MARIANA PEREIRA PINHO

**Análise do repertório de linfócitos T em pacientes
com câncer: desvendando a resposta imune
antitumoral em humanos**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

Versão Original

São Paulo

2019

RESUMO

PINHO, M. P. **Análise do repertório de linfócitos T em pacientes com câncer: desvendando a resposta imune antitumoral em humanos.** 2019. 165 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A tumorigenese é caracterizada pelo acúmulo de mutações e expressão aberrante de proteínas pelas células transformadas, proteínas estas que podem ser reconhecidas pela resposta imune adaptativa do próprio. O estudo do conjunto de linfócitos T capazes de reconhecer o tumor num paciente, ou seja, de seu repertório antitumoral, é de vital importância para o melhor entendimento da relação entre o sistema imune e o câncer. Assim, este projeto teve como objetivo desenvolver um estudo aprofundado do repertório de linfócitos T reativo para tumores em pacientes com câncer, determinando-se a frequência e o padrão de resposta destas células, em diferentes fases de progressão da doença e terapia. Para avaliar a frequência de linfócitos T tumor-reativos, foram desenvolvidas e utilizadas técnicas abrangentes de detecção, que empregam a capacidade proliferativa do linfócito T frente ao seu antígeno cognato para determinar sua especificidade. Utilizando tais técnicas, fomos capazes de encontrar linfócitos T capazes de reagir com antígenos mutados (neoantígenos) em um paciente com carcinoma hepatocelular, e com um antígeno superexpresso (Her2) em pacientes com câncer de mama. Também encontramos linfócitos T reativos para estes antígenos em indivíduos saudáveis, não só no compartimento de células *naïve*, mas também dentre os linfócitos T de memória, o que adiciona evidência à teoria da vigilância imunológica. Vale notar que os linfócitos T Her2-reativos foram capazes de produzir citocinas e eliminar, especificamente, células que superexpressavam tal molécula. A frequência total de linfócitos T tumor-reativos no sangue de pacientes com câncer de mama e com glioblastoma multiforme (GBM) foi estimada utilizando-se, como fonte de antígenos, lisados de células tumorais, tendo, esta, sido maior no sangue dos doentes com câncer de mama. A frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue dos pacientes não se correlacionou com aquela encontrada no tumor, indicando que estas podem diferir significativamente. Mesmo assim, em dois pacientes, a variação temporal da frequência sanguínea de linfócitos T CD4 e CD8 GBM-reativos se correlacionou com a resposta clínica à vacinação experimental com híbridos de células dendríticas. Esta intervenção imune também foi capaz de alterar a capacidade de produção de citocinas pelos linfócitos T CD4 GBM-reativos de um paciente testado. Assim como na vacinação, a retirada cirúrgica do tumor afetou significativamente o repertório de linfócitos T GBM-reativos nos doentes, diminuindo seu número e alterando seu fenótipo. Por fim, dentre os linfócitos T reativos para câncer de mama, fomos capazes de detectar linfócitos T CD8 com possível capacidade supressora e linfócitos T CD4 que apresentavam características pró-tumorais e cujos clones apresentavam subpopulações com fenótipo *helper* distintas. Em conclusão, o estudo da frequência e função dos linfócitos T tumor-reativos aqui mostrado permitiu desvendar características da resposta imune tumoral pouco conhecidas, melhorando o conhecimento que temos da resposta imune antitumoral em humanos.

Palavras-chave: Linfócitos T. Antígenos tumorais. Imunovigilância antitumoral. Imunoterapia. Câncer.

ABSTRACT

PINHO, M. P. **Analysis of the T cell repertoire in cancer patients: unveiling the antitumor immune response in humans.** 2019. 165 p. Ph.D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Tumorigenesis is accompanied by the accumulation of mutations and aberrant expression of various proteins by the transformed cells, which can be recognized by the adaptive immune response in cancer patients. The study of the patient's ability to recognize its tumor, specifically of its antitumor T cell repertoire, is of vital importance for a better understanding of the interplay between the immune system and tumors. Therefore, this project aimed to develop an in-depth study of the tumor-reactive T cell repertoire in cancer patients, determining its frequency and response pattern, at different points of disease progression and therapy. To estimate the frequency of tumor-reactive T lymphocytes, comprehensive detection techniques – that employ the T cell proliferative capacity against its cognate antigen to determine its specificity – were developed. By using such techniques, we could find T cells reactive for mutated antigens (neoantigens) in a patient with hepatocellular carcinoma, and reactive for an overexpressed antigen (Her2) in patients with breast cancer. We also found T lymphocytes reactive for these antigens in healthy individuals, not only in the *naïve* cell compartment, but also among memory T cells, which adds evidence to the theory of immune surveillance. It is noteworthy that Her2-reactive T lymphocytes could produce cytokines and specifically eliminate cells that overexpressed Her2. The total frequency of tumor-reactive T-lymphocytes in the blood of individuals with breast cancer and with glioblastoma multiforme (GBM) was estimated using tumor cell lysates as antigen source, and it was found to be higher in the blood of breast cancer patients. The frequency of tumor-reactive T cells in patients' blood did not correlate with that found among T cells infiltrating the tumor, indicating that these may differ significantly. Even so, in two patients, temporal variation in the blood frequency of GBM-reactive CD4 and CD8 T cells correlated with their clinical response to the experimental vaccination with dendritic-tumor cell hybrids. This immune intervention also changed the cytokine production pattern of GBM-reactive CD4 T lymphocytes in the patient tested. As with vaccination, the surgical removal of the tumor also affected significantly the repertoire of GBM-reactive T lymphocytes in the patients, decreasing their frequency and altering their phenotype. Finally, among the breast cancer-reactive T cells, we detected CD8 T lymphocytes with possible suppressive capacity and CD4 T lymphocytes that had protumoral characteristics and whose clones belonged to multiple distinct subpopulations with different helper phenotypes. Altogether, the results of the frequency and function of the tumor-reactive T lymphocytes shown here unveil some tumor immune response characteristics largely unknown, which improve our understanding of the antitumor immune response in humans.

Keywords: T lymphocytes. Tumor antigens. Antitumor immune surveillance. Immunotherapy. Cancer.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença gerada por alterações nas células do próprio indivíduo, que afeta uma grande parcela da população mundial. Segundo estimativas do INCA do biênio de 2018/2019, só em 2018 seriam diagnosticados mais de meio milhão de novos casos de câncer no Brasil (INCA, 2017). O tratamento do câncer encontra-se fundamentado em três grandes pilares: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Estas áreas estão em constante progresso, com avanços recentes significativos, com o advento de cirurgias cada vez menos invasivas (ACHER et al., 2018), a utilização de radioterapia localizada (GARIBALDI et al., 2017), e o direcionamento dos agentes quimioterápicos (QIN; ZHANG; ZHANG, 2018). Porém, mesmo com todos os tratamentos disponíveis, o câncer continua levando a um número elevado de óbitos, com 9,6 milhões de mortes estimadas em 2018 (BRAY et al., 2018). Nesse contexto, novas abordagens preventivas e terapêuticas mostram-se necessárias e vem sendo desenvolvidas, estando a imunoterapia entre aquelas com maior destaque (COUZIN-FRANKEL, 2013). Por estar cada dia mais presente no leito dos pacientes (BAXEVANIS; PEREZ; PAPAMICHAIL, 2009; FINKELSTEIN, 2013), a imunoterapia é considerada, hoje, como o quarto pilar no tratamento do câncer. Este tratamento visa utilizar componentes do sistema imune para combater a doença e, em geral, procura ativar no paciente com câncer, mecanismos imunológicos que se mostram efetivos em diferentes situações. Sendo assim, esforços no sentido de buscar um maior entendimento sobre a resposta imune específica para tumores são necessários para o desenvolvimento direcionado e racional de novas abordagens imunoterapêuticas.

