology*, p. ji_0902661, 2010.
- NESTLE, Frank O.; FARKAS, Arpad; CONRAD, Curdin. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Current opinion in immunology*, v. 17, n. 2, p. 163-169, 2005.
- NIE, Wen et al. Tumor-promoting effect of IL-23 in mammary cancer mediated by infiltration of M2 macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 482, n. 4, p. 1400-1406, 2017.
- NOSENGO, Nicola. Can you teach old drugs new tricks? *Nature News*, v. 534, n. 7607, p. 314, 2016.
- OKAMOTO, Masato et al. Dendritic cell-based vaccine for pancreatic cancer in Japan. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, v. 7, n. 1, p. 133, 2016.
- ONISHI, Yasushi et al. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells *in vitro* and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 29, p. 10113-10118, 2008.
- ONO, Yosuke et al. CD11c⁺ M1-like macrophages (MΦs) but not CD206⁺ M2-like MΦ are involved in folliculogenesis in mice ovary. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- ORMANDY, Lars A. et al. Direct ex vivo analysis of dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 12, n. 20, p. 3275, 2006.
- OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne et al. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2012. p. 275-281.
- OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne; SINHA, Pratima. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 8, p. 4499-4506, 2009.

- PALUCKA, Karolina et al. Dendritic cells and immunity against cancer. *Journal of internal medicine*, v. 269, n. 1, p. 64-73, 2011.
- PALUCKA, Karolina; BANCHEREAU, Jacques. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 4, p. 265, 2012.
- PAN, Ping-Ying et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer research*, p. 0008-5472. CAN-09-1882, 2009.
- PANTZIARKA, Pan et al. Repurposing drugs in oncology (ReDO)-selective PDE5 inhibitors as anti-cancer agents. *Eancermedicalsecience*, v. 12, 2018.
- PARDOLL, Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 4, p. 252, 2012.
- PAREL, Yann et al. Presence of CD4+ CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, v. 56, n. 10, p. 3459-3467, 2007.
- PARK, Heon et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*, v. 6, n. 11, p. 1133-1141, 2005.
- PEIXOTO, Christina A.; NUNES, Ana KS; RAPÔSO, Catarina. The Role of NO/cGMP Signaling on Neuroinflammation: A New Therapeutic Opportunity. In: *Mechanisms of Neuroinflammation*. InTech, 2017.
- PERROT, Ivan et al. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 5, p. 2763-2769, 2007.
- PERUMAL, Narayanan B.; KAPLAN, Mark H. Regulating Il9 transcription in T helper cells. *Trends in immunology*, v. 32, n. 4, p. 146-150, 2011.
- PIAZZA, Gary A. et al. Exisulind, a novel proapoptotic drug, inhibits rat urinary bladder tumorigenesis. *Cancer Research*, v. 61, n. 10, p. 3961-3968, 2001.

- PINZON-CHARRY, A. et al. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early-and late-stage breast cancer. *British Journal of Cancer*, v. 97, n. 9, p. 1251, 2007.
- POSCHKE, I. et al. Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 61, n. 6, p. 827-838, 2012.
- PUERTA, Elena et al. Phosphodiesterase 5 inhibitors prevent 3, 4-methylenedioxymethamphetamine- induced 5-HT deficits in the rat. *Journal of Neurochemistry*, v. 108, n. 3, p. 755-766, 2009.
- RADFORD, Kristen J.; TULLETT, Kirsteen M.; LAHOUD, Mireille H. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, v. 27, p. 26-32, 2014.
- RALL, T. W.; SUTHERLAND, Earl W. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *Journal of Biological Chemistry*, v. 232, n. 2, p. 1065-1076, 1958.
- RESTIFO, Nicholas P.; DUDLEY, Mark E.; ROSENBERG, Steven A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 4, p. 269, 2012.
- RODRIGUES, Patrick Fernandes et al. Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nature immunology*, v. 19, n. 7, p. 711, 2018.
- RÓSZER, Tamás. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of inflammation*, v. 2015, 2015
- ROUSTIT, Matthieu et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors for the treatment of secondary Raynaud's phenomenon: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Annals of the Rheumatic Diseases*, p. annrheumdis-2012-202836, 2013.
- SALLUSTO, Federica et al. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine*, v. 182, n. 2, p. 389-400, 1995.

