

NADIA EMELY CHAUCA TORRES

Células dendríticas na imunoterapia de glioblastoma: avaliação da resposta imune e da citotoxicidade de linfócitos T CD8+ isolados de pacientes contra esferóides tumorais autólogos

São Paulo

2019

NADIA EMELY CHAUCA TORRES

**CÉLULAS DENDRÍTICAS NA IMUNOTERAPIA DE
GLIOBLASTOMAS: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E DA
CITOTOXICIDADE DE LINFÓCITOS T CD8+ ISOLADOS DE
PACIENTES CONTRA ESFERÓIDES TUMORAIS
AUTÓLOGOS**

Versão Original

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

SÃO PAULO

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Chauca Torres, Nadia Emely
CÉLULAS DENDRÍTICAS NA IMUNOTERAPIA DE
GLIOBLASTOMAS: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E DA
CITOTOXICIDADE DE LINFÓCITOS T CD8+ ISOLADOS DE
PACIENTES CONTRA ESFERÓIDES TUMORAIS AUTÓLOGOS /
Nadia Emely Chauca Torres; orientador José
Alexandre Margazão Barbuto. -- São Paulo, 2019.
99 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Glioblastoma multiforme. 2. Imunoterapia. 3.
Células dendríticas. 4. Esferóides. 5. Microambiente
tumoral. I. Margazão Barbuto, José Alexandre,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nadia Emely Chauca Torres

Título da Dissertação: Células dendríticas na imunoterapia de glioblastoma: avaliação da resposta imune e da citotoxicidade de linfócitos TCD8+ isolados de pacientes contra esferóides tumorais autólogos.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

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

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 31 de agosto de 2016.

PARECER 1312/CEPSH


CAAE nº 58822116.7.0000.5467
Protocolo CEPSH-ICB nº 1349/16

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**CÉLULAS DENDRÍTICAS NA IMUNOTERAPIA DE GLIOBLASTOMAS**", do pesquisador Prof. Dr. **José Alexandre Marzagão Barbuto**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **31/08/2017**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,


Prof. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora-3 da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: CÉLULAS DENDRÍTICAS NA IMUNOTERAPIA DE GLIOBLASTOMAS.

Pesquisador: José Alexandre Marzagão Barbuto

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 58882116.7.1001.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.685.237

Apresentação do Projeto:

Projeto já apreciado e aprovado

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de emenda para inclusão de protocolo experimental com linhagem de células imortalizadas e uso de material residual de bolsa de sangue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alteração em razão da presente emenda

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda para inclusão de protocolo experimental com linhagem de células imortalizadas e uso de material residual de bolsa de sangue.

Foram anexadas as devidas cartas de autorização bem como TCLE dos doadores de sangue.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atende as necessidades dessa emenda.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Conclui-se por sua aprovação.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br

Continuação do Parecer: 2.685.237

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1147261_E3.pdf	29/05/2018 16:39:47		Aceito
Outros	AUTORIZACAO_HOC.pdf	29/05/2018 14:16:04	José Alexandre Marzagão Barbuto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TERMOS_DE_CONSENTIMENTO_DOADOR_CAMARALRS.pdf	29/05/2018 14:12:54	José Alexandre Marzagão Barbuto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2017_03_23_Projeto_Vacina_GBM_Hcor.pdf	23/03/2017 23:03:54	José Alexandre Marzagão Barbuto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Jacobsen.pdf	24/06/2016 08:56:28	José Alexandre Marzagão Barbuto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Lepski.pdf	24/06/2016 08:56:11	José Alexandre Marzagão Barbuto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	24/06/2016 08:47:19	José Alexandre Marzagão Barbuto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 30 de Maio de 2018

**Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)**

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415	CEP: 05.508-000
Bairro: Cidade Universitária	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733	E-mail: cep@icb.usp.br

A mis padres, mis hermanos, mi familia, que a pesar de estar a 5000km de distancia me apoyaron incondicionalmente a lo largo de este camino. A ellos les debo todo, por ellos, todo sacrificio pasa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser minha fonte de fortaleza nos momentos mais difíceis deste caminho.

Aos meus pais, José e Irma, e aos meus irmãos, Johann e Alan, por estar sempre presentes incluso na distância, por permitir-me cumprir meu sonho de seguir minha vocação e por ensinar-me que todo sacrifício vale a pena.

À Pankita, minha pequena companheira, por acompanhar-me naquelas longas noites, por estar comigo naqueles tempos dolorosos, e por ser minha luz quando pensava que a obscuridade da soledade se aproximava.

À meu namorado Pault, por seu apoio incondicional nesta aventura que começamos há quase 3 anos.

Ao Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, pela orientação, confiança e carinho. Por acreditar em mim para desenvolver este projeto. Pelos bons conselhos, paciência e o tempo dedicado.

A Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar por a gentil doação a linhagem U87MG, base do presente trabalho.

À equipe GBMES: Gabi, Beth Mariana e Sarah, pela amizade incondicional, pelo apoio brindado, pelas risadas em momentos de estresse, por abrirem as portas de seus corações e pelos abraços intermináveis

Aos membros do Laboratório de Imunologia de Tumores, Patricia, Thiago, Célia, Renata, Bárbara, Tiago e Danieli, pela ajuda e conselhos brindados

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES,) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, #409825/20016-6).

Obrigada!

If you want to go fast, go alone. If you want to go far, go together

(Provérbio africano)

RESUMO

TORRES, N. C. **Células dendríticas na imunoterapia de glioblastoma: Avaliação da resposta imune e da citotoxicidade de linfócitos T CD8+ isolados de pacientes contra esferóides tumorais autólogos.** 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral mais agressivo e maligno e se caracteriza pelo complexo microambiente tumoral (TME) constituído por componentes celulares e não celulares que interagem para sabotar a resposta do sistema imune. Nos últimos anos, a imunoterapia ativa tem surgido como a alternativa para a restauração de tal resposta. Ultimamente, o desenvolvimento de modelos *in vitro* como os esferóides, tornaram-se numa plataforma interessante para estudar as complexas interações entre o TME e o sistema imune, ajudando assim na otimização de abordagens terapêuticas. Portanto, no presente trabalho, foi avaliado a resposta imune de pacientes submetidos a imunoterapia de células dendríticas e o desenvolvimento do modelo tridimensional *in vitro* de GBM para o estudo da resposta imune contra o tumor, com ênfase no papel das células dendríticas. Assim, três tipos de esferóides tumorais: homotípicos, heterotípicos e derivados de paciente foram elaborados no intuito de recriar o TME e avaliar o efeito deste sobre as mo-DCs de doadores saudáveis, observando-se que mo-DCs expostas ao TME adotam um fenótipo de pseudomaduração que se reflete na ineficácia para estimular a linfoproliferação de linfócitos alogênicos. Em paralelo, foi feita a caracterização do infiltrado leucocitário, observando-se que no GBM há predominância de populações mielóides. Por outro lado, as mo-DCs de pacientes após serem operados e vacinados, mostraram um fenotipo maduro o qual se correlaciona com sua capacidade para estimular a proliferação de linfócitos alogênicos e com uma boa resposta à imunoterapia, sendo que um dos pacientes houve a regressão total do tumor. Finalmente, linfócitos co-cultivados com mo-DCs expostas ao TME, foram testados para avaliar seu potencial “citotóxico” contra os esferóides, observando-se a destruição do esferóide após 24h. Em conclusão o presente trabalho mostra a eficácia da imunoterapia com células dendríticas alogênicas e a riqueza potencial dos esferóides como uma plataforma para o entendimento do TME e sua relação com o sistema imune.

Palavras-chave: Glioblastoma multiforme (GBM), imunoterapia, microambiente tumoral, esferóides tumorais, células dendríticas.

ABSTRACT

TORRES, N. C. **Dendritic cell-based immunotherapy against glioblastoma: Evaluation of the immune response and cytotoxicity of CD8 + T lymphocytes isolated from patients against autologous tumor spheroids.** 2019. 99 p. Master thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, 2019.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and malignant brain tumor and is characterized by the complexity of their tumor microenvironment (TME) consisting of cellular and non-cellular components that interact in order to hijack the immune response. In recent years, active immunotherapy has emerged as the alternative to the restoration of such response. Moreover, the development in the last years of *in vitro* models such as tumor spheroids has become in an interesting platform to study the complex interactions between TME and the immune system, thus helping to optimize therapeutic approaches. Therefore, in the present study, we evaluated the immune response of patients undergoing dendritic cell immunotherapy and the development of an *in vitro* GBM three-dimensional model for the study of the tumor immune response, focusing on the role of dendritic cells. Thus, three types of tumor spheroids: homotypic, heterotypic and patient-derived were designed to recreate TME and to evaluate the effect of this on the mo-DCs of healthy donors, observing that mo-DCs exposed to TME adopt a phenotype of “pseudo maturity” that is reflected in the inefficacy to stimulate lymphoproliferation of allogeneic lymphocytes. In parallel, the characterization of the leukocyte infiltrate was made, observing that in GBM there is a predominance of myeloid populations. On the other hand, mo-DCs from patients, after tumor resection and two rounds of vaccination, showed a mature phenotype which correlates with their ability to stimulate allogeneic lymphocyte proliferation and a good response to immunotherapy, with one of the patients showing total tumor regression. Finally, lymphocytes co-cultured with mo-DCs exposed to TME were tested to evaluate their “cytotoxic” potential against spheroids, observing after 24h a destruction of the spheroid. In conclusion, the present work shows the efficacy of immunotherapy with allogeneic dendritic cells and the potential richness of spheroids as a platform for the understanding of TME and its relationship with the immune system.

Keywords: Glioblastoma multiforme (GBM), immunotherapy, tumor microenvironment, tumor spheroids, dendritic cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em homens e mulheres, exceto pele não-melanoma.....	21
Figura 2 - Esquema dos processos envolvidos na morte imunogênica.	22
Figura 3 - Esquema de tratamento das DCs.....	40
Figura 4 - Estratégia de análise das mo-DCs por citometria de fluxo.	42
Figura 5 - Estratégia de análise de proliferação por citometria de fluxo.....	44
Figura 6 - Estratégia de análise do potencial citotóxico por citometria de fluxo.	45
Figura 7 - Esferóides homotípicos.....	47
Figura 8 - Esferóides heterotípicos.....	48
Figura 9 - Esferóides tumorais derivados de pacientes.	49
Figura 10 - Explante de células derivadas de pacientes.....	49
Figura 11 - Esferóides tumorais derivados de pacientes com GBM.....	50
Figura 12 - Níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 nos sobrenadantes dos esferóides.....	52
Figura 13 - Porcentagem de células CD45+ em amostras de pacientes com GBM.....	53
Figura 14 - Infiltrado tumoral em amostras de pacientes com GBM.....	53
Figura 15 - Morfologia das mo-DCs de doadores sadios.	54
Figura 16 - mo-DCs tratadas com meio condicionado tumoral.....	55
Figura 17 - mo-DCs de pacientes.....	55
Figura 18 - Avaliação fenotípica das mo-DCs de pacientes, doadores sadios e tratadas.....	56
Figura 19 - Expressão do R-MFI das moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1 das mo-DCs de controles sadios e pacientes.....	58
Figura 20 - Expressão do R-MFI das moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1 das mo-DCs dos pacientes GBM2 e GBM4.....	59

Figura 21 - Expressão do R-MFI de CD80 nas mo-DCs tratadas com meio condicionado.....	60
Figura 22 - Expressão do R-MFI de CD83 nas mo-DCs tratadas com meio condicionado.....	61
Figura 23 - Expressão do R-MFI de CD86 nas mo-DCs tratadas com meio condicionado.....	62
Figura 24 - Expressão do R-MFI de PD-L1 nas mo-DCs tratadas com meio condicionado.....	63
Figura 25 - Expressão do R-MFI de CD80 nas mo-DCs cultivadas em contacto com os esferóides.....	64
Figura 26 - Expressão do R-MFI de CD83 nas mo-DCs nas mo-DCs cultivadas em contacto com os esferóides.....	65
Figura 27 - Expressão do R-MFI de CD86 nas mo-DCs cultivadas em contacto com os esferóides.....	66
Figura 28 - Expressão do R-MFI de PD-L1 nas mo-DCs cultivadas em contacto com os esferóides.....	67
Figura 29 - Expressão do R-MFI das moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1 das mo-DCs tratadas com sobrenadante de esferóides tumorais derivados de pacientes...	68
Figura 30 - Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs de pacientes.....	69
Figura 31 - Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs de pacientes.....	70
Figura 32 - Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs tratadas com sobrenadante de esferóides.....	71
Figura 33 - Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs co-cultivadas com esferóides... ..	72
Figura 34 - Avaliação do potencial citotóxico de linfócitos.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pacientes incluídos no estudo.....	35
Tabela 2 - Anticorpos monoclonais usados para avaliar o infiltrado tumoral.....	38
Tabela 3 - Anticorpos monoclonais usados para avaliar o fenótipo das mo- DCs.....	41
Tabela 4 - Anticorpos monoclonais usados para avaliar linfoproliferação.....	43
Tabela 5 - Anticorpos monoclonais usados para avaliar o potencial citotóxico...	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg Micrograma

µL Microlitro

µM Micromolar

2D Bidimensional

3D Tridimensional

ATP Trifosfato de adenosina

BBB Barrera hematoencefálica

CBA Cytometric Bead Array

CCL Quimiocina

CD Cluster de diferenciação

CFSE Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CNAS Células não aderentes

CTLA-4 Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

CTLs Linfócitos T citotóxicos

CXCR Receptor de quimiocinas

DCs Células dendríticas

ECM Matriz extracelular

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

FSC Forward scatter

g Aceleração de gravidade(9,8m/s²)

GBM Glioblastoma multiforme

h Hora

HA Ácido hialurônico

HUVEC Linhagem de células endoteliais de cordão umbilical

IDH Isocitrato deshidrogenase

IL Interleucina

LPS Liposolisacarido

mg Miligrama

MHC Major Histocompatibility Complex

mL Mililitro

mM Milimolar

MMP Metaloproteinase

mo-DC Células dendrítica derivada de monócito

MRC5 Linhagem de fibroblastos de pulmão

°C Graus Celsius

OMS Organização Mundial da Saúde

PBMC Células mononucleares de sangue periférico

PBS Tampão fosfato-salino

PCA *Principal Components Analysis*

PD-1 Receptor de morte programada I

PD-L1 Ligando do receptor de morte programa I

pH Potencial hidrogeniônico

PHA Fitohemaglutinina

RPMI-1640 *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*

SNC Sistema nervoso central

SSC Side scatter

TCRs Receptores de células T

TGFβ Fator de crescimento transformador beta

TH1 Resposta imunogênica T *helper* 1

TLR4 Receptores do tipo *Toll-like* 4

TME Tumor microenvironment

TNFα Fator de necrosis tumoral alfa

U87MG Linhagem de glioblastoma multiforme

VEGF Fator de crescimento endotélio-vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	Glioblastoma multiforme	21
2.2	O microambiente tumoral de glioblastoma	23
2.2.1	Matriz extracelular tumoral.....	23
2.2.2	Metabolismo intratumoral.....	24
2.2.3	Infiltrado leucocitário e endotelial	24
2.3	Novas estratégias terapêuticas contra glioblastoma: Imunoterapia	26
2.3.1	Imunoterapia com células dendríticas	27
2.3.1.1	Células dendríticas	27
2.3.1.2	Modelos <i>in vitro</i> de GBM para avaliar o efeito da imunoterapia	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivos específicos	34
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	Casuística	35
4.2	Geração do modelo <i>in vitro</i> tridimensional de glioblastoma.....	36
4.2.1	Linhagens celulares	36
4.2.2	Amostra tumoral.....	36
4.2.3	Esferóides	36
4.2.4	Dossagem de mediadores solúveis nos esferóides.....	37
4.3	Avaliação do infiltrado leucocitário nas amostras de pacientes	37
4.4	Avaliação do efeito do TME sobre as mo-DCs.....	38
4.4.1	Amostras de sangue periférico.....	38
4.4.2	Isolamento de monócitos e diferenciação em DCs.....	39
4.4.3	Avaliação do fenótipo das mo-DCs por citometria de fluxo	40
4.4.4	Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs.	42
4.5	Avaliação do potencial citotóxico dos linfócitos T obtidos a partir da estimulação <i>in vitro</i> com DCs expostas aos esferóides tumorais <i>in vitro</i>	44
4.6	Análise estatístico	46
5	RESULTADOS	47
5.1	Células de linhagem e de pacientes formam esferóides	47
5.1.1	Esferóides homotípicos.....	48