1.1 O câncer de mama

O câncer de mama é o tipo tumoral com maior incidência entre as mulheres (INCA, 2017), sendo estimado que uma em cada oito mulheres norte americanas desenvolverão câncer de mama durante o curso de sua vida (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Histologicamente, o câncer de mama pode ser dividido em diferentes tipos, sendo o carcinoma ductal invasivo, com cerca de 70% dos casos, o de maior incidência (LI et al., 2003), e um dos focos do presente estudo. O câncer de mama também pode ser classificado de acordo com seu perfil molecular. Três subtipos principais, com alta relevância clínica, são definidos a partir do padrão de

expressão de três proteínas cuja análise já foi incorporada à rotina clínica: o receptor de estrógeno (ER), o receptor de progesterona (PR) e o Her2 (do inglês “*Human epidermal growth factor receptor 2*”) (WITHERBY et al., 2016). O subtipo luminal é caracterizado pela expressão dos receptores hormonais ER e PR, enquanto o subtipo Her2 ocorre quando a proteína Her2, localizada na membrana das células tumorais, aparece em excesso. O terceiro e último subtipo, denominado triplo-negativo, é caracterizado pela ausência de expressão das três moléculas. Além do valor prognóstico, sendo o luminal o subtipo menos agressivo, o subtipo molecular também é decisivo para determinar o tratamento a ser utilizado (WITHERBY et al., 2016). Tumores com expressão dos receptores hormonais podem ser tratados com terapia hormonal, enquanto aqueles com superexpressão de Her2 apresentam, como opção de tratamento, a molécula inibidora Lapatinibe e o anticorpo monoclonal Trastuzumab capazes de afetar sinalização via Her2. Por não apresentar um alvo específico, o subtipo triplo-negativo carece de opções alvo-específicas de tratamento.

Os cultivos a longo prazo de células tumorais isoladas de pacientes com câncer geraram o que hoje chamamos de linhagens tumorais imortalizadas. As linhagens imortalizadas são ferramentas importantes para o estudo do câncer, e até mesmo para formulação de vacinas, devido a sua capacidade de replicar-se indefinidamente, e de manter muitas das características das células tumorais originais (SRIVATSAN et al., 2014). As linhagens de câncer de mama também podem ser divididas nos mesmos subtipos encontrados nos pacientes e, as linhagens MCF-7, SK-BR-3, e MDA-MB-231 utilizadas aqui, são dos subtipos luminal, Her2 e triplo-negativo, respectivamente (DAI et al., 2017). Esta existência de subtipos bem definidos, que apresentam prognósticos, manifestações e tratamentos diferentes, representados por linhagens imortalizadas que mantêm muitas das características dos tumores encontrados nos pacientes fazem do câncer de mama um modelo muito interessante para o estudo amplo da resposta imune contra tumores

1.2 O glioblastoma multiforme

Gliomas são as neoplasias mais frequentes que acometem o sistema nervoso central (SNC), representando 80% de todos os tumores cerebrais (HANIF et al., 2017). Estes podem ser classificados de I a IV, a depender do seu grau de malignidade, sendo o grau IV, conhecido como glioblastoma multiforme (GBM), o mais agressivo e

frequente, correspondendo a aproximadamente 50% de todos os gliomas. O GBM pode surgir diretamente de mutações em células gliais, ou da progressão de astrocitomas (gliomas de menor grau) pré-existentes (LOUIS et al., 2016). O GBM é, atualmente, dividido em quatro subtipos principais de acordo com sua característica transcricional: clássico, pró-neural, neural e mesenquimal. Estudos recentes sugerem, porém, que o subtipo neural possa ser um artefato gerado pela presença de RNA de células não-tumorais nas amostras analisadas (SIDAWAY, 2017). Apesar do potencial valor prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento, ao contrário do câncer de mama, a classificação molecular do GBM ainda não se traduziu em indicações de conduta clínica indiscutíveis (PAOLILLO; BOSELLI; SCHINELLI, 2018).

Mesmo com os avanços terapêuticos, o GBM permanece largamente incurável, com uma taxa de sobrevida mediana de menos de 15 meses (FERNANDES et al., 2017). A ausência de sucesso no tratamento desta doença se deve, em grande parte, aos inúmeros desafios impostos por estes tumores: além de sua localização (que dificulta a ressecção completa do tumor e restringe a chegada de medicamentos devido a barreira hematoencefálica) (KESARI, 2011; SMINIA; WESTERMAN, 2016; YONG; LONER, 2011), o GBM apresenta uma grande heterogeneidade intra e intertumoral, além de um microambiente largamente imunossupressor (NDUOM; WELLER; HEIMBERGER, 2015; PERRIN et al., 2019). Assim sendo, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o GBM é urgentemente necessário.

1.3 O sistema imune, o repertório de linfócitos T e o câncer

O sistema imune é um sistema de reconhecimento, com uma capacidade única de identificação de moléculas. Essa capacidade de “reconhecimento específico” caracteriza o que se convencionou chamar de “imunidade adaptativa”. A imunidade adaptativa depende dos linfócitos T e B, que contêm receptores com características únicas na natureza. O receptor do linfócito T (TCR, do inglês “*T cell receptor*”) e o receptor do linfócito B (BCR, do inglês “*B cell receptor*”) são receptores altamente variáveis, formados a partir de rearranjo gênico, e que recebem o nome de receptores clonais, devido a sua distribuição celular (TONEGAWA, 1983). Todas as moléculas de TCR presentes em um único linfócito T são idênticas, mas as moléculas de TCR de linfócitos T distintos são diferentes, pois cada precursor de linfócito T rearranja o

gene do TCR de forma única, dando origem a uma molécula de TCR com uma especificidade singular. A especificidade do linfócito T só é compartilhada por seu clone, ou seja, por linfócitos T que tenham sido gerados a partir da duplicação da mesma célula. Assim, o conjunto de linfócitos T de um indivíduo – o seu repertório - é capaz de reconhecer um número muito elevado de moléculas diferentes, denominadas antígenos.

Por ser formado a partir de rearranjo, a sequência gênica do TCR é diferente em cada clone. Assim, com o advento de técnicas de sequenciamento de DNA, a análise destas sequências se tornou possível. Este tipo de estudo é frequentemente chamado de estudo de repertório de receptores de linfócitos T (TCR), uma vez que são analisadas as sequências gênicas de um grande conjunto de receptores. Porém, infelizmente, ainda não somos capazes de determinar, a partir da sequência gênica do TCR, o antígeno reconhecido por esta molécula, nem a consequência deste reconhecimento pelo linfócito. Assim, os estudos de sequenciamento de TCR ainda se restringem a avaliação de diversidade e frequência de clones presentes em um conjunto de linfócitos T, ao longo do tempo e/ou em diferentes tecidos. O estudo do conjunto de sequência de TCR presente em um grupo de linfócitos T (análise de repertório dos receptores de linfócitos T), não deve, porém, ser confundido com a análise de repertório de linfócitos T. O estudo do repertório imune, por assim dizer, vai além da análise das sequências dos TCR, podendo englobar diversas análises a serem realizadas em um conjunto de linfócitos T, cujo objetivo seja o melhor entendimento da resposta imune gerada por estes (CORTI; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2011).

O estudo do repertório imune se torna mais complexo a cada dia, com o advento de novas tecnologias que permitem análises até então impossíveis, que tem permitido um rápido avanço no entendimento do funcionamento da resposta imune adaptativa. Neste contexto, o estudo do repertório de linfócitos T capazes de reconhecer tumores se destaca, tanto por suas nuances, uma vez que se trata de resposta a antígenos com grande similaridade a antígenos presentes no próprio indivíduo saudável, quanto por seu grande potencial de tradução clínica.

1.4 Antígenos tumorais e seu reconhecimento por linfócitos T

Por meio do TCR, os linfócitos T reconhecem fragmentos peptídicos de proteínas que sejam apresentados no contexto das moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês “major histocompatibility complex”). Para que os linfócitos T sejam capazes de reconhecer células tumorais, portanto, estas precisam conter peptídeos que possam ser reconhecidos por linfócitos T. Apesar da capacidade, teórica, de reconhecer qualquer proteína, o repertório de linfócitos T de um indivíduo é considerado incompleto. Isto ocorre porque, durante o desenvolvimento dos linfócitos T, estes passam por um processo chamado de tolerância central, em que células que expressarem um TCR capaz de reconhecer peptídeos derivados de proteínas próprias com alta afinidade acabam sendo eliminados ou se diferenciando em linfócitos T reguladores (ITOH et al., 1999; KAPPLER; ROEHM; MARRACK, 1987; XING; HOGQUIST, 2012). Sendo assim, a capacidade do sistema de gerar uma resposta efetora de alta afinidade contra proteínas próprias é reduzida, o que é desejável para evitar que doenças autoimunes sejam desencadeadas. Logo, células tumorais, que são geradas a partir de modificações de células próprias, deveriam apresentar uma baixa imunogenicidade, devido ao processo de seleção do repertório. De fato, em camundongos, o bloqueio transitório da tolerância central é capaz de aumentar a quantidade de linfócitos T antitumorais (KHAN et al., 2014); e camundongos com deficiência do fator de transcrição AIRE, responsável pela expressão de proteínas próprias no timo durante o processo de seleção do repertório, mostraram-se capazes de rejeitar células de melanoma singeneico (ZHU; NAGAVALLI; SU, 2013).