- SANDNER, P. et al. PDE5 inhibitors beyond erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, v. 19, n. 6, p. 533, 2007.
- SÁNDOR, Noémi et al. CD11c/CD18 dominates adhesion of human monocytes, macrophages and dendritic cells over CD11b/CD18. *PloS one*, v. 11, n. 9, p. e0163120, 2016.
- SARRABAYROUSE, Guillaume et al. Tumor-reactive CD4⁺ CD8 $\alpha\beta$ ⁺ CD103⁺ $\alpha\beta$ T cells: A prevalent tumor-reactive T-cell subset in metastatic colorectal cancers. *International journal of cancer*, v. 128, n. 12, p. 2923-2932, 2011.
- SCHLITZER, Andreas; MCGOVERN, Naomi; GINHOUX, Florent. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2015. p. 9-22.
- SEGURA, Elodie. Review of mouse and human dendritic cell subsets. In: *Dendritic Cell Protocols*. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 3-15.
- SEITA, Jun; WEISSMAN, Irving L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, v. 2, n. 6, p. 640-653, 2010.
- SERAFINI, Paolo et al. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Research*, v. 68, n. 13, p. 5439-5449, 2008.
- SERAFINI, Paolo et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 12, p. 2691- 2702, 2006.
- SHANKARAN, Vijay et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, v. 410, n. 6832, p. 1107-1111, 2001.
- SHIELDS, Jacqueline D. et al. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, v. 328, n. 5979, p. 749-752, 2010

- SHORTMAN, Ken; LIU, Yong-Jun. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 3, p. 151, 2002.
- SINHA, Pratima et al. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research*, v. 67, n. 9, p. 4507-4513, 2007.
- SITKOVSKY, Michail V.; OHTA, Akio. The 'danger'sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends in Immunology*, v. 26, n. 6, p. 299-304, 2005.
- STEINBRINK, Kerstin et al. Interleukin-10–treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen–specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 93, n. 5, p. 1634-1642, 1999.
- STEINMAN, Ralph M.; NUSSENZWEIG, Michel C. Dendritic cells: features and functions. *Immunological reviews*, v. 53, n. 1, p. 127-147, 1980.
- SUN, Li et al. GM-CSF quantity has a selective effect on granulocytic vs. monocytic myeloid development and function. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1922, 2018.
- SZABO, Susanne J. et al. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology*, v. 21, n. 1, p. 713-758, 2003.
- TENG, Michele WL et al. IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201003251, 2010.
- THURNER, Beatrice et al. Vaccination with mage-3A1 peptide–pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *Journal of Experimental Medicine*, v. 190, n. 11, p. 1669-1678, 1999.
- TROUPLIN, Virginie et al. Bone marrow-derived macrophage production. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 81, p. e50966, 2013.
- TULOTTA, Claudia et al. Endogenous production of IL1B by breast cancer cells drives metastasis and colonization of the bone

microenvironment. *Clinical Cancer Research*, v. 25, n. 9, p. 2769-2782, 2019.

- VLAD, Anda M.; FINN, Olivera J. Glycoprotein tumor antigens for immunotherapy of breast cancer. *Breast disease*, v. 20, n. 1, p. 73-79, 2004.
- WANG, Yuan et al. High expression of CD11c indicates favorable prognosis in patients with gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 21, n. 31, p. 9403, 2015.
- WARNER, Timothy D. et al. Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. In: *Advances in pharmacology*. Academic Press, 1994. p. 171-194.
- WEAVER, Casey T. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 25, p. 821-852, 2007.
- WEISS, Laurence et al. Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V β -restricted CD4⁺ CD8⁺ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *The Journal of infectious diseases*, v. 178, n. 4, p. 1158-1162, 1998.
- WILSON, Justin E.; KATKERE, Bhuvana; DRAKE, James R. *Francisella tularensis* induces ubiquitin-dependent major histocompatibility complex class II degradation in activated macrophages. *Infection and immunity*, v. 77, n. 11, p. 4953-4965, 2009.
- XU, Yuekang et al. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 11, p. 7577-7584, 2007.
- YANG, Li et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺ CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, v. 6, n. 4, p. 409-421, 2004.
- YANG, Li; PANG, Yanli; MOSES, Harold L. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in immunology*, v. 31, n. 6, p. 220-227, 2010.

- YOGEV, Nir et al. Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor+ regulatory T cells. *Immunity*, v. 37, n. 2, p. 264-275, 2012.
- YOUNG, JAMES W.; STEINMAN, RALPH M. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 171, n. 4, p. 1315-1332, 1990.
- ZHAO, Lan et al. Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic peptide activity. *Circulation*, v. 107, n. 2, p. 234-237, 2003.
- ZHENG, Jin et al. Co-culture of apoptotic breast cancer cells with immature dendritic cells: a novel approach for DC-based vaccination in breast cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, n. 6, p. 510-515, 2012.
- ZLOTNIKOV-KLIONSKY, Yael et al. Perforin-positive dendritic cells exhibit an immuno-regulatory role in metabolic syndrome and autoimmunity. *Immunity*, v. 43, n. 4, p. 776-787, 2015.