5.1.2	Esferóides heterotípicos.....	48
5.1.3	Esferóides tumorais derivados de pacientes	48
5.2	Os 3 tipos de modelos de esferóides apresentam níveis de produção de interleucinas distintos.....	51
5.3	O microambiente de GBM é abundante em células mieloides	52
5.4	As mo-DCs expostas a diferentes microambientes podem sofrer alterações no fenótipo	54
5.4.1	mo-DCs de doadores saudáveis.....	54
5.4.2	mo-DCs tratadas com o microambiente tumoral	55
5.4.3	mo-DCs de paciente	55
5.4.4	Avaliação de mo-DCs de pacientes	56
5.4.5	Efeito paracrino do microambiente tumoral sobre as mo-DCs	59
5.4.6	Efeito justacrino do microambiente tumoral sobre as mo-DCs	63
5.4.7	Efeito paracrino do microambiente tumoral gerado a partir de esferóides derivados de pacientes sobre as mo-DCs.....	67
5.5	A capacidade linfoestimuladora das mo-DC é afetada pela exposição a diferentes ambientes	69
5.6	Linfócitos CD3+ allogenêicos apresentam baixo potencial citotóxico após encontro com mo-DCs expostas a esferóides	72
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS*	82
	ANEXO	94

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos numerosos esforços têm sido feitos para desenvolver novos tratamentos contra o glioblastoma multiforme, não obstante ainda estamos longe de atingir melhoras significativas nesta área. O microambiente tumoral é, talvez, uma das principais “pedras” no caminho para o desenvolvimento de novas terapias, uma vez que é nele que se espera que os tratamentos sejam eficazes, mas ele é moldado de forma a facilitar o crescimento do tumor. Com isto, além do próprio tumor, seu microambiente, com todos os componentes celulares não-neoplásicos e moleculares, torna-se também um alvo relevante quando se busca aprimorar o tratamento do câncer. Ora, reconhecer o estado homeostático de um determinado microambiente e modifica-lo é uma das funções do sistema imune e, portanto, não é surpreendente que a imunoterapia venha surgindo como uma nova perspectiva para o tratamento do câncer, de maneira geral, e venha sendo estudada também no contexto do glioblastoma.

Dentre as diversas estratégias abordadas pela imunoterapia, algumas visam ativar o próprio sistema imune dos pacientes, especificamente, aqueles componentes que no contexto tumoral possam se encontrar inoperantes ou deficientes. Tais estratégias, classificadas como de “imunoterapia ativa”, porém, se confrontam com o estado “imunossupressor” muitas vezes presente no paciente, limitando seu sucesso. É necessário, assim, que se desenvolvam estratégias capazes de superar ou contornar tal estado “imunossupressor”, cuja avaliação definitiva só pode ser feita em testes de eficácia clínica. Todavia, testes clínicos são muito complexos e incluem variáveis dificilmente controláveis e, portanto, raramente se prestam a uma avaliação como a que se faz aqui necessária. Atualmente existem diversas plataformas para tal avaliação, como o uso de modelos animais ou testes *in vitro* com linhagens celulares, mas, obviamente, nenhuma delas recria perfeitamente o ambiente tumoral no paciente, daí a importância de construir e avaliar novas plataformas de análise, como a que se procurou desenvolver neste trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Glioblastoma Multiforme

Os gliomas são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (SNC) (LOUIS *et al.*, 2016). No Brasil, os tumores do SNC ocupam o 8º lugar em termos de frequência (INCA, 2017) (**Figura 1**) e são estimados entre 5500-5800 casos para o biênio 2018-2019.

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em homens e mulheres, exceto pele não-melanoma. Espera-se para o biênio 2018-2019 cerca de 5 500 a 5800 novos casos de glioblastoma multiforme em mulheres e homens respectivamente.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA-2017

Os gliomas são classificados em não-difusos, os quais são circunscritos a uma determinada área, e difusos, que apresentam infiltração do parênquima do SNC circundante. Os gliomas difusos podem ser classificados segundo o grau de malignidade como grau I ou astrocitoma pilocítico, grau II ou astrocitoma, grau III ou oligodendroglioma e grau IV ou glioblastoma multiforme (GBM). O GBM é o tumor mais frequente e maligno do SNC e corresponde a aproximadamente 50% de todos os gliomas (**Figura 2**), conferindo uma sobrevida mediana de 12-18 meses para os pacientes, após o diagnóstico.

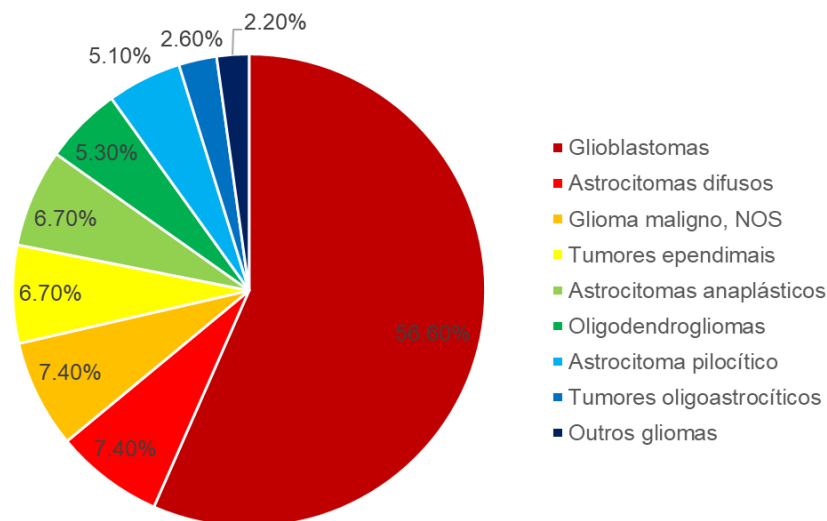
Atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o GBM segundo a presença ou ausência de mutações no gene de isocitrato desidrogenase (IDH) como: GBM primário (correspondendo a 90% dos casos), que apresenta o IDH selvagem, seria originado a partir de mutações nas células gliais e mais frequente em pessoas acima dos 55 anos; ou GBM secundário (correspondendo a 10% dos casos), onde se

encontram mutações no gene IDH, surgiria da progressão de astrocitomas de baixo grau e mais frequente em jovens (LOUIS *et al.*, 2016).

Na verdade, o GBM apresenta grande heterogeneidade em sua apresentação clínica, patológica e genética; caracteristicamente tem, ainda, alto grau de vascularização e de invasão de tecidos saudáveis circunjacentes, e por sua vez, o próprio tumor sofre um intenso infiltrado celular (segundo o revisado por IACON E DINCA, 2009). Com isto, estabelece-se um microambiente tumoral complexo e que ainda é pouco conhecido. Em conjunto, estes *hallmarks* contribuem para limitar a eficácia dos tratamentos disponíveis (cirurgia, quimio- e radioterapia), mas por outro lado, oferecem possíveis alvos a serem abordados por novos tratamentos (URBÁNSKA *et al.* 2014, PERRIN *et al.*, 2019).

Figura 2. Frequência do glioblastoma multiforme dentro os tumores cerebrais primários.

Observa-se a predominante frequência de GBM em relação aos outros tipos de tumores cerebrais do sistema nervoso central.



Fonte: CBTRUS, 2018

2.2. O microambiente tumoral do glioblastoma

O microambiente do GBM, como o da maioria dos tumores, não está apenas constituído por células neoplásicas, astrócitos malignos no GBM, altamente proliferativas, mas também por células imunes residentes e infiltrantes, células do estroma, células endoteliais, pericitos que formam nichos separados dentro do tumor (HAMBARDZUMYAN E BERGERS, 2015, PERRIN *et al.*, 2019). Todas essas células são capazes de interagir no contexto da matriz extracelular (ECM), onde fluidos e macromoléculas são os componentes não celulares que, em conjunto com as células, constituem diferentes “nichos”, regidos por “microclimas” diversos. Desta forma, a melhor abordagem do ponto de vista histopatológico, seria considerar a neoplasia como um verdadeiro “órgão” e não como um tecido, o que, embora torne mais complexo seu estudo, poderia contribuir para uma compreensão mais clara da biologia do tumor e de sua resposta às diferentes abordagens terapêuticas.

2.2.1. *Matriz extracelular tumoral*

No cérebro normal, a matriz extracelular (ECM) corresponde a 20% do volume e tem a função de, além de constituir uma “armação” física, ser fonte de sinais bioquímicos... (OKSDATH *et al.*, 2018). A ECM do tumor, como a do tecido normal, é dinâmica, varia segundo a idade e em resposta a mudanças nos sinais bioquímicos, físicos e mecânicos a que o tecido é exposto. Não surpreendentemente, no GBM, a interação entre as células neoplásicas e a ECM parece desempenhar um papel importante, modificando sua progressão e agressividade. Assim, o aumento da expressão de CD44, receptor do ácido hialurônico (HA) e o incremento dos níveis de moléculas como as metaloproteinase 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9 respectivamente) na ECM que circunda o tumor, tem um efeito direto sobre seu remodelamento, facilitando a invasão e infiltração do tumor e afetando o prognóstico dos pacientes (PARK, KWAK E LEE, 2008; ITANO, ZHUO E KIMATA, 2008; KIM E KUMAR, 2014; VIRGA *et al.*, 2019).

2.2.2. *Metabolismo intratumoral*

De modo geral, células tumorais usam a glicólise em vez da fosforilação oxidativa para gerar energia, fenômeno conhecido como efeito de Warburg (WARBURG, 1956), mesmo

sendo a produção de ATP menor por essa via. As células do GBM, produzem ATP em grande quantidade mediante a via glicolítica, o qual se relaciona com os altos níveis de ácido láctico. Assim, embora a via glicolítica não seja uma boa opção em termos de ganho de energia, as células do GBM podem obter o combustível extra do transporte de lactato entre astrócitos e neurônios. Assim, o lactato gerado pelos astrócitos é oxidado pelos neurônios que, assim, obtêm mais energia (HERZ,2004). Por outro lado, este aumento de ácido láctico no microambiente leva a um pH mais ácido tornando o ambiente mais hostil para os leucócitos infiltrantes, porém, benéfico para as células tumorais, pois as torna mais resistentes à quimioterapia, as reprograma metabolicamente e, possivelmente, induz o aparecimento de células-tronco tumorais (GARNIER *et al.*, 2019), as quais perpetuam a presença de células tumorais no cérebro, devido a sua alta capacidade proliferativa e potencial migratório.

2.2.3. *Infiltrado leucocitário e endotelial*

Assim como outros tipos de tumores, o GBM é constituído por vários tipos celulares além das células neoplásicas, em particular por células endoteliais e imunes, que, à sua vez, secretam moléculas inflamatórias em resposta aos sinais das células neoplásicas circundantes. E, de fato, o GBM se caracteriza pelo alto grau de vascularização, extensa neoangiogênese, vasculatura anormal e elevada presença de fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) (WESSELING *et al.*, 1997), produzido pelas células endoteliais. Contribuem para as anormalidades vasculares, os elevados níveis de VEGF, o qual, também se acredita responsável pela perturbação da barreira hematoencefálica (BBB) que existe na doença. Estas anormalidades acabam por produzir edema cerebral, aumento da pressão intersticial e inflamação (SILBERGELD, ROSTOMILY E ALVORD, 1991). Da mesma forma, a entrega de oxigênio às células está comprometida, gerando um ambiente hipóxico e, em consequência, necrose local de tecidos (MONTEIRO *et al.*, 2017). Neste contexto, como resultado dessas perturbações e da produção de citocinas e quimiocinas no microambiente do tumor – muitas vezes pelas próprias células neoplásicas, células imunes circulantes entram no cérebro (WESSELING *et al.*, 1997).

É interessante notar que uma grande parte do volume tumoral no GBM, até 30-40% da massa total, pode ser composta por células do sistema imune, especialmente monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos, linfócitos T e células supressoras derivadas de precursores mieloides (MDSC) (KOHANBASH E OKADA, 2012; LIANG *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2015). Vale notar o quanto esta constatação é contrária ao que se pensava do cérebro, como um órgão imunoprivilegiado, isolado imunologicamente do restante do organismo. Não obstante, a presença de grande quantidade de células imunes infiltrantes no GBM não reflete uma real capacidade imuno-efetora contra o tumor, que se desenvolve aparentemente sem sofrer controle imune (RAZAVI *et al.*, 2016).

Em parte, a ineficácia das células imunes infiltrantes do tumor pode ser atribuída às condições do TME, que leva as células a adotar um fenótipo imunossupressor ou a sofrerem apoptose (DIDENKO *et al.*, 2002). Há dados que sugerem ser fatores presentes no TME, que direcionam a resposta para o padrão Th2, os responsáveis pela falha da resposta no controle do tumor (KUMAR *et al.*, 2006). Entre estes fatores, citocinas como a interleucina (IL)-10, tem, de fato, mostrado-se capazes de aumentar o crescimento tumoral (HUETTNER *et al.*, 1997), inibir a produção de IFN- γ e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), diminuir a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II) em monócitos e, induzir anergia nos linfócitos T infiltrantes (STRLE *et al.*, 2001). Por outro lado, a IL-6, também presente no TME, induz a expressão do ligando de morte celular programada PD-L1 em células mieloides infiltrantes contribuindo para imunossupressão local, e para a evasão e proliferação tumoral (SHAN *et al.*, 2015; LAMANO *et al.*, 2017). Ainda outras citocinas e mediadores, como interleucina IL-1, o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e a prostaglandina E2 (PGE2), também presentes no microambiente do GBM são capazes de induzir imunossupressão mediante a inibição da maturação das DCs, de linfócitos T citotóxicos (CTLs) e células natural killer (NK)(HAO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2010; RAZAVI *et al.*, 2016). Ainda, no TME, a expressão de PD-L1 pelas células do glioma induzindo anergia nos linfócitos T efetores, e a expressão do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) pelas Tregs contribuem para o escape do tumor ao controle do sistema imune (RAZAVI *et al.*, 2016). Vale notar que, dos linfócitos

infiltrantes no GBM, até 25% são Tregs, os quais produzindo IL-17 e TGF- β , inibem a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8+ (LIANG *et al.*, 2014); não surpreendentemente, a abundância de Tregs no TME tem sido associada ao mau prognóstico no GBM (HEIMBERGER *et al.*, 2008).