Porém, antes mesmo que os linfócitos T com alta afinidade para antígenos próprios sejam eliminados, o repertório de linfócitos T é selecionado positivamente pela interação de baixa afinidade de seu TCR com as moléculas de MHC (apresentando antígenos próprios) (JAMESON; HOGQUIST; BEVAN, 1995). Portanto, os linfócitos T que fazem parte do repertório de linfócitos T maduros apresentam uma capacidade inata de reconhecer, com baixa afinidade, moléculas de MHC carregadas com proteínas próprias. Assim, não é surpreendente que seja possível encontrar linfócitos T específicos para determinadas proteínas próprias, que embora não exclusivas das células neoplásicas, são classificadas como antígenos associados ao tumor (TAA; do inglês, “*tumor associated antigens*”) (Figura 1). Por

exemplo, linfócitos T CD8 específicos para Melan-A, que é uma proteína própria expressa em melanócitos e em células tumorais de melanoma, assim como linfócitos T CD4 Melan-A-específicos, podem ser encontrados em alguns pacientes com melanoma, e até mesmo em alguns indivíduos normais (BIOLEY et al., 2006; LEE et al., 1999b; PITTET et al., 1999).

Figura 1 – Classificação de antígenos tumorais. Classes de antígenos tumorais considerados específicos (TSA) e associados (TAA) a tumores, com exemplos de membros de cada classe, e esquema do padrão de expressão nas células tumorais comparado com a expressão em tecidos normais de indivíduos saudáveis. *Criado com BioRender.com.*

Já foram encontrados em pacientes com câncer linfócitos T específicos para diversos TAA. Alguns TAA são proteínas cuja expressão é aumentada no tumor, outras proteínas cuja expressão é típica em células germinativas e outros ainda, restritos a um determinado tecido. Além dos antígenos associados a tumores, existem também antígenos que são encontrados apenas nos tumores (TSA; do inglês, “*tumor specific antigens*”) (Figura 1). O TCR expresso por um linfoma de células T foi um dos primeiros TSA descritos, o que, inclusive, ajudou na caracterização posterior do, até então desconhecido, receptor específico do linfócito T (ALLISON; MCINTYRE;

BLOCH, 1982). Antígenos de vírus presentes em tumores associados a infecções virais são classificados, em geral, como TSA – embora, neste caso, a definição de “especificidade tumoral” seja falha e a melhor descrição talvez fosse de “antígenos virais associados a tumor”. Por outro lado, o processo de tumorigênese é caracterizado por um acúmulo de mutações nas células transformadas (BOZIC et al., 2010; LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003). As proteínas mutadas muitas vezes são capazes de gerar peptídeos diferentes que podem ser reconhecidos com alta afinidade por linfócitos T, o que permite que tais proteínas sejam chamadas de “neoantígenos tumorais”. A simples capacidade de ser reconhecido pelo sistema, todavia, não garante que uma resposta imune com relevância clínica possa ser montada contra estes antígenos.

1.5 Interações entre o sistema imune e o câncer

A ideia de que células tumorais poderiam ser reconhecidas e eliminadas pelo sistema imune surgiu com a teoria da vigilância imunológica (BURNET, 1961; EHRLICH, 1909). Segundo a teoria, o sistema imune estaria constantemente eliminando células que estivessem sofrendo o processo de transformação maligna, protegendo o indivíduo da doença. No paciente que desenvolve a doença clinicamente, o que ocorreria seria um “escape” à vigilância, pela seleção de células mais agressivas (BURNET, 1970). Embora contestada logo após sua proposição, estudos em camundongos imunodeficientes acabaram por demonstrar, inequivocamente, que o sistema imune, de fato, exerce pressão seletiva durante a tumorigênese e que tumores que se desenvolvem em animais imunodeficientes, são rapidamente eliminados em animais imunocompetentes (DUNN et al., 2002). Esta capacidade de imunovigilância é bastante suportada por outros dados experimentais (KOEDEL et al., 2007; SMYTH; DUNN; SCHREIBER, 2006), e implica que tumores que se desenvolvem dependem de células “sobreviventes”, que estabeleceriam um equilíbrio com o sistema imune que, eventualmente, escapam e dão origem a uma doença progressiva (Figura 2). Além dos dados experimentais, evidências de que tal proteção imune existe incluem, mas não se restringem, à maior incidência de câncer em indivíduos com imunodeficiência (ENGELS et al., 2008) e a presença de inúmeros mecanismos de escape do sistema imune nas células tumorais humanas (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Figura 2 – Os três E's da progressão tumoral. Esquema indicando as diferentes formas de interação entre o sistema imune e células neoplásicas. Na primeira, ocorre a eliminação das células tumorais por meio de células com capacidade antitumoral, num processo chamado de Imunovigilância Tumoral. A fase de equilíbrio é aquela em que se acredita que a imunoeedição tumoral seja mais relevante. Nesta etapa ocorre a eliminação de determinadas células tumorais pelo sistema imune, e a seleção de clones mais resistentes. Assim, os tumores passam a conter cada vez mais células resistentes ao sistema imune, as quais, frequentemente, ainda apresentam capacidades imunossupressoras, até que escapam dos mecanismos efetores da resposta imune, gerando uma doença progressiva. *Criado com BioRender.com.*

Assim, durante a progressão do tumor, aconteceria o que é chamado de imunoeedição: a pressão exercida pela resposta imune faria uma seleção de clones capazes de escapar dos mecanismos efetores da resposta imune, ou até mesmo subvertê-la a seu favor (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Células tumorais são capazes de utilizar uma variedade de mecanismos de evasão do sistema imune, muitos dos quais são mecanismos ativados para limitar a resposta imune em condições fisiológicas (TING KOH; LUZ GARCÍA-HERNÁNDEZ; MARTIN KAST, 2006). Um exemplo de mecanismo de evasão bastante conhecido e relevante para a prática clínica é a expressão da molécula PD-L1 (do inglês “*programmed cell death ligand 1*”) por células tumorais. A expressão de PD-L1 por células tumorais pode ser induzida pelo IFN-γ produzido pelos linfócitos T presentes no microambiente tumoral, um processo que já foi descrito tanto no câncer de mama quanto no GBM (ALI et al., 2015; CASTRO et al., 2018; QIAN et al., 2018). Outra via de imunossupressão existente, mas menos conhecida, é composta pelas ectonucleotidases CD39 e CD73, presentes na superfície celular, e que são capazes de clivar o ATP extracelular em

adenosina, que, por sua vez, é capaz de exercer diferentes funções supressoras (ANTONIOLI et al., 2013; DEAGLIO et al., 2007).

Um número crescente de estudos indica que o sistema imune é capaz de alterar, positiva e negativamente, o crescimento tumoral. Os diferentes tipos de células imunes que compõem o microambiente tumoral são responsáveis por modular a doença, e modificar o balanço entre as atividades pró- e antitumoral do sistema (BURKHOLDER et al., 2014). Linfócitos T, quando ativados, são capazes de se diferenciar em subtipos com funções efetoras distintas (PATENTE et al., 2019). O papel relativo de cada subpopulação de linfócitos T na resposta imune contra o câncer, porém, ainda é, em grande parte, desconhecido como se verá a seguir.

1.6 Subtipos de linfócitos T e seu papel na resposta ao câncer

Quando ativados, linfócitos T CD8 podem adquirir capacidade citotóxica, tornando-se linfócitos T citotóxicos (CTL). A estas células é atribuído grande potencial antitumoral, uma vez que elas podem induzir, diretamente, a morte das células tumorais (MAHER; DAVIES, 2004). Outros mecanismos de ação, como a produção de IFN- γ por essas células, também se mostraram importantes no combate ao câncer, sendo, em alguns casos, até mais importantes do que a citotoxicidade mediada pelas CTL (BARTH JR. et al., 1991; QIN et al., 2003). Porém, linfócitos T CD8 nem sempre apresentam capacidade antitumoral, podendo até apresentar características supressoras, ainda muito negligenciadas (WALLER et al., 2006). De fato, vários trabalhos reportam não haver correlação entre a presença de linfócitos T CD8, capazes de reconhecer o tumor e a resposta clínica obtida após imunoterapia (LEE et al., 1999a; NIELSEN; MARINCOLA, 2000).