ANEXO I – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos publicados:

1. BONFANTI, AMANDA PIRES; BARRETO, NATÁLIA; MUNHOZ, JAQUELINE; CABALLERO, MARCUS; **CORDEIRO, GABRIEL**; ROCHA-E-SILVA, THOMAZ; SUTTI, RAFAEL; MOURA, FERNANDA; BRUNETTO, SÉRGIO; RAMOS, CELSO DARIO; THOMÉ, RODOLFO; VERINAUD, LIANA; RAPÔSO, CATARINA. Spider venom administration impairs glioblastoma growth and modulates immune response in a non-clinical model. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-16, 2020.

Trabalhos apresentados em Congresso:

1. **CORDEIRO, G. S.**; MATO, F. C. P.; BONFANTI, A. P.; MUNHOZ, J.; BARRETO, N.; VERINAUD, L. M. C.; CARNEIRO, C. R. D. Sildenafil (Viagra®, Pfizer) modulates dendritic cells to an activated profile: a potential application for cancer treatment. 2019. 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences.
2. BONFANTI, A. P.; BARRETO, N.; MUNHOZ, J.; ALVES, M. V. C. C. C.; **CORDEIRO, G. S.**; MATO, F. C. P.; SILVA, T. A. R. E.; SUTTI, R.; MOURA, F. N.; BRUNETTO, S. Q.; RAMOS, C. D.; THOME, R.; VERINAUD, L. M. C.; CARNEIRO, C. R. D. Components of the Phoneutria nigriventer spider venom change immune response in brain cancer: a preclinical study in murine model. 2019. 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences.
3. MATO, F. C. P.; **CORDEIRO, G. S.**; BONFANTI, A. P.; MUNHOZ, J.; BOMBEIRO, A.; SILVA, T. A. R. E.; VERINAUD, L. M. C.; CARNEIRO, C. R. D. Molecules isolated from spider venom modulate dendritic cells *in vitro*: a possible application as an immunoadjuvant. 2019. 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences.
4. BONFANTI, A. P.; THOME, R.; COSTA, T. A.; PERON, G.; THOMAZ, L. L.; VICTOR-CARVALHO, P.; **CORDEIRO, GABRIEL**; RAPÔSO, CATARINA; VERINAUD, LIANA. Influence of mTOR signaling on tolerogenic dendritic cells: relevance for the therapy of multiple sclerosis. 2020. I Simpósio LRN e CEVAP - Histórico e perspectivas do uso de biopolímero de fibrina na medicina regenerativa.

ANEXO II – CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA



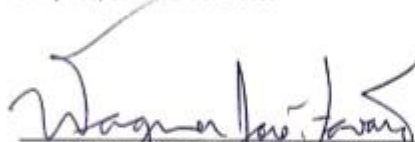
CERTIFICADO

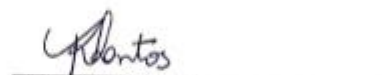
Certificamos que a proposta intitulada TERAPIA COM VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MODULADAS PELO SILDENAFIL (VIAGRA®, PFIZER) PARA TRATAMENTO DO CÂNCER, registrada com o nº 5159-1/2019, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Liana Verinaud, Catarina Raposo Dias Carneiro e Gabriel da Silva Cordeiro, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 14 de março de 2019.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	18/03/2019 - 30/11/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/04/2019 - 30/11/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	78
Idade/Peso:	10 semanas / 25g
Sexo:	Fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGB/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 01 de abril de 2019.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

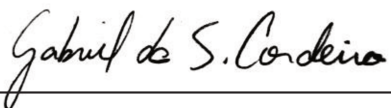
IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO III DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Declaração

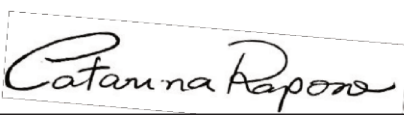
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Terapia com células dendríticas moduladas pelo sildenafil (Viagra Pfizer) para tratamento do câncer**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 24 de fevereiro de 2020

Assinatura :  _____

Nome do(a) autor(a): **Gabriel da Silva Cordeiro**

RG n.º 131856520

Assinatura :  _____

Nome do(a) orientador(a): **Catarina Raposo Dias Carneiro** RG n.º 5393214