Ao contrário de outros tumores sólidos, os fibroblastos não são um componente frequente do microambiente do GBM, mas, estudos recentes têm identificado células parecidas aos fibroblastos, como as “células estromais associadas a glioblastoma”. Estas são encontradas principalmente na periferia do tumor e, acredita-se, ajudam o crescimento e migração tumoral secretando IL-6, TGF- β e CXCL12, moléculas conhecidas por tais atividades (CLAVREUL *et al.*, 2012, TRYLCOVA *et al.*, 2015).

Esta breve apresentação do TME no GBM já é suficiente para mostrar como esta neoplasia representa um obstáculo para abordagens biológicas de tratamento, uma vez que estas terão que enfrentar um microambiente selecionado para favorecer o crescimento tumoral.

2.3. Novas estratégias terapêuticas contra glioblastoma: Imunoterapia

Como anteriormente exposto, existem vários desafios a enfrentar diante do microambiente tumoral no GBM. Somem-se a isso os inconvenientes relacionados à localização da doença (KESARI, 2011), que, muitas vezes, é complicada pela intensa infiltração de células tumorais em tecidos adjacentes, impedindo a ressecção completa do tumor (YONG E LONSER, 2011) e a presença da barreira hematoencefálica que, embora lesada pela doença, ainda pode representar uma limitação para entrada de determinados agentes quimioterápicos (SMINIA E WESTERMAN, 2016). Tudo isso resultando em um prognóstico que, apesar dos avanços nos últimos anos em abordagens cirúrgicas, radioterapia e quimioterapia, não melhorou de maneira significativa, mantendo-se a taxa de sobrevida mediana entre 14 e 20 meses (DAVIS, 2016).

Neste contexto, abordagens diferentes se tornam prementes e, entre elas se situa a imunoterapia. Esta representa uma alternativa terapêutica atraente devido a seus efeitos

potencialmente mais seletivos e duradouros e pela possibilidade de indução de resposta imune do próprio paciente contra o tumor.

A imunoterapia ativa contra tumores visa recrutar o próprio sistema imunológico para combater um tumor existente. Esta abordagem é muitas vezes chamada de "vacinação", no entanto, o desafio de induzir a imunidade *de novo* contra um antígeno presente no organismo e por ele "tolerado", não é tão simples. Ao contrário da vacinação profilática contra agentes infecciosos, em pacientes com neoplasias, o sistema imunológico já se adaptou à presença da mesma e, portanto, se mostra incapaz de controlar o tumor. Na verdade, a presença de um tumor no organismo tem algumas semelhanças com uma infecção massiva: há grande número de células que crescem sem restrições em muitas partes do corpo. No entanto, talvez até mesmo para evitar o quadro típico das infecções generalizadas, o sistema imune não reage para eliminar o tumor e, no momento do diagnóstico, o sistema imunológico do paciente encontra-se num estado, muitas vezes, de exaustão, ignorância ou tolerância diante dos antígenos tumorais, observando-se uma deficiência funcional dos linfócitos T efetores para desencadear uma resposta (WICK *et al.*, 1997, OCHSENBEIN *et al.*, 1999, LEE *et al.*, 1999; AMEZQUITA E KAECH, 2017). Portanto, para uma imunoterapia bem-sucedida é imperativo obter uma apresentação forte e eficiente, capaz de romper este estado de tolerância e ativar aqueles linfócitos efetores. Nesse contexto, uma das estratégias abordada pela imunoterapia ativa é o uso das células responsáveis pela apresentação antigênica, as células dendríticas.

2.3.1. Imunoterapia com células dendríticas

2.3.1.1. Células dendríticas

As células dendríticas são as células apresentadoras de antígenos mais potentes para ativar os linfócitos T (STEINMAN E WITMER, 1978; BANCHEREAU *et al.*, 2000). As DCs encontram-se na maioria dos tecidos num estado imaturo, monitorando constantemente o meio ambiente capturando e processando os antígenos ali presentes. As DCs imaturas possuem uma alta capacidade endocítica e fagocítica, não obstante expressam níveis baixos de moléculas de superfície do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, assim como baixos níveis de expressão de moléculas co-estimuladoras (incluindo CD80, CD86 e CD40) (SALLUSTO *et al.*, 1995). Para desencadear uma

resposta dos linfócitos T efetores é necessário a ativação/maturação das DCs. Considera-se normalmente que a ativação de DCs resulta da detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), ou da detecção de citocinas pro-inflamatórias (MELLMAN E STEINMAN, 2001). Dentro dos tumores, muitos desses mesmos receptores reconhecem padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) endógenos, constitutivamente expressos, que são liberados ou expressos na superfície das células mortas/danificadas (ZELENAY E REIS E SOUSA, 2013). As DCs maduras apresentam uma menor capacidade de fagocitose e uma maior expressão de moléculas de MHC e moléculas co-estimuladoras (GUERMONPREZ *et al.*, 2002; BENVENUTI *et al.*, 2004). Além disso, as DCs maduras reprogramam a resposta dos receptores de quimioquinas (CCL) pro-inflamatórias por uma resposta a quimioquinas homeostáticas como CCL-19 e CCL-21, conseqüentemente as DCs maduras migram aos linfonodos através dos vasos linfáticos aferentes, onde induzem a ativação dos linfócitos T antígeno-específicos (SALLUSTO *et al.*, 1998; MARSLAND *et al.*, 2005).

As DCs apresentam os peptídeos derivados de antígenos exógenos preferencialmente em moléculas de MHC de classe II aos linfócitos T CD4+. No entanto, as DCs, também podem apresentar antígenos internalizados em moléculas de MHC de classe I aos linfócitos T CD8+ através de um processo chamado de apresentação cruzada (JUNG *et al.*, 2002; JOFFRE *et al.*, 2012), permitindo desencadear respostas contra antígenos intracelulares de outros tipos celulares, fenômeno essencial para a indução de respostas imunes contra células tumorais e alguns vírus (van MIERLO *et al.*, 2004; MCDONELL *et al.*, 2010). Porém, as DCs são conhecidas também por ter um papel importante na indução da tolerância a antígenos próprios (LEWIS E REIZIS, 2012), os quais também são apresentados no contexto da apresentação cruzada e na ausência de moléculas co-estimuladoras, mecanismo que pode ser aproveitado pelas células tumorais como uma janela de escape ao controle imunitário (SOTOMAYOR *et al.*, 2001; DHODAPKAR *et al.*, 2008; MCDONELL *et al.*, 2010); a maioria dos antígenos apresentados pelas células tumorais são antígenos próprios aos quais os linfócitos T provavelmente já se tinham tornado tolerantes (MAPARA E SYKES, 2004).

Assim, as DCs seriam essenciais para a geração de uma resposta imune contra o tumor, mas estão, muitas vezes, comprometidas nos pacientes com câncer. No ambiente gerado pelas células tumorais existe uma supressão que impede o desenvolvimento normal do processo de maturação das DCs. Vários estudos, em diferentes tipos de câncer, mostram que as DCs de pacientes ou DCs tratadas *in vitro* com o tumor, tem uma atividade baixa ou nula para estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos ou singênicos por causa de inúmeras deficiências, tais como nos processos de fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, baixa taxa de migração, potencial endocítico suprimido e uma diminuição na atividade de IL-12 (KATSENELSON *et al.*, 2001, ONISHI *et al.*, 2002, SHURIN *et al.*, 2001; AALAMIAN *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 2001; LAKOMY *et al.*, 2006;. RATTA *et al.*, 2002; SHATTAPORN *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2013). Assim, o microambiente tumoral induz a perda de funções efetoras das DCs, bem como a polarização e aquisição de um fenótipo imunossupressor e tolerogênico.

Também as DCs diferenciadas *in vitro*, a partir dos monócitos circulantes e na presença de fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4) (SALLUSTO E LANZAVECCHIA, 1994), apresentam alterações funcionais, uma vez que os monócitos dos pacientes com câncer são também expostos a um ambiente imunossupressor, tornando-se funcionalmente deficientes (RAMOS *et al.*, 2012, RICHARDS *et al.*, 2013). As DCs derivadas de monócitos (Mo-DCs) de pacientes com neoplasias tem a capacidade funcional comprometida e nesse contexto podem estimular a proliferação de linfócitos T reguladores (Tregs), os quais podem suprimir a resposta de outras células imunes (RAMOS *et al.*, 2012) sendo assim uma janela a mais para o escape tumoral. Outro estudo de nosso grupo num paciente com carcinoma de células renais cromóforo, mostrou recuperação funcional das Mo-DCs após a ressecção do tumor: observou-se diminuição na expressão de PD-L1 enquanto que a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T, a expressão de IL-2R α e a produção de IFN- γ aumentaram (CLAVIJO-SALOMON *et al.*, 2015), mais uma vez evidenciando como a presença do tumor afeta a funcionalidade das DCs. Portanto, as DCs autólogas ou diferenciadas de monócitos autólogos podem estar alteradas sendo uma grande

desvantagem para abordagens de imunoterapia que usam DCs autólogas (BROWN *et al.*, 2001; BARBUTO, 2013).

Entre as alternativas propostas para resolver esse problema está a utilização de DCs obtidas a partir de doadores sadios, fusionadas com células de tumor. Isto permite preservar os antígenos de superfície de ambos tipos de células e por sua vez permite que as DCs apresentem, eficazmente, os antígenos tumorais (GONG *et al.*, 1997; CATHELIN *et al.*, 2001). Esta estratégia também elimina a necessidade de paridade no MHC entre as células do receptor e do doador das DCs. Outra vantagem deste método é o efeito alogênico (OSBORNE E KATZ, 1973) que melhora a resposta antitumoral, induzindo a expressão de citocinas por populações de linfócitos T CD4+ alorreactivas (FABRE, 2001; AVIGAN *et al.*, 2007; SYMONS *et al.*, 2008).

Estudos feitos em nosso laboratório com DCs fusionadas com a linhagem celular de carcinoma mamario MDA MB-23 e comparados com uma mistura simples de DCs e células da linhagem, mostram, após a hibridização das DCs com a linhagem, uma população dupla positiva para CD11c e Her2/neu (antígeno expresso só pelas células tumorais) que expressa, também, níveis maiores de moléculas co-estimuladoras como CD40 e CD86 em comparação com a mistura simples de células. Assim também, mediante o uso de células tumorais que expressam constitutivamente um antígeno de citomegalovirus (CMV) mostrou-se indução de resposta *in vitro*, MHC-restrita, de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos produtores de IFN- γ maior do que aquela obtida pela mistura de células (PINHO *et al.*, 2016).

A utilização de DCs alogênicas fusionadas com células tumorais autólogas na imunoterapia foi avaliada em nosso laboratório; no estudo com pacientes com melanoma ou câncer renal metastático, 71% dos pacientes incluídos mostraram estabilidade de doença, com duração de até 19 meses após vacinação, além de se observar recuperação da resposta imune em teste de hipersensibilidade tardia cutânea (DTH) contra antígenos de memória (BARBUTO *et al.*, 2004).

Atualmente, para o caso do GBM, há dois estudos de imunoterapia à base de DCs que tem mostrado melhora significativa na sobrevida mediana dos pacientes, Um deles é a ICT-107, uma vacina de DCs autólogas pulsadas com múltiplos antígenos associados a tumor (PHUPHANICH *et al.*, 2013), não obstante a fase 3 foi suspensa devido à falta de recursos econômicos. E a outra é a DCVax (LIAU *et al.*, 2018), vacina de células dendríticas autólogas pulsadas com lisados tumorais que atualmente se encontra na fase 3 do estudo clínico. Porém, tendo em consideração o acima exposto sobre o problema do uso das DCs funcionalmente alteradas de pacientes com câncer, chama a atenção a ausência, na literatura, de estudos usando DCs alogênicas fusionadas com células tumorais para o tratamento do GBM.

2.3.1.2. Modelos *in vitro* de GBM para avaliar o efeito da imunoterapia

Diante de doenças complexas como o GBM, modelos *in vitro* são instrumentos potenciais de aprimoramento e avaliação de diferentes estratégias terapêuticas. Embora os modelos iniciais tenham sido os de culturas em monocamadas, (chamados modelos bidimensionais ou 2D), modelos tridimensionais (3D), mais recentes, trazem vantagem aos estudos, pois podem replicar mais aproximadamente o microambiente *in vivo* altamente complexo do GBM. Além disso, os modelos 3D de GBM são mais simples e mais confiáveis do que modelos animais *in vivo*, que envolvem procedimentos técnicos caros e demorados (COSTA *et al.*, 2016; XIAO *et al.*, 2017).

Estes modelos 3D levam à formação de esferóides tumorais, onde se pode encontrar um padrão de crescimento semelhante ao do tumor sólido, isto é, nos estágios iniciais, o volume do esferoide aumenta exponencialmente até atingir 200 a 500 μm de diâmetro; subsequentemente, a taxa de crescimento de volume começa a diminuir até que o volume do esferoide permaneça constante, isto é, o *plateau* de crescimento esferoide (WARD E KING, 1997; COSTA *et al.*, 2014).

Dentro dos esferóides tumorais, assim como nos tumores sólidos, existe uma organização em camadas. A camada externa composta por células com uma alta taxa de proliferação já que estão em contato com os nutrientes e o oxigênio (TREDAN *et al.*, 2007), e a camada interna composta por células senescentes ou em necrose por falta de nutrientes e oxigênio (MINCHINTON E TANNOCK, 2006; TREDAN *et al.*, 2007)

constituindo um ambiente com baixos níveis de pH e hipóxico (WOJTKOWIAK *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2016). Além da arquitetura do esferóide, a presença de uma matriz extracelular (ECM) secretada pelas células dentro do esferoide confere maior similaridade com os tumores sólidos (YEON *et al.*, 2013; CHAN *et al.*, 2013) permitindo assim observar a interação célula-ECM e seus efeitos sobre o padrão de migração e invasão das células tumorais (VAN DIJK *et al.*, 2013), fenômeno também observado *in vivo*. Além disso, nos esferóides tumorais, as células crescem em contato próximo nas três dimensões, reproduzindo assim as comunicações físicas e as vias de sinalização observadas em tumores sólidos (HANAHAN E COUSSENS, 2012)

Para o estabelecimento de esferóides tumorais podem ser usadas, exclusivamente, células neoplásicas (esferóides homotípicos) ou células neoplásicas junto com outros tipos de células (esferóides heterotípicos), como os fibroblastos (COSTA *et al.*, 2014), células endoteliais (por exemplo, HUVECs (DE SAMPAIO *et al.*, 2012)) ou células imunes (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Os esferóides heterotípicos podem, ainda, ter proporções diferentes de células tumorais e células do estroma para assim mimetizar melhor a heterogeneidade celular encontrada em tumores sólidos (COSTA *et al.*, 2014).