Em camundongos, por exemplo, a resposta protetora obtida utilizando imunização com híbridos de células dendríticas e células tumorais ocorre, pelo menos em parte, devido à ativação de linfócitos T CD4 por essas células (Tanaka et al., 2005; Koido et al., 2014). Curiosamente, todavia, o papel dos linfócitos T CD4 no controle do câncer é muito menos conhecido. Sabe-se que esses linfócitos são necessários para a correta ativação dos linfócitos T citotóxicos (CHURCH et al., 2014), mas sua contribuição para a resposta antitumoral vai, muito provavelmente, além dos mecanismos ligados à ativação de uma resposta citotóxica (GERLONI; ZANETTI, 2005).

Os linfócitos T CD4 são, em geral, os responsáveis por coordenar a resposta imunológica em sua atividade como linfócitos T *helper* (Th) (STEINMAN, 2003). Esses linfócitos T são capazes de se diferenciar em subtipos com funções efetoras distintas e que podem ser caracterizados pela expressão diferencial tanto de fatores de transcrição, quanto de receptores de quimiocinas (ZIELINSKI et al., 2011). Sua diferenciação depende, fortemente, do microambiente em que são ativados e, mais especificamente, das citocinas nele encontradas (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Uma das principais fontes das citocinas que determinam o padrão de resposta dos linfócitos T são as células dendríticas (DC) (DE SAINT-VIS et al., 1998). As DC são células apresentadoras de antígenos, que apresentam uma capacidade única de ativar linfócitos T *naïve* e, portanto, iniciar uma resposta imune primária (STEINMAN; NUSSENZWEIG, 1980).

Quando produzem grandes quantidades de TGF- β , as DC induzem, preferencialmente, a diferenciação dos linfócitos T em células reguladoras (Treg), que se caracterizam pela expressão elevada do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25), baixa expressão de CD127, e a presença do fator de transcrição Foxp3 (MALDONADO; VON ANDRIAN, 2010). Não só as citocinas oferecem um papel importante nesta diferenciação, mas outras moléculas expressas pelas células dendríticas também tem se mostrado determinantes para este processo. É o caso, por exemplo, da expressão de Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) pelas células dendríticas, o que as torna capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T *naïve* em Treg (RODRIGUES et al., 2016).

Quando se consideram os linfócitos T CD4 “efetores”, três diferentes subtipos de linfócitos T *helper* podem ser destacados: linfócitos Th1, cuja diferenciação depende de IL-12, e que são caracterizados pela expressão de T-bet, produção de IFN- γ e expressão dos receptores de quimiocina CCR5 e CXCR3; linfócitos Th2, induzidos por IL-4 e caracterizados pela expressão de GATA-3, produção de IL-4 e expressão dos receptores CCR4 e CCR3; e linfócitos Th17, diferenciados, em camundongos, na presença de IL-6 e TGF- β e caracterizados pela expressão de ROR γ t, produção de IL-17 e IL-22 e expressão de CCR6 (KAPSENBERG, 2003; PATENTE et al., 2019; ZIELINSKI et al., 2011) (Figura 3). Além destes, diversos outros subtipos de linfócitos Th já foram descritos, como os Th22, Th9 e os linfócitos T *helper* foliculares (Tfh), todos estes capazes de exercer papéis distintos na resposta contra o câncer (LIUDAHL; COUSSENS, 2018).

Figura 3 – Subtipos de linfócitos T CD4 e seu papel na resposta imune ao câncer. Linfócitos T CD4, dependendo do estímulo que recebem durante sua ativação inicial, podem se diferenciar em células *helper* com características diferentes, que expressam fatores de transcrição, citocinas, e receptores de quimiocinas distintos. Todos estes linfócitos T apresentam papéis na resposta contra o câncer. Porém, cada subtipo pode exercer funções diversas, ou até mesmo antagônicas na resposta imune ao câncer, tornando-se pró- ou antitumoral a depender do microambiente onde estão inseridos.

Diversos estudos mostram que os linfócitos T CD4 são capazes, por si só, de proteger o indivíduo do desafio com células tumorais e, também, induzir a regressão de cânceres sólidos e hematológicos (COHEN et al., 2000; FUJIWARA et al., 1984; GREENBERG; KERN; CHEEVER, 1985). Porém, subtipos de linfócitos T CD4 podem apresentar papéis anti e pró-tumorais distintos, sendo ainda muito discutido qual seria o subtipo ideal quando se pretende induzir uma resposta contra o câncer (Figura 3). Classicamente, linfócitos Th1 são classificados como tendo maior capacidade antitumoral, enquanto linfócitos Th2 apresentariam um viés pró-tumoral (LIUDAHL; COUSSENS, 2018). Porém, curiosamente, apesar da visão usual de que se tratam de células com funções antagônicas, tanto linfócitos Th1 quanto Th2 podem orquestrar respostas antitumorais capazes de erradicar o tumor (NISHIMURA et al., 1999). Apesar disto, os linfócitos Th17, na verdade, são o subtipo com o papel mais controverso na resposta imune contra o câncer, já tendo sido descritos como tendo papéis tanto anti quanto pró-tumoral, dependendo da neoplasia e modelo estudado (BAILEY et al., 2014; WILKE et al., 2011; YOUNG, 2016). Intrigantemente, um estudo que comparou diretamente o papel dos diferentes subtipos de linfócitos Th contra um

mesmo antígeno tumoral mostrou que, no modelo estudado, os linfócitos Th17 foram os mais eficientes no combate ao câncer, num processo criticamente dependente da produção de IFN- γ (MURANSKI et al., 2008). Pode parecer estranho que a ação efetora de células Th17 seja devida à produção de IFN- γ , uma citocina característica da resposta Th1; na verdade, um crescente número de dados tem mostrado a existência, em humanos, de linfócitos T *helper* capazes de produzir as duas citocinas IL-17 e IFN- γ (ANNUNZIATO et al., 2007). Estas células, às vezes denominadas de Th1/Th17 ou Th1*, são caracterizadas pela expressão de ambos CXCR3 (expresso em linfócitos Th1) e CCR6 (expresso em linfócitos Th2), e parecem estar relacionadas a resposta contra a *Mycobacterium tuberculosis* (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007). Seu papel na resposta antitumoral, porém, ainda é pouco estudado.

1.7 Importância da análise da resposta imune ao câncer

Como mencionado acima, muitos estudos apontam para o fato de que os componentes da resposta imune adaptativa são capazes de reconhecer e eliminar especificamente células tumorais. Por outro lado, quando se tenta recrutar o sistema imune contra o câncer, em protocolos de imunoterapia ativa (ou mesmo passiva), os mecanismos que atuam e contribuem, efetivamente, para o controle da doença nos pacientes com câncer ainda são imprecisamente conhecidos. Isto dificulta o aperfeiçoamento destes protocolos e se reflete na heterogeneidade das respostas entre os pacientes, apesar de se observarem, muitas vezes, melhora significativa no quadro clínico da doença (DRAUBE et al., 2011; STRIOGA et al., 2013).

No geral, parece consensual na literatura que a presença de antígenos tumorais reconhecíveis pela resposta imune do paciente está associada a boas respostas clínicas à imunoterapia. Este é o caso da associação entre e a carga mutacional de diversos tipos tumorais específicos e a melhor resposta ao tratamento com inibidores de *checkpoints*, como os anticorpos específicos para CTLA-4 (do inglês “*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*”), PD-1 (do inglês “*programmed cell death protein 1*”) e seu ligante PD-L1 (GIBNEY; WEINER; ATKINS, 2016); ou a correlação entre maior eficácia da imunoterapia com linfócitos infiltrantes do tumor (T-TIL; do inglês “*tumor-infiltrating lymphocytes*”) com a frequência de células tumor-específicas entre as mesmas (LU et al., 2014).

Apesar de sua importância indiscutível, o rastreio da resposta imune de linfócitos T antitumorais apresenta um desafio considerável, especialmente no que diz respeito a uma avaliação ampla do repertório capaz de reagir contra tumores. A maioria dos trabalhos que analisam a presença e frequência de linfócitos T específicos para o câncer utiliza multímeros de MHC. Esses multímeros são compostos por moléculas de MHC conjugadas a fluorocromos e carregadas com peptídeos que, quando em contato com linfócitos T, se ligam nos linfócitos cujos TCRs sejam restritos pela molécula de MHC utilizada no multímero, e específicos para o peptídeo ligado nessas moléculas (BAKKER; SCHUMACHER, 2005). Logo, a identificação de linfócitos T específicos para antígenos tumorais é limitada, uma vez que só é possível para os linfócitos T que reconhecem epítomos selecionados de proteínas tumorais. Sendo assim, o conhecimento que se pode conseguir desta maneira é restrito e não necessariamente representa o que acontece com todo o repertório de linfócitos T que reage àquele antígeno e, principalmente, com o repertório completo de linfócitos T capazes de reagir contra o tumor (Figura 4).

Uma outra categoria de métodos utilizada para verificar a presença de linfócitos T específicos para tumores se baseia na utilização de uma característica funcional dos linfócitos T como indicativo de especificidade (Figura 4). As duas metodologias mais utilizadas envolvem a detecção da produção de citocinas, especialmente IFN- γ , por meio da técnica de ELISPOT, e o ensaio de citotoxicidade celular, que consiste em avaliar a presença de linfócitos T capazes de eliminar células tumorais. Estas técnicas são especialmente úteis na avaliação da presença de linfócitos T CD8 com capacidade antitumoral, uma vez que se utiliza de dois mecanismos efetores importantes no controle da doença, como forma de avaliar a presença de células reativas. Porém, estes métodos falham em detectar linfócitos T que não apresentam tais mecanismos efetores, e são especialmente deficientes na avaliação da presença de linfócitos T CD4 tumor-reativos.

Figura 4 – Metodologias para detecção de linfócitos T específicos. O rastreamento de linfócitos T específicos para um determinado antígeno pode ser feito por meio da avaliação de sua ligação direta ao complexo formado pelo MHC com o peptídeo de interesse (Ensaio de ligação com multímeros), ou por meio da resposta dos linfócitos T quando em contato com o antígeno para os quais são específicos. Esta resposta pode ser detectada pela produção de citocinas – como no caso da avaliação da produção de IFN- γ via ELISPOT – pela capacidade de eliminar alvos contendo o antígeno (análise de citotoxicidade), ou até mesmo pela resposta proliferativa. Dentre as três, a análise de proliferação é a única que não depende diretamente da função exercida pelo linfócito estudado.

Sendo assim, visando a análise ampla e com menor viés funcional da frequência de linfócitos T, do que a encontrada com as outras técnicas disponíveis, a frequência de linfócitos T tumor-reativos neste trabalho foi calculada principalmente utilizando uma técnica descrita recentemente e com potencial de avaliar de maneira muito mais abrangente o repertório: a metodologia de triagem de bibliotecas de linfócitos T (CAMPION et al., 2014; GEIGER et al., 2009). Essas bibliotecas são construídas a partir da separação dos linfócitos T, de acordo com o seu fenótipo de superfície, nas subpopulações de linfócitos T de interesse (como, por exemplo, *naïve*/memória) (ZIELINSKI et al., 2011) e posterior expansão inespecífica de todos os clones presentes em cada subpopulação de linfócitos T, utilizando IL-2 e fitohemaglutinina (PHA) (MORETTA et al., 1983). As células de cada biblioteca são,

então, desafiadas com antígenos tumorais específicos apresentados por células apresentadoras de antígeno, sendo considerados específicos para o antígeno, os linfócitos T que sofrerem proliferação (GUY et al., 2013). Para aprendizagem do método, o trabalho contou com a colaboração da criadora deste, a Dra. Federica Sallusto, por meio de um estágio de pesquisa realizado na Suíça. Durante o trabalho, variações desta técnica foram testadas e implementadas, sendo discutidas adiante, visando adaptá-lo para o contexto tumoral, onde a afinidade baixa e os mecanismos de evasão tumoral são capazes de atrapalhar a identificação dos linfócitos T tumor-específicos.

Parece claro que o aprimoramento dos protocolos de imunoterapia ativa contra o câncer depende tanto da determinação do potencial real de reconhecimento de TAA pelo sistema imune dos pacientes, quanto da avaliação do tipo de resposta imune que os linfócitos T que reconhecem esses antígenos geram *in vivo* frente à doença. Portanto, o presente projeto visa avaliar o repertório de linfócitos T CD8 e CD4 capazes de reconhecer antígenos tumorais em indivíduos saudáveis e em pacientes com câncer, nestes, tanto antes quanto depois de intervenções imunoterapêuticas. Além da determinação da frequência de linfócitos T específicos para antígenos tumorais, também será avaliado o fenótipo funcional dessas células, desvendando, assim, a evolução da resposta imune frente a uma neoplasia, à medida que ela progride ou, por outro lado, regride, em resposta ao tratamento.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que:

- ❖ Indivíduos saudáveis apresentam linfócitos T de memória reativos para antígenos tumorais, que, por serem células de memória, seriam capazes de patrulhar os tecidos, e, portanto, de exercer funções de imunovigilância contra o câncer.
- ❖ A frequência e a relação entre linfócitos T tumor-reativos CD4 e CD8 nos pacientes com câncer podem diferir significativamente entre pacientes com tumores gerados em tecidos diferentes, mas também entre subtipos de tumores com a mesma origem.
- ❖ Em humanos, as frequências de linfócitos T tumor-reativos no sangue e infiltrando os tumores podem não apresentar uma correlação direta, fazendo com que seja necessário cuidado ao tentar considerar dados de imunidade antitumoral no sangue como representativos das condições encontradas dentro do tumor.
- ❖ Apesar da falta de correlação entre sangue e tumor, a análise da frequência, assim como da função, dos linfócitos T tumor-reativos no sangue dos pacientes pode fornecer informações com possível valor prognóstico, e que ajudem no entendimento da evolução do repertório antitumoral durante intervenções imunoterapêuticas.
- ❖ Linfócitos T específicos para proteínas próprias consideradas associadas a tumores (como o Her2) podem estar presentes, em frequências relativamente elevadas, no sangue de indivíduos saudáveis e com câncer, podendo vir a contribuir significativamente com a resposta imune ao câncer.
- ❖ Linfócitos T CD8 específicos para Her2 parecem ser capazes de eliminar apenas células com expressão aumentada desta molécula, indicando que

estes parecem ser capazes de discernir o nível de expressão desta molécula, reagindo apenas quando uma expressão elevada é detectada.

- ❖ Linfócitos T CD8 tumor-reativos, além de sua capacidade citotóxica já bem descrita na literatura, podem, também, suprimir a resposta imune, por meio do bloqueio da proliferação de linfócitos T CD4. Este possível viés pró-tumoral dos linfócitos T CD8 reitera a importância da determinação da função de tais células, quando estas estão presentes infiltrando tumores.
- ❖ Linfócitos T CD4 tumor-reativos, mesmo quando não apresentam um fenótipo de linfócitos Treg, podem exercer múltiplas funções imunossupressoras, como aumentar a expressão de PD-L1 em células tumorais, recrutar neutrófilos pró-tumorais, e produzir adenosina, que tem atividade imunossupressora.
- ❖ Linfócitos T CD4 tumor-reativos podem apresentar multifuncionalidade ao nível clonal, ou seja, células de um mesmo clone de linfócitos T podem adquirir fenótipos distintos (Th1, Th17 e Th1/17) estáveis temporalmente.
- ❖ A cirurgia parece modular significativamente, e de maneira sistêmica, o sistema imune dos pacientes, por meio da diminuição do número de linfócitos T tumor-reativos e alteração em sua capacidade de produção de citocinas.
- ❖ A vacinação com híbridos de células dendríticas e tumorais é capaz de aumentar a frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue dos pacientes, e modular o fenótipo destes. Tais alterações podem vir a se correlacionar com a resposta clínica dos pacientes.

Sendo assim, fomos capazes de mostrar que o estudo do repertório de linfócitos T tumor-reativos, quando acoplado à análise de sua frequência e função, contribui para um melhor entendimento da resposta imune antitumoral em humanos. Esta avaliação, quando feita de uma forma mais abrangente como aqui mostrado, é capaz de revelar características da resposta imune tumoral nunca antes descritas, e que podem servir como base para o desenvolvimento racional de novas estratégias imunoterapêuticas.