São poucos os estudos que usam os esferóides heterotípicos para avaliar a interação entre as células tumorais e as células do sistema imune no microambiente tumoral e, os poucos relatados mostram resultados relativamente surpreendentes. Os estudos pioneiros de SUTHERLAND *et al.* (1977) sugeriram que células aloespecíficas de baço poderiam infiltrar esferóides de câncer murino e matar as células tumorais. Estudos posteriores, entretanto, indicaram que a lise de células tumorais de cabeça e pescoço incluídas em esferóides multicelulares por células *killer* ativadas por linfocinas (LAK) foi detectável somente após três dias de co-cultura, ao contrário de 4 horas para células tumorais cultivadas em suspensões de células individuais (SACKS *et al.*, 1990). Ainda outros estudos mostraram que a ativação de linfócitos infiltrantes tumorais ou clones de células T CD8 + antígeno-específicos para esferóides de cancer de bexiga e pulmão tem capacidade significativamente menor de estimular a liberação de citocinas em comparação com culturas em monocamada, possivelmente devido à apresentação

ineficiente de antígeno gerada pelo microambiente tumoral do esferóide (DANGLES *et al.*, 2002).

Como já foi mencionado, o TME exerce uma supressão funcional sobre as células imunes. Sendo as DCs uma das principais células afetadas pelo TME e conhecendo seu papel importante no início da resposta imune, é interessante entender como essas células são moduladas nos pacientes com GBM usando modelos que se assemelhem ao contexto *in vivo*. O microambiente gerado *in vitro* pelo modelo 3D pode ajudar a entender o efeito do TME sobre as células do sistema imune, com ênfase no papel das DCs. Assim, ao integrar e incorporar os componentes complexos do microambiente do GBM, o modelo 3D pode ser usado como uma ferramenta para o teste de terapias, para pacientes com GBM. Por exemplo, usando células e matrizes derivadas de pacientes, planos de tratamento personalizados podem ser construídos. Curiosamente, no entanto, não há estudos que tenham avaliado esta metodologia.

3. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da resposta imune nos pacientes com glioblastoma tratados com a imunoterapia de células dendríticas e o desenvolvimento do modelo tridimensional *in vitro* de glioblastoma multiforme para o estudo da resposta imune contra o tumor, com ênfase no papel das células dendríticas.

3.1. Objetivos específicos:

1. Gerar um modelo tridimensional *in vitro* do glioblastoma multiforme usando explantes de pacientes e linhagens tumorais estabelecidas.
2. Estudar o componente imune celular, como parte do microambiente tumoral nas biopsias dos pacientes.
3. Avaliar a influência do microambiente tumoral *in vitro* e o ambiente *in vivo*, sobre as células dendríticas de pacientes antes e após vacinação e de doadores saudáveis.
4. Avaliar o potencial citotóxico dos linfócitos T obtidos a partir da estimulação *in vitro* com DCs expostas aos esferóides tumorais *in vitro*, ou provenientes de pacientes, frente ao modelo *in vitro* tridimensional de glioblastoma.

4. METODOLOGÍA

4.1. Casuística

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 1312/CEPSH).

Doadores saudáveis: Foi usado sangue de câmara de leucorredução de plaquetaferese de 20 doadores saudáveis provenientes do Banco de Sangue do Hospital Oswaldo Cruz.

Pacientes: Até o momento, foram incluídos* 25 pacientes no estudo (**ver tabela 1**), provenientes do Hospital do Coração e do Instituto do Câncer do São Paulo.

* *Para inclusão no estudo, os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido estabelecido (ver Anexo).*

Tabela 1. Pacientes incluídos no presente estudo. Na tabela se mostram o número de pacientes incluídos, classificados por seu sexo e idade.

Caso	Idade	Sexo
GBM1	67	M
GBM2	30	F
GBM3	41	M
GBM4	22	F
GBM5	53	M
GBM6	5	M
GBM7	61	F
GBM8		M
GBM9	79	M
GBM10	63	F
GBM11	71	M
GBM12	65	F
GBM13	71	F
GBM14		M
GBM15	42	M
GBM16	64	M
GBM17	50	M
GBM18	60	F
GBM19	62	M
GBM20	48	F
GBM21	32	M
GBM22	64	F
GBM23	38	M
GBM24		M
GBM25	60	F

4.2. Geração do modelo tridimensional *in vitro* de glioblastoma

4.2.1. *Linhagens celulares*

Foram usadas as seguintes linhagens: U87MG, de GBM, doada pela Dra. Mari Sogayar (Núcleo de Terapia Celular e Molecular, Universidade de São Paulo), HUVEC, de células endoteliais e MRC5, de fibroblastos de pulmão.

4.2.2. *Amostra tumoral*

Os tumores foram digeridos com colagenase tipo VIII (Sigma Aldrich) por 2h, em agitação e a 37°C. Após esse tempo, a suspensão celular obtida foi filtrada e lavada duas vezes com meio RPMI a 1500 rpm por 5 minutos. Foi contado o número de células e avaliado a viabilidade por azul de tripan. Foram congeladas 12×10^7 células em 12 criotubos, contendo 1×10^7 células cada um, por paciente. O resto das células foi usado para os ensaios posteriores. Os pedaços de tumor que ficaram retidos na gaze após filtração foram usados para obter os explantes tumorais. Esses fragmentos foram colocados em placas de 6 poços contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1 % de antibiótico/antimicóticos (R-10), as células obtidas dessa cultura foram usadas para a formação dos esferóides tumorais. O sobrenadante das culturas foi coletado, centrifugado a 1500g por 5 minutos a 4°C e armazenados a -80°C para seu posterior uso.

4.2.3. *Esferóides*

Para a formação dos esferóides, placas de 96 poços foram cobertas com 50 µL de agarose a 1% em solução tamponada de fosfato (PBS) e deixados para solidificar a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos.

Foram feitos 3 modelos de esferóides tumorais: homotípicos, constituídos apenas por uma linhagem (U87MG / HUVEC / MRC5), heterotípicos, constituídos por dois ou mais linhagens (U87MG + HUVEC / U87MG + MRC5 / HUVEC + MRC5 / U87MG + HUVEC + MRC5) e derivados diretamente de pacientes. Para o modelo heterotípico, quando foram duas populações, as células foram plaqueadas na proporção de 1:3, sendo sempre a de maior quantidade a tumoral (U87MG), e 1:1 na ausência da célula tumoral. No caso

de três populações, as proporções foram 2:1:1, sendo a de maior quantidade a U87MG. Para os esferóides tumorais derivados de paciente, foram plaqueadas 10^4 cel/poço.

Uma vez atingida a confluência de 90%, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes a 450g por 5 minutos, contadas em câmara de Neubauer, ressuspensas em R-10 e plaqueadas na concentração determinada na placa coberta com agarose. As culturas foram deixadas durante 4 dias na estufa a 37°C e com 5%CO₂.

Os sobrenadantes das culturas foram coletados no quarto dia e usados para a preparação do meio condicionado. Foram coletados 100µL de sobrenadante por poço, centrifugados a 1500g por 5 minutos a 4°C e armazenados a -80°C para seu posterior uso.

4.2.4. *Dosagem de mediadores solúveis nos esferóides*

A presença de mediadores solúveis presentes nas culturas foi determinada mediante o ensaio de Cytometric Bead Array (CBA). Foi usado o Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences) para avaliar a presença de IL12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 nos sobrenadantes e foram seguidas as indicações do fabricante.

As amostras foram analisadas no citômetro LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) do Centro de Facilidades para a Pesquisa do ICB (CEFAP)

4.3. Avaliação do infiltrado leucocitário nas amostras dos pacientes

Uma alíquota da suspensão celular tumoral obtida após sua digestão (4.2.2) foi usada para o estudo da presença das diferentes populações leucocitárias infiltrantes. Assim, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas 450g por 5 min, filtradas para evitar a formação de grumos e incubadas com o *mix* de anticorpos descrito na tabela 2, durante 20 min a 4°C. Após este tempo, foram acrescentados 200uL de PBS a cada amostra para logo serem centrifugadas a 450g por 5 minutos. As amostras foram fixadas com 200uL de paraformaldeído a 1% para sua posterior leitura. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo (FACSCanto II; Becton & Dickinson), e os dados obtidos analisados no software FlowJo versão X para Windows (TreeStar). Foram usados os seguintes anticorpos monoclonais comerciais: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti CD11b,

antiCD11c, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD45, anti-CD56, anti-HLA-DR e o reagente de viabilidade LIVE/DEAD violeta (Invitrogen). As marcações foram divididas em dois painéis (**ver tabela 2**).

Tabela 2. Anticorpos monoclonais usados para avaliar o infiltrado tumoral. Se indica especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e o fluorocromo. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences.

	MOLÉCULA	CLONE	ISOTIPO	FLUOROCROMO
PAINEL 1	CD3	SK7	IgG ₁ , κ	V500
	CD4	RPA-T4	IgG ₁ , κ	APC
	CD8	SK1	IgG ₁ , κ	PerCP
	CD19	SJ5C1	IgG ₁ , κ	APCCy7
	CD25	MA-251	IgG ₁ , κ	PE
	CD45	HI30	IgG ₁ , κ	PECy7
	CD56	NCAM16.2	IgG ₁ , κ	FITC
PAINEL 2	HLA-DR	G46-6/L243	IgG _{2a} , κ/ IgG ₂ , κ	V500
	CD11b	ICRF44	IgG ₁ , κ	PECy5
	CD11c	B-ly6	IgG ₁ , κ	APC
	CD14	MφP9	IgG _{2b} , κ	PE
	CD16	3G8	IgG ₁ , κ	APCH7
	CD45	HI30	IgG ₁ , κ	PECy7

4.4. Avaliação do TME do GBM sobre as mo-DCs.

4.4.1. Amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram obtidas de câmaras de leucorredução ou por venóclise como mencionado no item 4.1.

Para a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC), as amostras foram diluídas em PBS na proporção de 1:1, e colocadas em tubos plásticos cônicos de

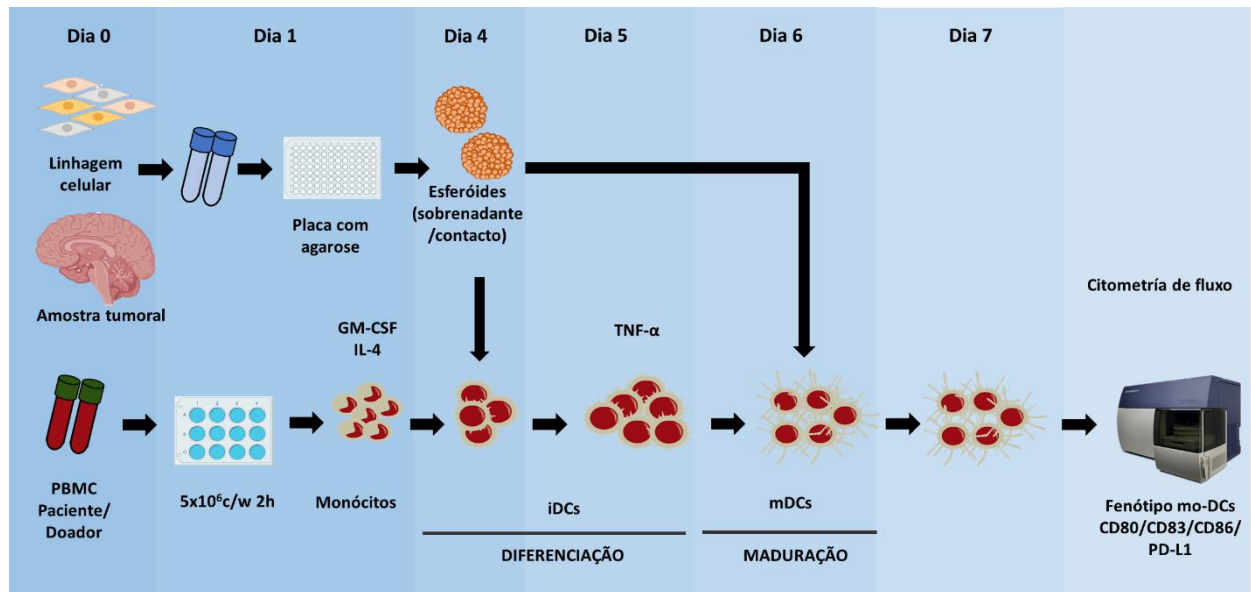
50mL, sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) e centrifugadas a 900g por 30 minutos, a 18°C, e sem *brake*. Após centrifugação a nuvem de células mononucleares formada foi retirada cuidadosamente com uma pipeta pasteur, colocada em outro tubo contendo RPMI-1640 e centrifugada a 350g por 10 minutos, a 18°C. Essas células foram então lavadas, com RPMI, mais 2 vezes, a 1 e 350g, 300g e 250g, respectivamente. O sedimento foi coletado, e as células quantificadas. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada pela exclusão do corante azul de trypan.

4.4.2. *Isolamento de monócitos e diferenciação em DCs*

As PBMCs obtidas foram cultivadas em placas de 12 poços, numa concentração de 5×10^6 células/mL em 1 ml de meio RPMI/poço, por um período de duas horas, no qual os monócitos tornaram-se aderidos à placa. As células não-aderentes (CNAs) foram retiradas junto ao sobrenadante e às aderentes acrescentou-se meio R-10 juntamente com as citocinas IL-4 e GM-CSF numa concentração final de 50ng/mL (PEPROTECH); as placas foram mantidas a 37°C e com 5% de CO₂ por 5 dias. No quinto dia de cultura (dia de ativação), as células foram estimuladas com o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) a uma concentração final de 50ng/mL (PEPROTECH) por 48 horas. As células resultantes no sétimo dia foram chamadas de mo-DCs (DCs derivadas de monócitos).

Para o tratamento das mo-DCs foi seguido o seguinte esquema (**Figura 3**). No quarto dia do processo de diferenciação, um grupo de mo-DCs foi tratado com o sobrenadante das culturas de esferoides (50% do volume total do poço) ou colocado em contato com os esferóides. No sexto dia, outro grupo de mo-DCs foi tratado de igual modo ao anteriormente mencionado. No sétimo dia as células foram marcadas para se avaliar o seu fenótipo de membrana por citometria de fluxo.

Figura 3. Esquema de tratamento das DCs. As células foram tratadas um dia antes (4to dia) e um dia depois (6to dia) da exposição ao estímulo de maturação com o sobrenadante da cultura de esferóides o colocados em contacto com eles. Após os 7 dias de diferenciação foi analisado o fenótipo destas células mediante citometria de fluxo.