REFERÊNCIAS¹

- ACHER, A. W. et al. Advances in surgery for pancreatic cancer. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 9, n. 6, p. 1037–1043, dez. 2018.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17–producing T helper memory cells. **Nature Immunology**, v. 8, n. 6, p. 639–646, 7 jun. 2007.
- ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 14 ago. 2013.
- ALI, H. R. et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1488–1493, jul. 2015.
- ALLISON, J. P.; MCINTYRE, B. W.; BLOCH, D. Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 129, n. 5, p. 2293–300, nov. 1982.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018**. [s.l: s.n.].
- ANANTH, A. A. et al. Surgical Stress Abrogates Pre-Existing Protective T Cell Mediated Anti-Tumor Immunity Leading to Postoperative Cancer Recurrence. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155947, 19 maio 2016.
- ANNUNZIATO, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1849–1861, 6 ago. 2007.
- ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, jun. 2013.
- ANZ, D. et al. CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 10, p. 2417–2426, 15 nov. 2011.
- AUBERT, R. D. et al. Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 52, p. 21182–7, 27 dez. 2011.
- BAILEY, S. R. et al. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 276, 2014.
- BAKKER, A. H.; SCHUMACHER, T. N. MHC multimer technology: current status and future prospects. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 428–433, 2005.
- BARBIERI, C. et al. Effect of surgical treatment on the cellular immune response of gastric cancer patients. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 36, n. 3, p. 339–45, mar. 2003.
- BARTH JR., R. J. et al. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 3, p. 647–658, 1991.

BASDEO, S. A. et al. Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 198, n. 6, p. 2249–2259, 15 mar. 2017.

BAXEVANIS, C. N.; PEREZ, S. A.; PAPAMICHAIL, M. Cancer immunotherapy. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 46, n. 4, p. 167–189, 2009.

BECATTINI, S. et al. T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4⁺ T cell clones primed by pathogens or vaccines. **Science (New York, N.Y.)**, v. 347, n. 6220, p. 400–6, 23 jan. 2015.

BECK, L.; ROTH, R.; SPIEGELBERG, H. L. Comparison of monocytes and B cells for activation of human T helper cell subsets. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 78, n. 1, p. 56–60, jan. 1996.

BENEVIDES, L. et al. IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. **Cancer Research**, v. 75, n. 18, p. 3788–3799, 15 set. 2015.

BERGER, M. et al. IgE antibodies to Staphylococcus aureus and Candida albicans in patients with the syndrome of hyperimmunoglobulin E and recurrent infections. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 125, n. 6, p. 2437–43, dez. 1980.

BEVAN, M. J. Helping the CD8⁺ T-cell response. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 595–602, ago. 2004.

BÉZIE, S.; ANEGON, I.; GUILLONNEAU, C. Advances on CD8⁺ Treg Cells and Their Potential in Transplantation. **Transplantation**, v. 102, n. 9, p. 1467–1478, set. 2018.

BIOLEY, G. et al. Melan-A/MART-1-specific CD4 T cells in melanoma patients: identification of new epitopes and ex vivo visualization of specific T cells by MHC class II tetramers. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 6769–6779, 2006.

BOZIC, I. et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 43, p. 18545–18550, 2010.

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

BROSSART, P. et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3102–3108, 2000.

BRYN, T. et al. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3⁺ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism. **International immunology**, v. 20, n. 2, p. 235–45, 1 fev. 2008.

BÜCHELE, S.; HÖPFL, R. Presentation of tetanus toxoid to autologous T cells by dendritic cells generated from human blood. Improved specificity with dendritic cells generated without fetal calf serum. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 417, p. 233–7, 1997.

BURKHOLDER, B. et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 182–201, abr. 2014.

BURNET, F. M. Immunological recognition of self. **Science (New York, N.Y.)**, v. 133, n. 3449, p. 307–11, 3 fev. 1961.

BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res**, v. 13, p. 1–27, 1970.

BUTLER, M. O. et al. Ex vivo expansion of human CD8+ T cells using autologous CD4+ T cell help. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30229, 12 jan. 2012.

BUTLER, M. O.; HIRANO, N. Human cell-based artificial antigen-presenting cells for cancer immunotherapy. **Immunological Reviews**, v. 257, n. 1, p. 191–209, jan. 2014.

CAMPION, S. L. et al. Proteome-wide analysis of HIV-specific naive and memory CD4(+) T cells in unexposed blood donors. **J Exp Med**, v. 211, n. 7, p. 1273–1280, 2014.

CARRASCO, J. et al. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2897–2905, 2006.

CARRENO, B. M. et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 348, n. 6236, p. 803–8, 15 maio 2015.

CASTRO, F. et al. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 847, 4 maio 2018.

CEPEK, K. L. et al. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha E\beta 7$ integrin. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 190–193, 10 nov. 1994.

CHEN, A. M. et al. Virus-specific and bystander CD8 T cells recruited during virus-induced encephalomyelitis. **Journal of virology**, v. 79, n. 8, p. 4700–8, abr. 2005.

CHEN, X.; JENSEN, P. E. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 56, n. 2, p. 77–83, abr. 2008.

CHOI, E. M.-L. et al. High Avidity Antigen-Specific CTL Identified by CD8-Independent Tetramer Staining. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 10, p. 5116–5123, 15 nov. 2003.

CHURCH, S. E. et al. Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 1, p. 69–79, 2014.

CLARKE, S. R. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. **Journal of leukocyte biology**, v. 67, n. 5, p. 607–14, maio 2000.

CLAVIJO-SALOMON, M. A. et al. Monocyte-derived dendritic cells reflect the immune functional status of a chromophobe renal cell carcinoma patient: Could it be a general phenomenon? **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 64, n. 2, p. 161–171, 15 fev. 2015.

CLIFTON, G. T. et al. Clinical Development of the E75 Vaccine in Breast Cancer. **Breast care (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 2, p. 116–21, abr. 2016.

CLOUGHESY, T. F. et al. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma.

Nature Medicine, v. 25, n. 3, p. 477–486, 11 mar. 2019.

COHEN, C. J. et al. Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 10, p. 3981–3991, 1 out. 2015.

COHEN, P. A. et al. CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. **Crit Rev Immunol**, v. 20, n. 1, p. 17–56, 2000.

CORTI, D.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. High throughput cellular screens to interrogate the human T and B cell repertoires. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 3, p. 430–435, 2011.

COUZIN-FRANKEL, J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. **Science**, v. 342, n. 6165, p. 1432–1433, 2013.

DĄBROWSKA, A. M.; SŁOTWIŃSKI, R. The immune response to surgery and infection. **Central-European journal of immunology**, v. 39, n. 4, p. 532–7, 2014.

DAI, X. et al. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017.

DATTA, J. et al. Progressive loss of anti-HER2 CD4(+) T-helper type 1 response in breast tumorigenesis and the potential for immune restoration. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 10, p. e1022301, 2015.

DE SAINT-VIS, B. et al. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. **J Immunol**, v. 160, n. 4, p. 1666–1676, 1998.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–1265, 11 jun. 2007.

DIETRICH, J. et al. Corticosteroids in brain cancer patients: benefits and pitfalls. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 233–42, mar. 2011.

DOBRZANSKI, M. J. Expanding Roles for CD4 T Cells and Their Subpopulations in Tumor Immunity and Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 63, 2013.

DRAUBE, A. et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18801, 2011.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 137–148, ago. 2004.

EGELSTON, C. A. et al. Human breast tumor-infiltrating CD8+ T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4297, 16 dez. 2018.

EHRlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v. 5, p. 273–290, 1909.

ENGELS, E. A. et al. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency

virus in the United States. **Int J Cancer**, v. 123, n. 1, p. 187–194, 2008.

ERTEL, A. et al. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. **Molecular cancer**, v. 5, n. 1, p. 55, 2 nov. 2006.

FERNANDES, C. et al. **Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy**. [s.l.: s.n.].

FINKELSTEIN, S. E. From bench to bedside: bringing immunotherapy into the clinic. **Cancer Control**, v. 20, n. 1, p. 4–5, 2013.

FUJIWARA, H. et al. The role of tumor-specific Lyt-1+2- T cells in eradicating tumor cells in vivo. I. Lyt-1+2- T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of in vivo immunity. **J Immunol**, v. 133, n. 3, p. 1671–1676, 1984.

GARIBALDI, C. et al. Recent advances in radiation oncology. **ecancermedicalsecience**, v. 11, 2017.

EGINAT, J. et al. Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 630, 16 dez. 2014.

GEIGER, R. et al. Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. **J Exp Med**, v. 206, n. 7, p. 1525–1534, 2009.

GERLONI, M.; ZANETTI, M. CD4 T cells in tumor immunity. **Springer Semin Immunopathol**, v. 27, n. 1, p. 37–48, 2005.

GERMEAU, C. et al. High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 241–8, 17 jan. 2005.

GIBNEY, G. T.; WEINER, L. M.; ATKINS, M. B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 12, p. e542–e551, dez. 2016.

GONZÁLEZ-GALARZA, F. F. et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D784–D788, 28 jan. 2015.

GREENBERG, P. D.; KERN, D. E.; CHEEVER, M. A. Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1+,2- T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells. **J Exp Med**, v. 161, n. 5, p. 1122–1134, 1985.

GROS, A. et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. **Nature Medicine**, v. 22, n. 4, p. 433–438, 22 abr. 2016.

GUSTAFSON, M. P. et al. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DRlo/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 7, p. 631–44, jul. 2010.

GUY, C. S. et al. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 3, p. 262–270, 2013.

HAABETH, O. A. W. et al. How Do CD4+ T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 174, 15 abr. 2014.

HAILEMICHAEL, Y.; OVERWIJK, W. W. Cancer vaccines: Trafficking of tumor-specific T cells to tumor after therapeutic vaccination. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 53, p. 46–50, ago. 2014.

HAMAI, A. et al. Human TH17 Immune Cells Specific for the Tumor Antigen MAGE-A3 Convert to IFN- γ -Secreting Cells as They Differentiate into Effector T Cells In Vivo. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p. 1059–1063, 1 mar. 2012.

HANIF, F. et al. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017.

HOBEIKA, A. C. et al. Enumerating antigen-specific t-cell responses in peripheral blood: A comparison of peptide MHC tetramer, ELISpot, and intracellular cytokine analysis. **Journal of Immunotherapy**, v. 28, n. 1, p. 63–72, 2005.

HUEMAN, M. T. et al. Analysis of naïve and memory CD4 and CD8 T cell populations in breast cancer patients receiving a HER2/neu peptide (E75) and GM-CSF vaccine. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 2, p. 135–146, 2007.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **J Leukoc Biol**, v. 71, n. 6, p. 907–920, 2002.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro INCA RJ, , 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018>>

IQBAL, N.; IQBAL, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **Molecular Biology International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

ITOH, M. et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5317–5326, 1 maio 1999.

JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A.; BEVAN, M. J. Positive Selection of Thymocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 93–126, abr. 1995.

JANEWAY JR, C. et al. **T cell-mediated cytotoxicity.** 5th edition ed. [s.l.] Garland Science, 2001.

JANSSEN, E. M. et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. **Nature**, v. 434, n. 7029, p. 88–93, 3 mar. 2005.

JARNICKI, A. G. et al. Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- β -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 2, p. 896–904, 15 jul. 2006.

JENKINS, M. K.; MOON, J. J. The Role of Naive T Cell Precursor Frequency and Recruitment in Dictating Immune Response Magnitude. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4135–4140, 1 maio 2012.

JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 6, p. e1792–e1792, 18 jun. 2015.

KAHLERT, H. et al. T Cell Reactivity with Allergoids: Influence of the Type of APC. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 4, p. 1807–1815, 15 ago. 2000.

KAPPLER, J. W.; ROEHM, N.; MARRACK, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. **Cell**, v. 49, n. 2, p. 273–280, 24 abr. 1987.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. December, p. 984–993, 2003.

KESARI, S. Understanding Glioblastoma Tumor Biology: The Potential to Improve Current Diagnosis and Treatments. **Seminars in Oncology**, v. 38, p. S2–S10, dez. 2011.

KESKIN, D. B. et al. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. **Nature**, v. 565, n. 7738, p. 234–239, 19 jan. 2019.

KHAN, I. S. et al. Enhancement of an anti-tumor immune response by transient blockade of central T cell tolerance. **J Exp Med**, v. 211, n. 5, p. 761–768, 2014.

KOEBEL, C. M. et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 903–907, 2007.

KUMAR, R. et al. Th1/Th2 cytokine imbalance in meningioma, anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme patients. **Oncology reports**, v. 15, n. 6, p. 1513–6, jun. 2006.

KUZNETSOVA, M. et al. Cytotoxic Activity and Memory T Cell Subset Distribution of in vitro-Stimulated CD8+ T Cells Specific for HER2/neu Epitopes. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1017, 9 maio 2019.

LEE, K. H. et al. Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. **J Immunol**, v. 163, n. 11, p. 6292–6300, 1999a.

LEE, P. P. et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. **Nat Med**, v. 5, n. 6, p. 677–685, 1999b.

LEGOUX, F. P.; MOON, J. J. Peptide:MHC tetramer-based enrichment of epitope-specific T cells. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 68, p. 1–7, 22 out. 2012.

LI, C. I. et al. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. **JAMA**, v. 289, n. 11, p. 1421–4, 19 mar. 2003.

LIANG, H. et al. Interleukin-17 Facilitates the Immune Suppressor Capacity of High-Grade Glioma-Derived CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) T Cells Via Releasing Transforming Growth Factor Beta. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 80, n. 2, p. 144–150, ago. 2014.

LIN, X.-L. et al. HER2-specific T lymphocytes kill both trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive breast cell lines in vitro. **Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, v. 24, n. 2, p. 143–50, jun. 2012.

LIU, Z. et al. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer.

Translational oncology, v. 11, n. 2, p. 311–329, abr. 2018.

LIUDAHL, S. M.; COUSSENS, L. M. To Help or To Harm: Dynamic Roles of CD4+ T Helper Cells in Solid Tumor Microenvironments. **Immunology**, p. 97–116, 1 jan. 2018.

LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 3, p. 776–781, 2003.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 jun. 2016.

LU, Y. C. et al. Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 13, p. 3401–3410, 2014.

LU, Z. et al. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 3, p. 541–50, 7 fev. 2000.

LURQUIN, C. et al. Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 249–57, 17 jan. 2005.

MAHER, J.; DAVIES, E. T. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. **Br J Cancer**, v. 91, n. 5, p. 817–821, 2004.

MAHNKE, Y. D. et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 11, p. 2797–2809, nov. 2013.

MALDONADO, R. A.; VON ANDRIAN, U. H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. **Adv Immunol**, v. 108, p. 111–165, 2010.

MANDAI, M. et al. Dual Faces of IFN in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 10, p. 2329–2334, 15 maio 2016.

MAZZOCCHI, A. et al. Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp) interacting with autologous tumor via the T-cell receptor: limiting dilution analysis of specific CTLp in peripheral blood and tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients. **International journal of cancer**, v. 58, n. 3, p. 330–9, 1 ago. 1994.

MEYAARD, L. et al. Changes in cytokine secretion patterns of CD4+ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. **Blood**, v. 84, n. 12, p. 4262–8, 15 dez. 1994.

MIGLIORATI, G. et al. Effect of dexamethasone on T-cell receptor/CD3 expression. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 167, n. 1–2, p. 135–44, fev. 1997.

MITTENDORF, E. A. et al. The E75 HER2/neu peptide vaccine. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 57, n. 10, p. 1511–1521, 7 out. 2008.

MONTES, M. et al. Optimum in vitro expansion of human antigen-specific CD8+ T cells for adoptive transfer therapy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 142, n. 2, p. 292–302, nov. 2005.

MOON, J. J. et al. Tracking epitope-specific T cells. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 565–581, 2 abr. 2009.

MORETTA, A. et al. Direct demonstration of the clonogenic potential of every human peripheral blood T cell. Clonal analysis of HLA-DR expression and cytolytic activity. **J Exp Med**, v. 157, n. 2, p. 743–754, 1983.

MURANSKI, P. et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 362–373, 2008.

NDUOM, E. K.; WELLER, M.; HEIMBERGER, A. B. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. suppl 7, p. vii9–vii14, 29 nov. 2015.

NIELSEN, M. B.; MARINCOLA, F. M. Melanoma vaccines: the paradox of T cell activation without clinical response. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 46 Suppl, p. S62-6, 2000.

NISHIMURA, T. et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. **J Exp Med**, v. 190, n. 5, p. 617–627, 1999.

OLSON, B. M. et al. Human Prostate Tumor Antigen-Specific CD8+ Regulatory T Cells Are Inhibited by CTLA-4 or IL-35 Blockade. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 12, p. 5590–5601, 15 dez. 2012.

PAOLILLO, M.; BOSELLI, C.; SCHINELLI, S. Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. **Brain sciences**, v. 8, n. 1, 16 jan. 2018.