4.4.3. Avaliação do fenótipo das mo-DCs por citometria de fluxo

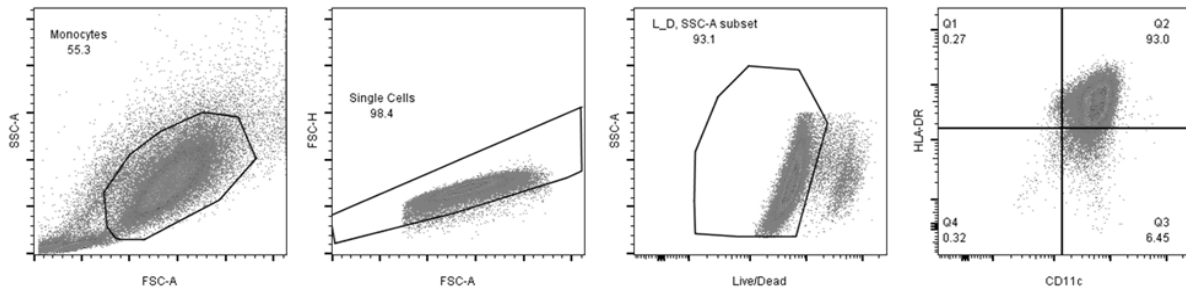
Ao término das culturas, parte das células foram retiradas com uma solução de *rinsing* (PBS + EDTA 2mM), quantificadas e marcadas com os anticorpos monoclonais comerciais citados na tabela 3 para avaliar seu fenótipo por citometria de fluxo. Outra parte das células foi separada para os ensaios de proliferação. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e mantidos a -80°C para ensaios posteriores não avaliados aqui. Após os 5 dias de diferenciação e 2 dias de maturação as mo-DCs foram colocadas em tubos cônicos, lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 450g por 5 minutos. Logo, as células foram marcadas com os anticorpos antes mencionados. As células foram incubadas por 20 min a 4°C . Após esse período, foram acrescentados 300 μL de PBS e novamente se submeteu as células à centrifugação, por 5 minutos a 1500 rpm. As células marcadas foram fixadas com 200 μL de paraformaldeído 1% para sua posterior leitura. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II; Becton & Dickinson), e os dados obtidos analisados no *software* FlowJo versão X para Windows (TreeStar).

Tabela 3. Anticorpos monoclonais usados para avaliar o fenótipo das mo-DCs. Se indica especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e o fluorocromo. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences

MOLÉCULA	CLONE	ISOTIPO	FLUOROCROMO
HLA-DR	G46-6/ L243	IgG ₁ , κ	V500
CD11c	B-ly6	IgG _{2a} , κ/ IgG ₂ , κ	FITC
CD80	L307.4	C3H/Bi IgG ₁ , κ	PE
CD83	HB15e	IgG ₁ , κ	APC
CD86	2331 (FUN-1)	IgG ₁ , κ	PECy5
PD-L1	MIH1	IgG ₁ , κ	PECy7

Para analisar as moléculas presentes na superfície foi feita a seguinte estratégia: a partir da análise da relação de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) foram selecionados os monócitos. Em seguida, os eventos duplos ou *doublets* foram eliminados mediante a delimitação dada pela relação de área do tamanho (FSC-A) com a altura (FSC-H). Logo, dentro dessa região foram escolhidas as células que excluía o corante vital, as células vivas, para posteriormente selecionar nossa população de interesse CD11c + e HLA-DR+ (**Figura 4**). Nestas, a expressão dos marcadores CD80, CD83 e CD86 foi avaliada.

Figura 4. Estratégia de análise das mo-DCs por citometria de fluxo. *Dot-plots* de tamanho por granulosidade (SSC x FSC) indicando o *gate* para a seleção de *monócitos*, tamanho de área por altura (FSC-H x FSC-A) indicando *single cells*, o marcador de viabilidade (Count x Live/Dead) indicando o *gate* para células vivas e CD11c por HLA-DR indicando *gate* de células duplo positivas para esses marcadores



4.4.4. Avaliação da capacidade das mo-DCs para estimular linfócitos T alogênicos.

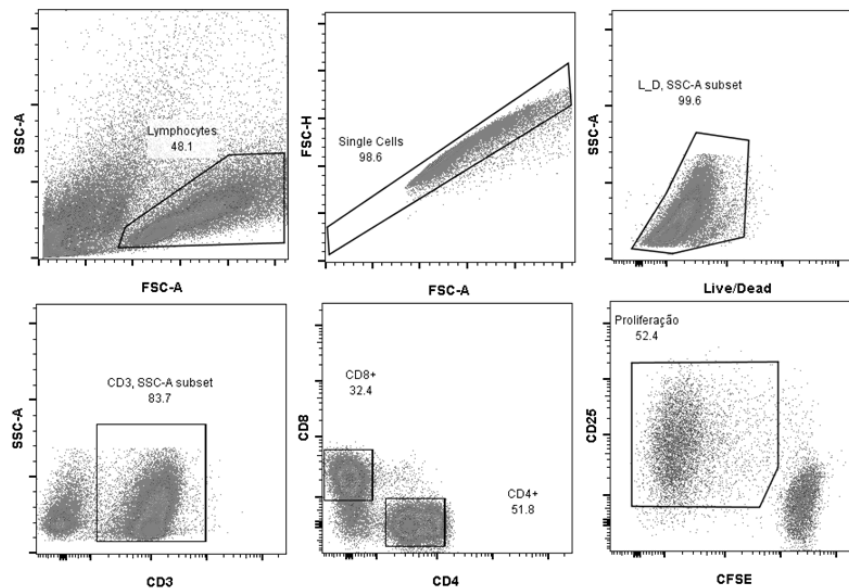
A fração denominada CNA provenientes de doadores diferentes aos das mo-DCs, foi usada para o ensaio de linfoproliferação. As células foram centrifugadas a 450g por 5 minutos e ressuspendidas em PBS. Foram adicionados 2 μ L de CFSE para cada 10⁷ células e incubados por 10 minutos a 37 °C, logo foram adicionados 10ml de R-10 gelado. As células foram centrifugadas duas vezes a 600g por 7 minutos e ressuspendidas em R-10. As CNAS marcadas com CFSE foram semeadas em placas de 96 poços (fundo em U), juntamente com as mo-DCs provenientes do ensaio descrito no item 4.4.2 na proporção de 30:1 respectivamente. Como controle positivo foi usado 1% de fitohemaglutinina (PHA, Sigma Aldrich). A co-cultura foi mantida por 5 dias a 37°C e CO₂ ao 5% e, no quinto dia, o sobrenadante foi coletado para posterior avaliação da produção de citocinas por CBA. As células foram coletadas e marcadas com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD25 conjugados com fluorocromos (**Tabela 4**), além do marcador de viabilidade LIVE/DEAD violeta (Invitrogen), seguindo o padrão de marcação descrito no item 4.4.2. As porcentagens de proliferação nas subpopulações de interesse, foram calculadas através da marcação CFSE^{low}CD25^{high} e analisados com o *software* FlowJo vX.

Tabela 4. Anticorpos monoclonais usados para avaliar linfoproliferação. Se indica especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e o fluorocromo. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences.

MOLÉCULA	CLONE	ISOTIPO	FLUOROCROMO
CD3	SK7	IgG ₁ , κ	V500
CD4	RPA-T4	IgG ₁ , κ	PE
CD8	SK1	IgG ₁ , κ	PerCP
CD25	M-A251	IgG ₁ , κ	APC

Para análise da proliferação dos linfócitos, foi selecionada a população com tamanho e granulosidade referente a tais células e, em seguida, foram selecionadas as células que não foram marcadas com o reagente “Live/Dead”, ou seja, as células viáveis. Então, as células positivas para a molécula CD3 foram selecionadas e, dentro desta população foram analisadas as subpopulações positivas para CD4 ou CD8. Para análise, foi determinado o *gate* referente à proliferação dos linfócitos (CFSE^{low}CD25^{high}) (**Figura 5**).

Figura 5. Estratégia de análise de proliferação por citometria de fluxo. *Dot-plots* de tamanho por granulosidade (SSC x FSC) indicando o *gate* para a seleção de *linfócitos*, tamanho de área por altura (FSC-H x FSC-A) indicando *single cells*, *dot plot* para o marcador de viabilidade (SSC-A x Live/Dead) indicando o *gate* para células vivas, dot plot para CD3+ (SSC-A x CD3+), dots plots para CD4 x CD8 indicando os *gates* de células positivas para esses marcadores, CFSElowCD25high indicando a porcentagem de proliferação



4.5. Avaliação do potencial citotóxico dos linfócitos T obtidos a partir da estimulação *in vitro* com DCs expostas aos esferóides tumorais *in vitro*.

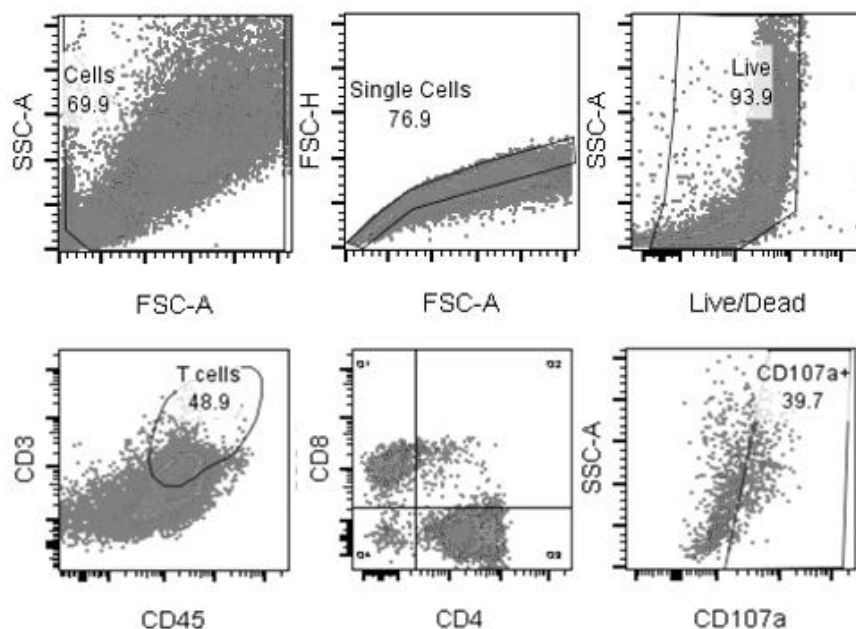
Uma alíquota dos linfócitos T provenientes do ensaio de linfoproliferação foi colocada em contato com os esferóides previamente formados (item 4.2.3) na proporção de 1:10 (linfócitos: células tumorais respectivamente) durante 24h. Após esse tempo, os linfócitos foram coletados e marcados com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45, anti-CD107a conjugados com fluorocromos (**Tabela 5**), além do marcador de viabilidade LIVE/DEAD violeta (Invitrogen), seguindo o padrão de marcação descrito no item 4.4.2.

Tabela 5. Anticorpos monoclonais usados para avaliar o potencial citotóxico. Se indica especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e o fluorocromo. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences.

MOLÉCULA	CLONE	ISOTIPO	FLUOROCROMO
CD3	SK7	IgG ₁ , K	V500
CD45	HI30	IgG ₁ , K	PECy7
CD107a	H4A3	IgG ₁ , K	PE

Para a avaliação do potencial citotóxico dos linfócitos, foi selecionada a população de interesse segundo o tamanho por granulosidade, logo foram excluídos os eventos *doublets*, e delimitada a população de células vivas. Em seguida, foram selecionadas as células CD3+ CD45+, e dentro de essa população as CD8+ e CD107a+ (**Figura 6**).

Figura 6. Estratégia de análise do potencial citotóxico por citometria de fluxo. *Dot-plots* de tamanho por granulosidade (SSC x FSC) indicando o *gate* para a seleção das células de interesse. Tamanho de área por altura (FSC-H x FSC-A) indicando *single cells*, *dot plot* para o marcador de viabilidade (SSC-A x Live/Dead) indicando o *gate* para células vivas, dot plot para CD3+ CD45+, *dots plots* para CD56+ e a subpopulação CD107a+.



4.6. Análise estatística

Na análise dos resultados, diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. As análises estatísticas foram feitas com o programa Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.), Dependendo da distribuição das amostras foram feitos análises paramétricos ou não paramétricos.

5. RESULTADOS

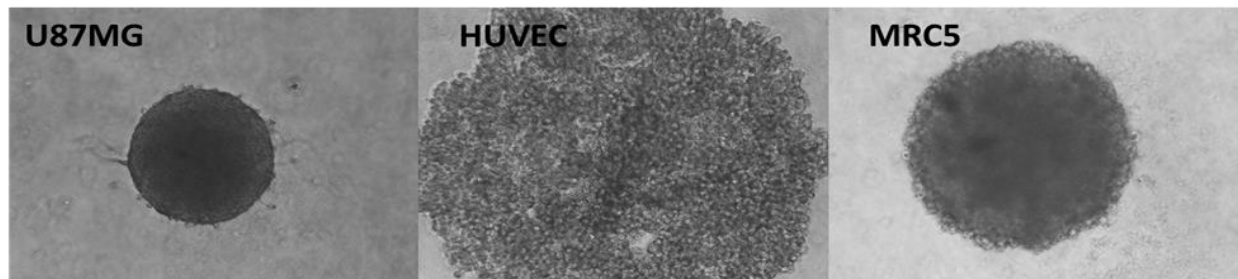
5.1. Células de linhagem e de pacientes formam esferóides

5.1.1. Esferóides homotípicos

Esferóides homotípicos foram gerados a partir da linhagem U87MG, HUVEC ou MRC5. Os esferóides foram deixados até 4 dias em cultura.

Após as primeiras 24h, as células tumorais estavam agrupadas, mas ainda não tinham formado estrutura alguma. Após 48h, já se observava um agrupamento mais compacto de células no grupo U87MG e MRC5. Às 72h, os esferóides já estavam formados nos grupos anteriormente mencionados, mas quando coletados, tais esferóides se desfaziam. Assim, estes foram deixados por mais um dia em cultura, de modo que, às 96h os esferóides dos grupos U87MG e MRC5, quando coletados mantiveram sua estrutura. A linhagem HUVEC não formou esferóide nenhum até as 96h e só foi possível observar a formação de um agrupamento de células (**Figura 7**).

Figura 7. Esferóides homotípicos. Microfotografias mostrando os esferóides das linhagens U87MG, HUVEC e MRC5 após as 96h de cultura. Aumento 100x

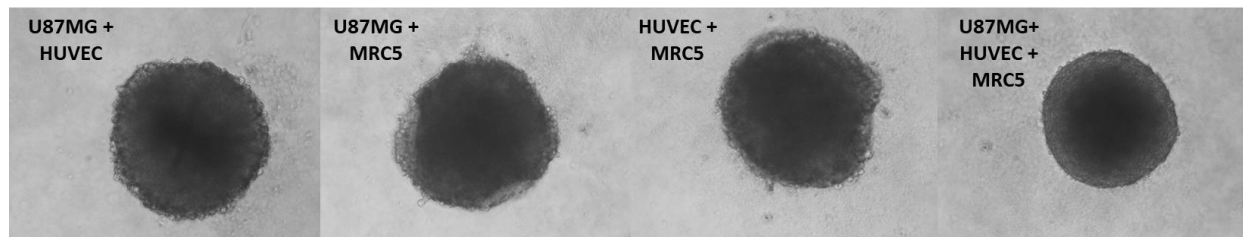


Foram medidos os diâmetros dos esferóides durante os dias de formação. No primeiro dia de formação, os esferóides apresentavam diâmetros de 708, 1015 e 823 μm aproximadamente. É interessante notar que após mais tempo em cultura, esta medida foi diminuindo, de modo que, no quarto dia os esferóides atingiram um diâmetro de 412 e 530 μm para U87MG e MRC5 respectivamente; evidenciando a não formação de um esferoide, o agrupamento de células HUVEC manteve o diâmetro similar ao anterior (997 μm).

5.1.2. Esferóides heterotípicos

Foram feitos ensaios para padronizar a cultura dos esferóides heterotípicos, aqueles formados por populações celulares além da linhagem tumoral. Assim, foram adicionadas por poço as quantidades das linhagens mencionadas no item 4.2.3 e deixadas em cultura por 4 dias. Ao longo desse tempo, de igual modo que os esferóides homotípicos o diâmetro dos esferóides heterotípicos foi diminuindo. Desta vez se formaram esferóides em todas as combinações (U87MG + HUVEC, U87MG + MRC5, HUVEC + MRC5 e U87MG + HUVEC + MRC5) (**Figura 8**). Sendo o grupo conformado pelas três linhagens o que apresentou uma forma esférica e com bordas muito mais definidas que os outros grupos.

Figura 8. Esferóides heterotípicos. Microfotografias mostrando os esferóides formados pelas combinações entre as linhagens U87MG, HUVEC e MRC5, após 96h em cultura. Aumento 100x



5.1.3. Esferóides tumorais derivados de pacientes

Até a data foram recebidas amostras de 25 pacientes com diagnóstico de GBM. Estas foram processadas como descrito no item 4.2.2. Os fragmentos tumorais que ficaram na gaze após digestão da amostra tumoral foram colocados em placas com a finalidade de recuperar as células presentes nos fragmentos. O tempo para a obtenção das células teve uma variação entre as amostras sendo desde 7 dias até 32 dias. Uma vez atingidas confluências maiores do que 70%, se observou a formação de esferóides espontâneos em algumas amostras de pacientes (**Figura 9**). Ao contrário dos esferóides homo ou heterotípicos estabelecidos a partir de linhagens estabelecidas *in vitro*, os tumorais apresentavam uma morfologia esferoidal não tão bem definida, embora, com tempo de formação equivalente (**Figura 11**). A mediana do diâmetro dos esferóides obtidos foi de 401 μm aproximadamente. Observou-se também a presença de diferentes populações de células nestas formações, com células com morfologia distinta; algumas destas células permaneceram nos esferóides mesmo após as 3 passagens, enquanto outras

foram perdidas após a primeira passagem (**Figura 10**). Células longas, pequenas, estreladas e redondas foram as principais formas de células observadas nas culturas. Cabe notar que, após 2 ou 3 passagens, algumas das culturas morreram ou tiveram um crescimento muito lento.

Figura 9. Esferóides tumorais derivados de pacientes. Microfotografias mostrando os esferóides formados a partir dos explantes tumorais dos pacientes G1, G3 e G12 depois de 7, 32 e 4 dias em cultura respectivamente. Em G7 se observa o processo de formação do esferoide aos 12 dia em cultura. Aumento 100x

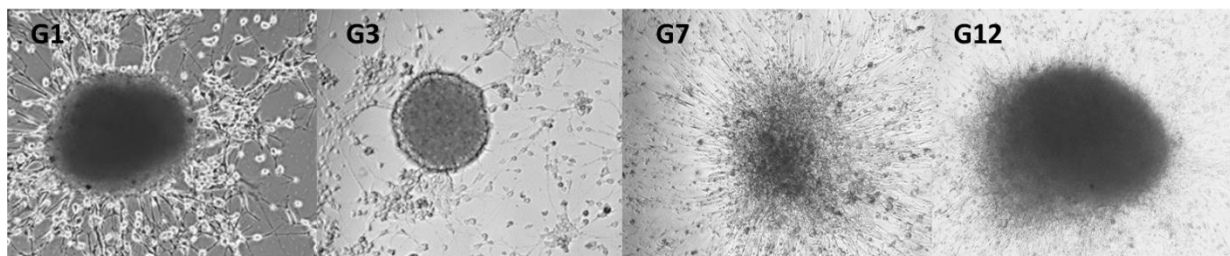
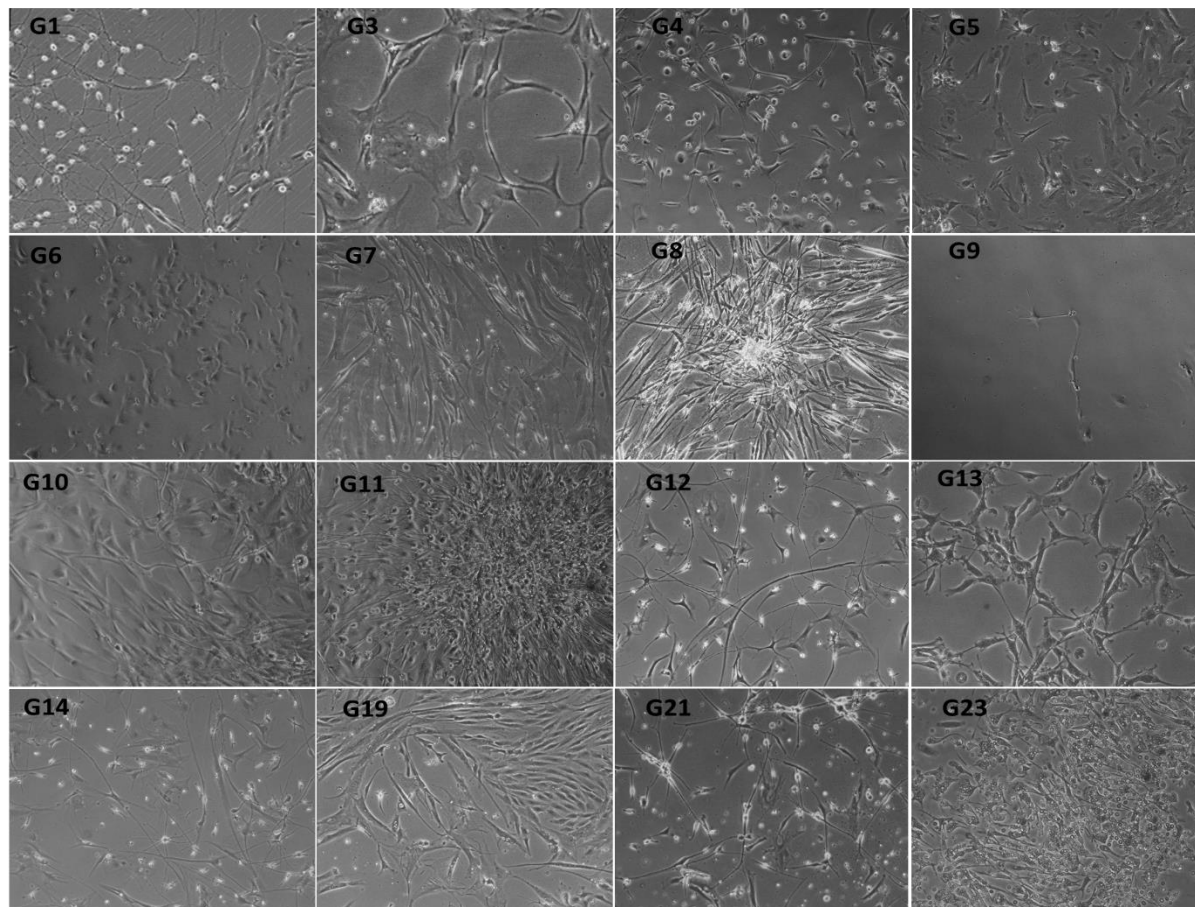
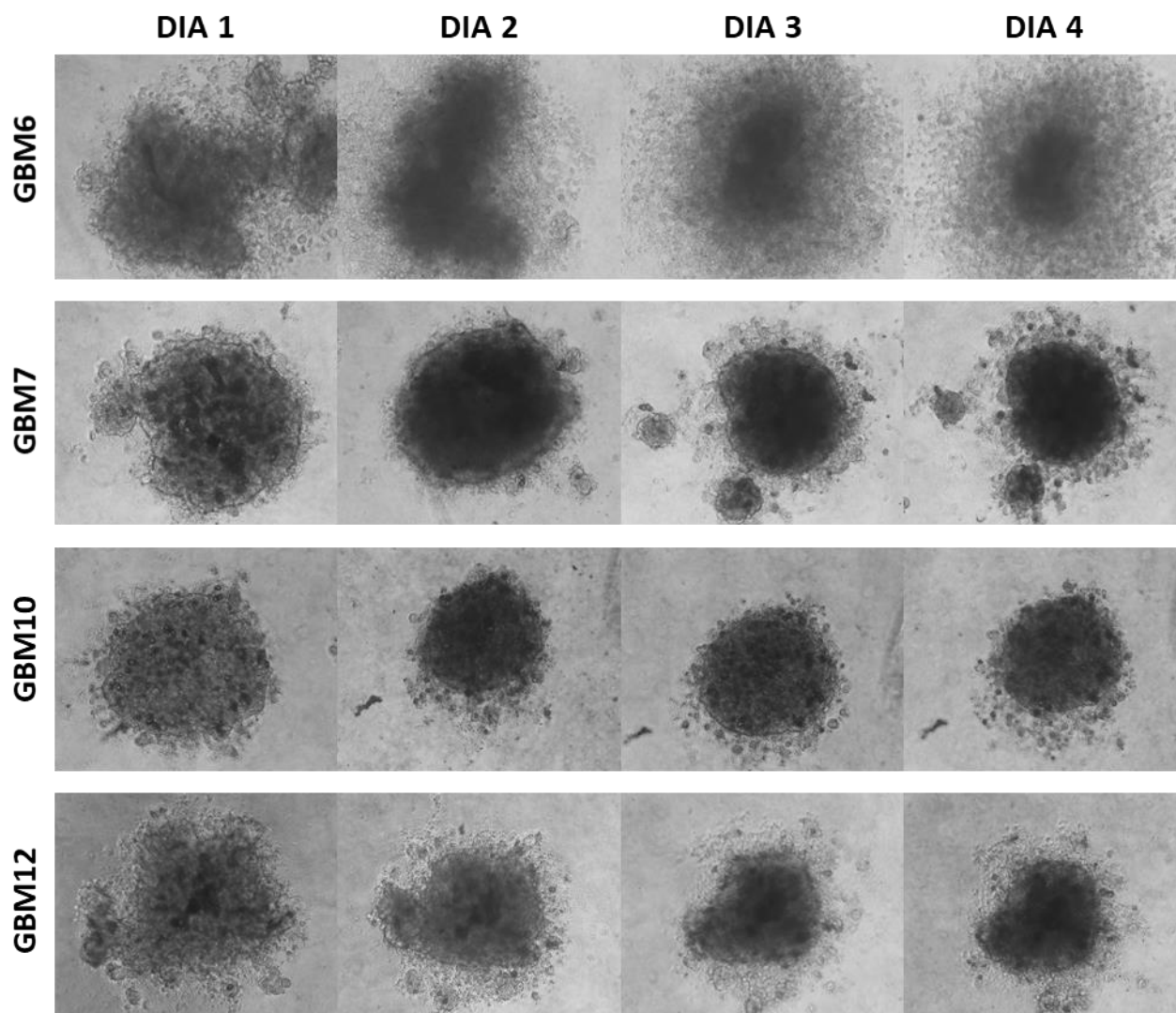


Figura 10. Explante de células derivadas de paciente. Diferentes populações de células obtidas após cultura de explantes tumorais de pacientes. Se observa a heterogeneidade da morfologia celular de cada amostra. Aumento 100x.



Os esferóides tumorais derivados de pacientes foram formados com as células das culturas estabelecidas. Após as células atingirem o 90% de confluência, foi feita a metodologia descrita no item 4.2.3. Depois de 4 dias algumas linhagens formaram esferóides, agrupamentos de células não definidos ou simplesmente não formaram esferóides.

Figura 11. Esferóides tumorais derivados de pacientes com GBM. Microfotografias mostrando o processo de formação dos esferóides derivadas dos pacientes durante quatro dias. Aumento 100x.



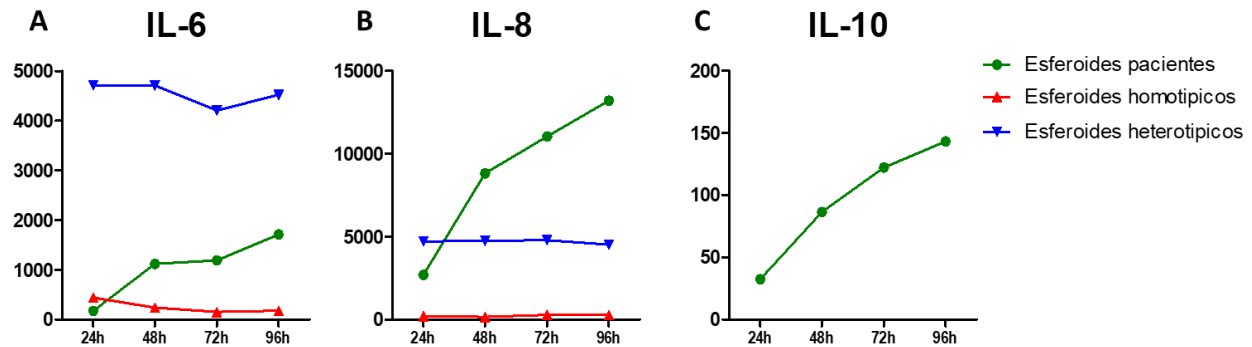
5.2. Os 3 tipos de modelos de esferóides apresentam níveis de produção de interleucinas distintos.

Foi feito um ensaio de CBA com os sobrenadantes dos diferentes modelos em cultura para determinar a presença de mediadores solúveis inflamatórios como IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8. Nenhuma das amostras avaliadas teve presença de IL-12p70, TNF- α e IL-1 β . Não obstante, houve presença de níveis detectáveis de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de esferóides. Ao longo dos 4 dias de formação dos esferóides se observou um aumento dos níveis de IL-10 com um máximo no 4º dia de cultura (143.18 pg/mL) (**Figura 12A**).

Em todas os sobrenadantes se observou a presença de IL-6 e IL-8. Os esferóides tumorais derivados de pacientes mostraram um aumento ao longo dos 4 dias nos níveis de IL-6, sendo 1711,84 pg/mL o máximo valor. Ao contrário se observou uma diminuição nos níveis de IL-6 nas culturas com esferóides homotípicos. Não obstante, os níveis de IL-6 foram mais altos no sobrenadante da cultura dos esferóides heterotípicos (4709,3 pg/mL) em relação aos dos pacientes (**Figura 12B**).

Em relação aos níveis de IL-8, observou-se no sobrenadante das culturas de esferóides derivados de pacientes um aumento ao longo dos quatro dias sendo 13206,46 pg/mL o máximo valor no quarto dia, esse fenómeno também foi observado no sobrenadante dos esferóides heterotípicos. Embora, os níveis de IL-8 nos sobrenadantes dos esferóides homotípicos tenham aumentado ao longo do tempo, estes, ainda continuaram menores (278 pg/mL no 4º dia) em relação aos níveis em sobrenadantes dos esferóides derivados de pacientes (**Figura 12C**).

Figura 12. Gráficas mostrando os níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 nos sobrenadantes dos esferóides. Sobrenadantes das culturas de esferóides homo e heterotípicos e derivadas de pacientes foram coletados durante 4 dias (tempo de formação do esferóide) e usados para avaliar a presença das interleucinas 6, 8 e 10. Se observa um aumento nos níveis de IL-8 e IL-10 no sobrenadante dos esferóides de pacientes e um incremento nos níveis de IL-6 no esferóides heterotípicos.