PARAJULI, P.; MITTAL, S. Role of IL-17 in Glioma Progression. **Journal of spine & neurosurgery**, v. Suppl 1, 18 out. 2013.

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

PERRIN, S. L. et al. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 2, p. 625–638, 30 abr. 2019.

PETROVA, G.; FERRANTE, A.; GORSKI, J. Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system. **Critical reviews in immunology**, v. 32, n. 4, p. 349–72, 2012.

PINHO, M. P. et al. Frequency determination of breast tumor-reactive CD4 and CD8 T cells in humans: unveiling the antitumor immune response. **Oncolimmunology**, p. 1–10, 15 maio 2019.

PITTET, M. J. et al. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 5, p. 705–715, 1999.

POSCHKE, I. et al. Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 131, p. 1611–20, 2012.

QIAN, J. et al. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 290, 17 dez. 2018.

QIN, S.-Y.; ZHANG, A.-Q.; ZHANG, X.-Z. Recent Advances in Targeted Tumor Chemotherapy Based on Smart Nanomedicines. **Small**, v. 14, n. 45, p. 1802417, nov. 2018.

QIN, Z. et al. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. **Cancer Res**, v. 63, n. 14, p. 4095–4100, 2003.

RENTZSCH, C. et al. Evaluation of pre-existent immunity in patients with primary breast cancer: molecular and cellular assays to quantify antigen-specific T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 4376–86, 1 out. 2003.

REUSCHENBACH, M.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; WENTZENSEN, N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 58, n. 10, p. 1535–1544, 28 out. 2009.

RODRIGUES, C. P. et al. Tolerogenic IDO+ dendritic cells are induced by pd-1-expressing mast cells. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JAN, 2016.

ROSENBERG, S. A. et al. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 9, p. 6169–76, 1 nov. 2005.

ROTHOEFT, T. et al. Structure and duration of contact between dendritic cells and T cells are controlled by T cell activation state. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3105–3117, dez. 2006.

SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708–712, 14 out. 1999.

SELLINS, K. S.; COHEN, J. J. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 139, n. 10, p. 3199–206, 15 nov. 1987.

SHIMATO, S. et al. Profound tumor-specific Th2 bias in patients with malignant glioma. **BMC cancer**, v. 12, p. 561, 27 nov. 2012.

SIDAWAY, P. CNS cancer: Glioblastoma subtypes revisited. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 10, p. 587–587, 1 ago. 2017.

SLEZAK, S. L. et al. Analysis of Vaccine-Induced T Cells in Humans with Cancer. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 684, p. 178, 2010.

SMINIA, P.; WESTERMAN, B. A. Blood-brain barrier crossing and breakthroughs in glioblastoma therapy. **British journal of clinical pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 1018–20, jun. 2016.

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Adv Immunol**, v. 90, p. 1–50, 2006.

SOLIMAN, H.; KHALIL, F.; ANTONIA, S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88557, 2014.

SOTIROPOULOU, P. A. et al. Cytotoxic T-cell precursor frequencies to HER-2 (369 – 377) in patients with HER-2/neu-positive epithelial tumours. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 6, p. 1055–1061, 9 set. 2003.

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. Role of the Tumor Microenvironment

- in Breast Cancer. **Pathobiology**, v. 82, n. 3–4, p. 142–152, 31 ago. 2015.
- SPITZER, M. H. et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. **Cell**, v. 168, n. 3, p. 487–502.e15, 2017.
- SRIVATSAN, S. et al. Allogeneic tumor cell vaccines: the promise and limitations in clinical trials. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 1, p. 52–63, 2014.
- STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. **Pathol Biol (Paris)**, v. 51, n. 2, p. 59–60, 2003.
- STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Dendritic cells: features and functions. **Immunol Rev**, v. 53, p. 127–147, 1980.
- STRIOGA, M. M. et al. Therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines: the state of the art. **Crit Rev Immunol**, v. 33, n. 6, p. 489–547, 2013.
- STRONEN, E. et al. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. **Science**, v. 352, n. 6291, p. 1337–1341, 10 jun. 2016.
- THIBAUDIN, M. et al. Human ectonucleotidase-expressing CD25^{high} Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 1, p. e1055444, 2 jan. 2016.
- THORSSON, V. et al. The Immune Landscape of Cancer. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 812–830.e14, 17 abr. 2018.
- TING KOH, Y.; LUZ GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.; MARTIN KAST, W. Tumor Immune Escape Mechanisms. In: **Cancer Drug Resistance**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 577–602.
- TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, v. 302, n. 5909, p. 575–81, 14 abr. 1983.
- TSAI, S.-L. et al. A method to increase tetramer staining efficiency of CD8⁺ T cells with MHC–peptide complexes: therapeutic applications in monitoring cytotoxic T lymphocyte activity during hepatitis B and C treatment. **Journal of Immunological Methods**, v. 285, n. 1, p. 71–87, 1 fev. 2004.
- USS, E. et al. CD103 Is a Marker for Alloantigen-Induced Regulatory CD8⁺ T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 2775–2783, 1 set. 2006.
- WALLER, E. K. et al. A tale of two T cells: suppressor CD8 T cells recalled to life. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4203–4204, 1 jun. 2006.
- WANG, X.; LI, M. Correlate tumor mutation burden with immune signatures in human cancers. **BMC Immunology**, v. 20, n. 1, p. 4, 11 dez. 2019.
- WANG, Z.-Q. et al. CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 24, p. 6290–6297, 15 dez. 2016.
- WEDER, P. et al. Testing for HLA/peptide tetramer-binding to the T cell receptor complex on human T lymphocytes. **Results in Immunology**, v. 2, p. 88–96, 1 jan. 2012.
- WILKE, C. M. et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? **Carcinogenesis**, v. 32, n. 5, p. 643–649, maio 2011.

WITHERBY, S. et al. Advances in Medical Management of Early Stage and Advanced Breast Cancer: 2015. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 26, n. 1, p. 59–70, jan. 2016.

WOLL, M. M. et al. Direct Measurement of Peptide-Specific CD8+ T Cells Using HLA-A2:Ig Dimer for Monitoring the In Vivo Immune Response to a HER2/neu Vaccine in Breast and Prostate Cancer Patients. **Journal of Clinical Immunology**, v. 24, n. 4, p. 449–461, jul. 2004.

WONDERLICH, J. et al. Induction and Measurement of Cytotoxic T Lymphocyte Activity. In: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

WOOLDRIDGE, L. et al. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 147–164, 2009.

WORONIECKA, K. I. et al. T-cell Dysfunction in Glioblastoma: Applying a New Framework. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 16, p. 3792–3802, 15 ago. 2018.

XING, K. et al. Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: an insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy. **BMC immunology**, v. 16, p. 39, 26 jun. 2015.

XING, Y.; HOGQUIST, K. A. T-cell tolerance: central and peripheral. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 6, p. a006957–a006957, 1 jun. 2012.

XU, Z. et al. Molecular and Cellular Characterization of Human CD8 T Suppressor Cells. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 549, 30 nov. 2016.

YANG, L. et al. Expression of Th17 Cells in Breast Cancer Tissue and Its Association with Clinical Parameters. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, n. 1, p. 153–159, 13 jan. 2012.

YONG, R. L.; LONER, R. R. Surgery for Glioblastoma Multiforme: Striking a Balance. **World Neurosurgery**, v. 76, n. 6, p. 528–530, dez. 2011.

YOUNG, M. R. I. Th17 Cells in Protection from Tumor or Promotion of Tumor Progression. **Journal of clinical & cellular immunology**, v. 7, n. 3, 2016.

ZAKS, T. Z.; ROSENBERG, S. A. Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. **Cancer research**, v. 58, n. 21, p. 4902–8, 1 nov. 1998.

ZHANG, Q.; LAKKIS, F. G. Memory T Cell Migration. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 504, 2015.

ZHANG, S.; ZHANG, H.; ZHAO, J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 384, n. 4, p. 405–8, 10 jul. 2009.

ZHOU, G.; DRAKE, C. G.; LEVITSKY, H. I. Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 628–636, 15 jan. 2006.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 445–489, 2010.

ZHU, M. L.; NAGAVALLI, A.; SU, M. A. Aire deficiency promotes TRP-1-specific immune rejection of melanoma. **Cancer Res**, v. 73, n. 7, p. 2104–2116, 2013.

ZIELINSKI, C. E. et al. Dissecting the human immunologic memory for pathogens. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 40–51, 2011.