5.3. O microambiente dos GBM é muito variado em relação ao infiltrado de células CD45+

Foi avaliada, também, a presença de diferentes populações imunes dentro do microambiente de GBM. Foram analisadas 12 amostras tumorais segundo o item 4.3. A grande maioria das amostras apresentou baixa frequência de células CD45+, com a exceção do GBM7 e GBM9, os quais tinham 49.6% e 24.2% células CD45+ respectivamente (**Figura 13**). Dentre as células CD45+, encontraram-se frequências variadas de células CD11c+ (10,6 – 53,5%, n=6), CD14+ (4.37-90%, n= 11), CD16+ (24.5-43.6%, n=2), CD11b+ (0.71-99%, n= 5), HLA-DR+ (0.56-74%, n=10) (**Figura 14**).

Figura 13. Porcentagem de células CD45+ em amostras de pacientes com GBM. Células positivas para CD45+ em amostras de pacientes com GBM.

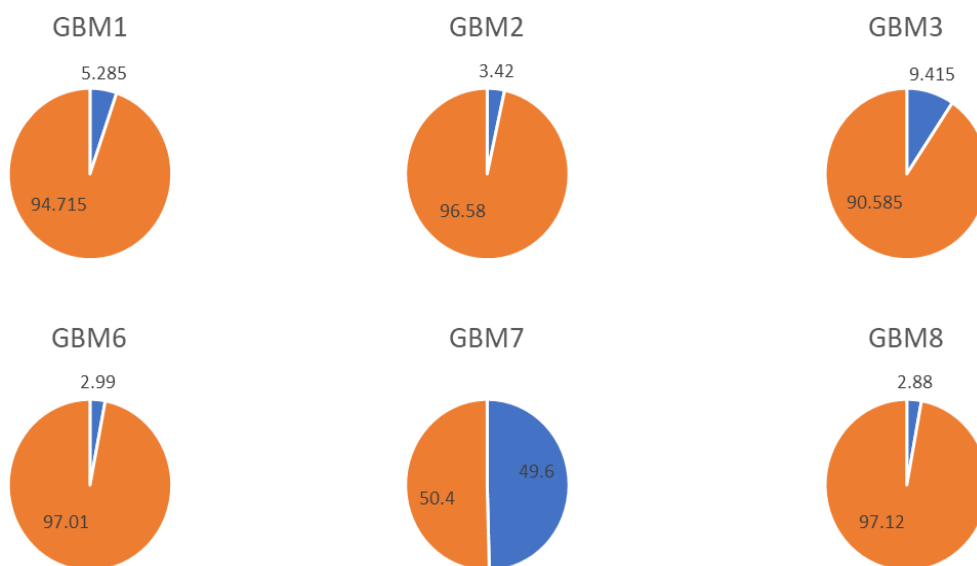
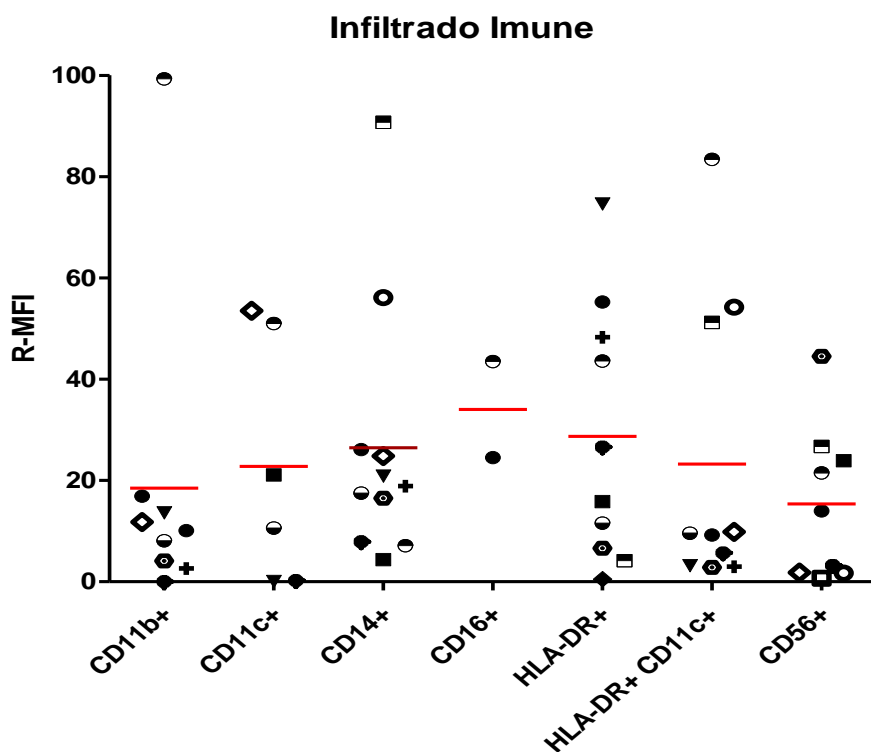


Figura 14. Infiltrado tumoral em amostras de pacientes com GBM. Frequência de células positivas para CD11b+, CD11c+, CD14+, CD16+, HLA-DR+, HLA-DR+ CD11c+ e CD56+, dentro da população CD45+.

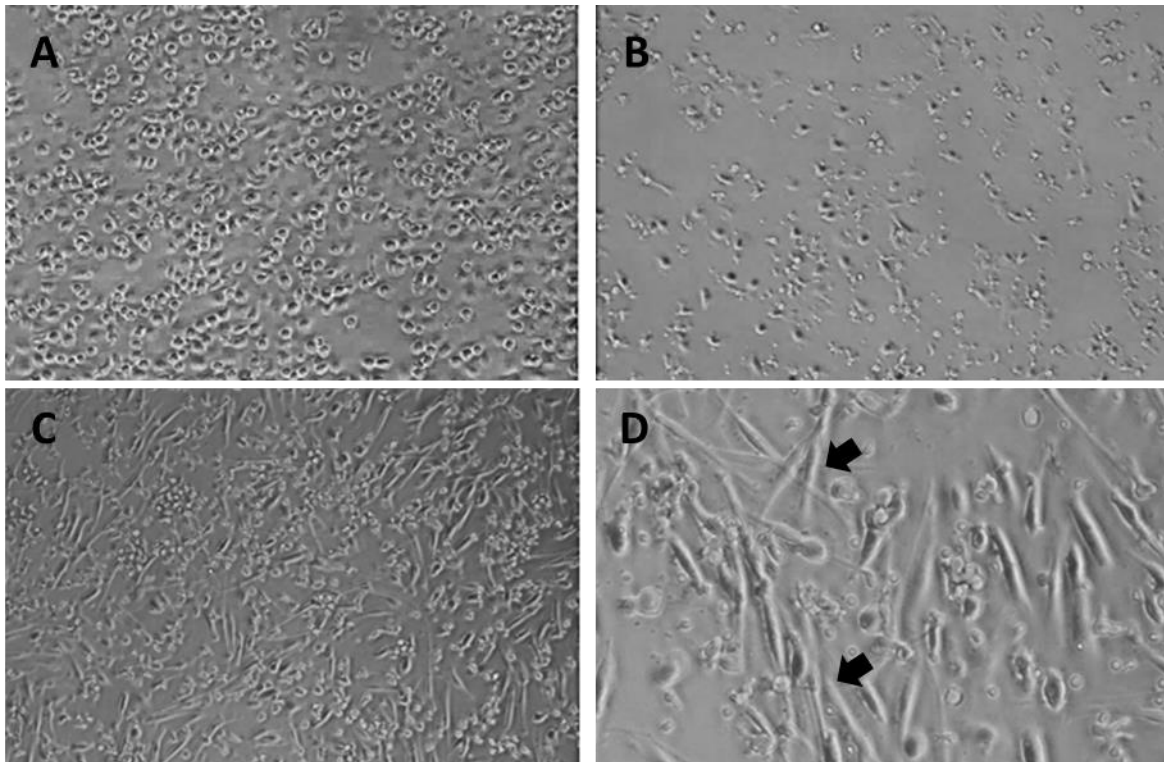


5.4. As mo-DCs expostas a diferentes microambientes podem sofrer alterações no fenótipo

5.4.1. *mo-DCs de doadores saudáveis*

Foram avaliadas as DCs geradas a partir de monócitos (**Figura 15A**) de sangue periférico de doadores saudáveis. O protocolo foi seguido de acordo ao estabelecido na metodologia. No quinto dia da cultura, as células apresentavam uma morfologia com menos prolongamentos (**Figura 15B**) que as observadas nas células dendríticas maduras (mDCs) (sétimo dia, após ativação) (**Figura 15C-D**).

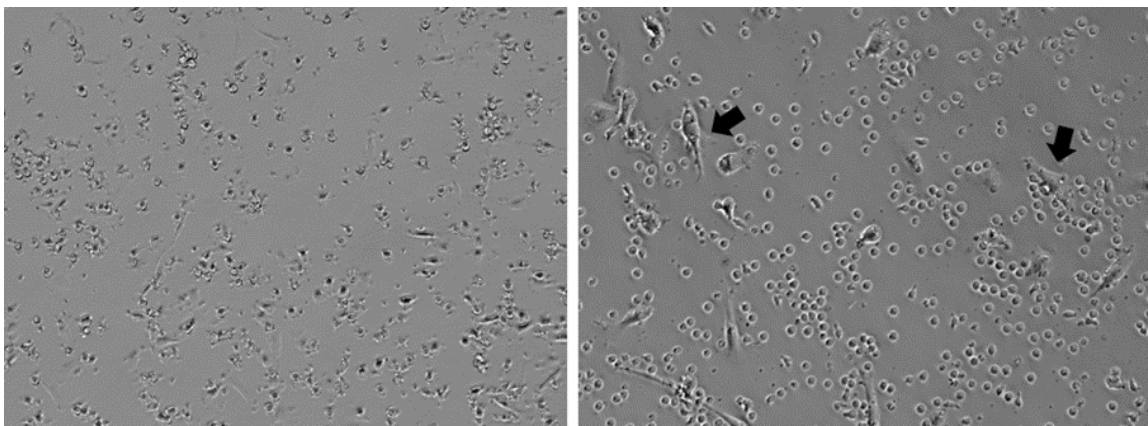
Figura 15. Morfologia das mo-DCs de doadores saudáveis. As microfotografias mostram as células depois da incubação de 2h (**A**), no quinto dia (**B**) e no sétimo dia da diferenciação (**C**). Note-se os prolongamentos nas mo-DCs após ativação, indicadas pelas setas (**D**). Aumento: 100x (A-C) 400x (D).



5.4.2. *mo-DCs tratadas com meio condicionado tumoral.*

As *mo-DCs* de doadores saudáveis foram cultivadas com meio condicionado procedente do sobrenadante das culturas de esferóides (4^{to} dia). As células foram tratadas segundo ao esquema do item 4.4.2. No dia 7, notou-se um maior número de células soltas nas culturas tratadas (**Figura 16**).

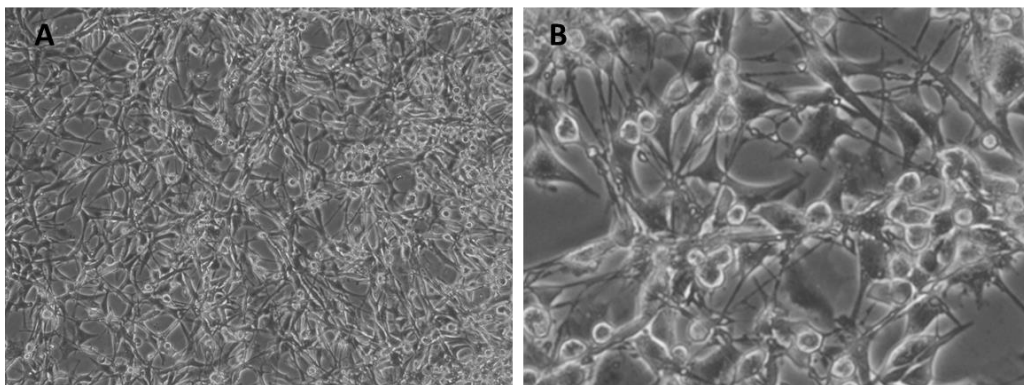
Figura 16. *mo-DCs* tratadas com meio condicionado tumoral. Microfotografias representando as *mo-DCs* maduras cultivadas com meio condicionado da cultura de esferóides, do lado esquerdo, e note-se um menor número de células com prolongações, indicadas pelas setas, do lado direito. Aumento 100x (esquerda) e 400x (direita).



5.4.3. *mo-DCs de pacientes*

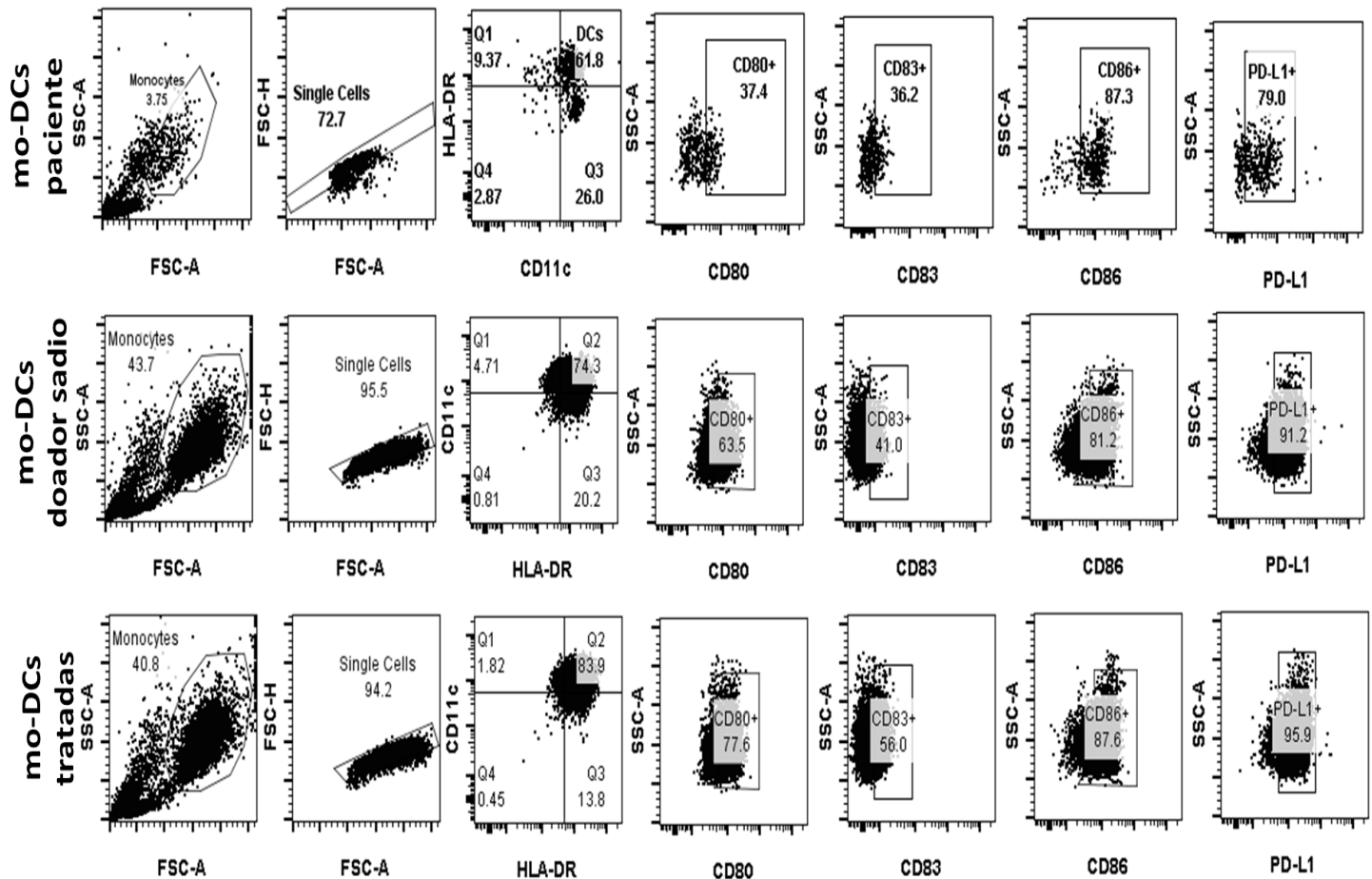
As *mo-DCs* dos pacientes com GBM foram cultivadas nas mesmas condições que dos doadores saudáveis. Entre as principais diferenças, se observaram células fusiformes com prolongamentos longos e formação de redes (**Figura 17**).

Figura 17. *mo-DCs* de pacientes. Microfotografias representando as *mo-DCs* maduras de pacientes, do lado esquerdo (A) note-se um maior número de células e do lado direito (B) em maior aumento se observam as redes formadas pelas células. Aumento 100x (A) e 400x (B).



Por outro lado, foi feita a avaliação do fenótipo das mo-DCs de doadores saudáveis, de pacientes e de doadores saudáveis tratados com o meio condicionado tumoral, mediante citometria de fluxo. Foram avaliados os marcadores CD11c, HLA-DR, CD80, CD83, CD86 e PD-L1 (**Figura 18**).

Figura 18. Avaliação fenotípica das mo-DCs de pacientes, doadores sadios e tratadas. *Dot plots* representativos de cada grupo. Se observam as diferenças entre as frequências para cada marcador das moléculas de co-estimulação e PD-L1.



5.4.4. Avaliação de mo-DCs de pacientes

As DCs obtidas a partir de monócitos de sangue periférico de pacientes foram processadas segundo o descrito no item 4.42. Após os 7 dias de diferenciação, as células foram avaliadas para os marcadores CD80, CD83, CD86 e PD-L1 por citometria de fluxo; mo-DCs de doadores saudáveis foram usadas como controle. Os principais achados se

encontram na lista de observações abaixo:

- Pré-cirurgia (n=14): A expressão de CD80, CD83 e CD86 nas mo-DCs de pacientes foi maior em relação aos controles saudáveis, e a expressão de PD-L1 foi menor (**Figura 19A**).
- Pós-cirurgia (n=14): As mo-DCs derivadas dos pacientes após a resseção do tumor apresentaram níveis altos de CD80 em relação aos controles sadios, enquanto a expressão de CD83 e CD86 foi quase igual à dos controles; por outro lado notou-se diminuição dos níveis de PD-L1 em relação ao controle (**Figura 19B**).
- Pós-primeira dose de vacinação terapêutica (n=3): Após a primeira dose, observou-se um aumento na expressão de CD80 e uma diminuição de CD83 em relação aos controles; a expressão de CD86 e PD-L1 foi igual à dos controles (**Figura 19C**).
- Pós-segunda dose (n=2): Notou-se aumento na expressão de CD80 e diminuição de CD83 em relação ao controle, no entanto a expressão de CD86 foi similar à dos controles saudáveis; a expressão de PD-L1 não mudou significativamente em relação ao controle (**Figura 19D**).

Cabe destacar que, também, aqui, não houve diferenças significativas em relação aos controles para nenhum grupo. Embora, se observem pequenas variações entre os grupos, deve ser considerado que estes valores são a mediana de fluorescência normalizada em relação ao controle sem marcação (controle sem nenhuma marcação de anticorpo).

O monitoramento do fenótipo das mo-DCs pré e pós tratamento com a vacina foi conseguido, por enquanto em apenas 2 pacientes: GBM2 e GBM4. É interessante notar que expressão de CD80 foi aumentando após a cirurgia e vacinação nestes dois pacientes (**Figura 20A**), mas a de CD83, sofreu variações diferentes entre os dois pacientes, enquanto num ela tendeu a aumentar, em outro ela, após um aumento inicial, diminuiu (**Figura 20B**). Em relação a expressão de CD86, esta se manteve, em relação

ao controle, sem variações após a cirurgia e vacinação (**Figura 20C**). Finalmente, também a expressão de PD-L1 distingue os dois pacientes, enquanto um apresentou crescimento contínuo, o outro apresentou queda nítida após a segunda dose de vacinação (**Figura 20D**).

Figura 19. Expressão do R-MFI das moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1 das mo-DCs de controles sadios e pacientes. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. (A) Expressão de R-MFI de CD80, CD83, CD86 e PD-L1 antes da cirurgia, n= 12. (B) Expressão de R-MFI de CD80, CD83, CD86 e PD-L1 após cirurgia, n=5. (C) Expressão de R-MFI de CD80, CD83, CD86 e PD-L1 após a primeira vacinação, n=5. (D) Expressão de R-MFI de CD80, CD83, CD86 e PD-L1 após a segunda vacinação, n=2.

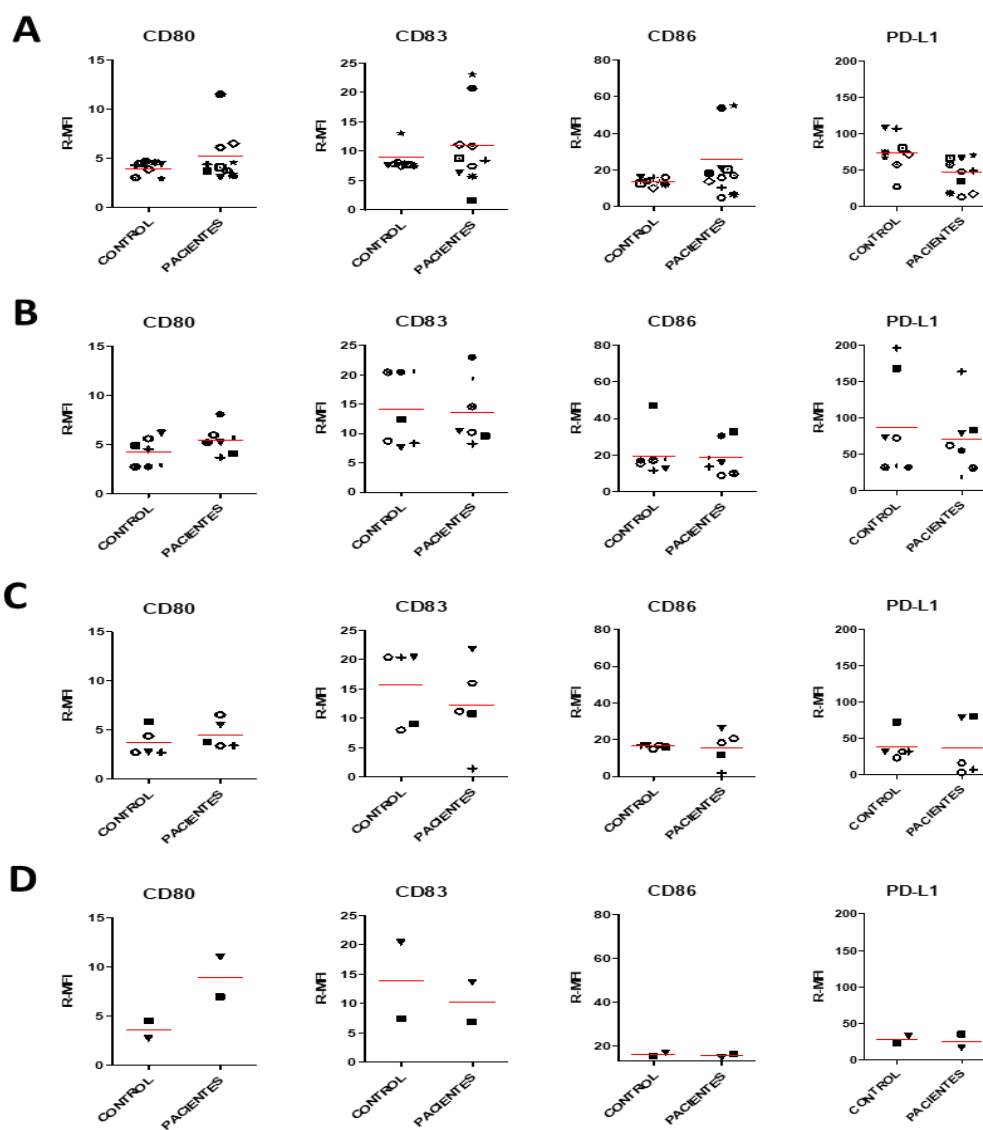
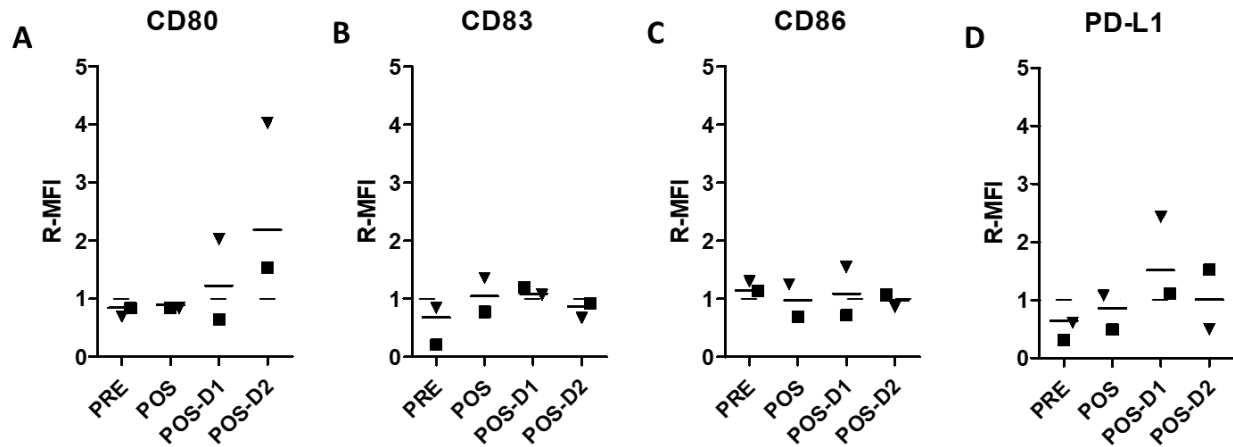


Figura 20. Expressão do R-MFI das moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1 das mo-DCs dos pacientes G2 e G4. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. (A) Expressão de R-MFI de CD80 pre-cirurgia, pos-cirurgia, pos-primeira dose e pos-segunda dose, n= 2. (B) Expressão de R-MFI de CD83 pre-cirurgia, pos-cirurgia, pos-primeira dose e pos-segunda dose, n= 2. (C) Expressão de R-MFI de CD86 pre-cirurgia, pos-cirurgia, pos-primeira dose e pos-segunda dose, n= 2. (D) Expressão de R-MFI de PD-L1 pre-cirurgia, pos-cirurgia, pos-primeira dose e pos-segunda dose, n= 2. ■ = G2, ▼ = G4.



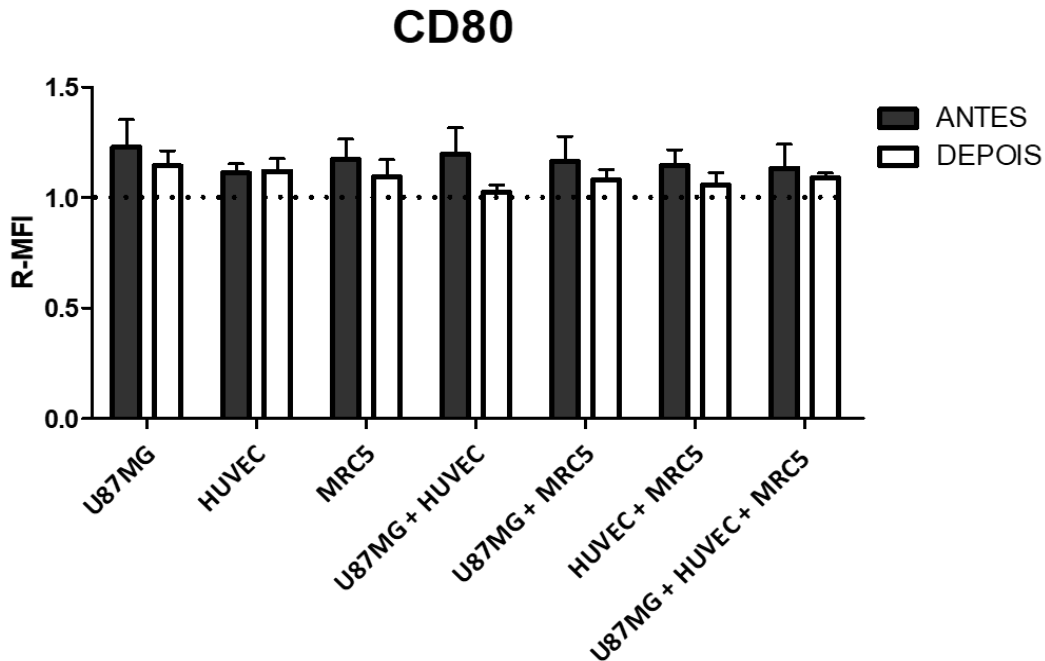
5.4.5. Efeito parácrino do microambiente tumoral sobre as mo-DCs.

Seguindo o esquema de tratamento mencionado no item 4.4.2, as mo-DCs de doadores sadios foram tratados com o sobrenadante das culturas dos esferóides homotípicos e heterotípicos para avaliar o efeito parácrino, ou seja, das moléculas secretadas pelas células que compõem parte do microambiente tumoral. Todas as mo-DCs foram estimuladas com TNF- α . Dois grupos experimentais foram avaliados, o grupo “antes”, para aquelas mo-DCs tratadas 24h antes do dia de ativação e o grupo “depois”, para aquelas tratadas 24h depois do dia de ativação. Foi analisado a intensidade mediana de fluorescência relativa (R-MFI) tendo como controle as mo-DCs cultivadas em condições normais (R-10 + IL-4, GMS-CSF e TNF- α).

As mo-DCs tratadas não apresentaram diferenças significativas na expressão de CD80 em relação ao controle em nenhum dos grupos embora em todos tenha havido uma tendência a maior expressão do que aquela do grupo controle. É interessante notar que quando o sobrenadante foi adicionado depois da estimulação com TNF- α o nível de expressão de CD80 diminuiu e, mais nitidamente ainda, ao se tratar as mo-DCs com o

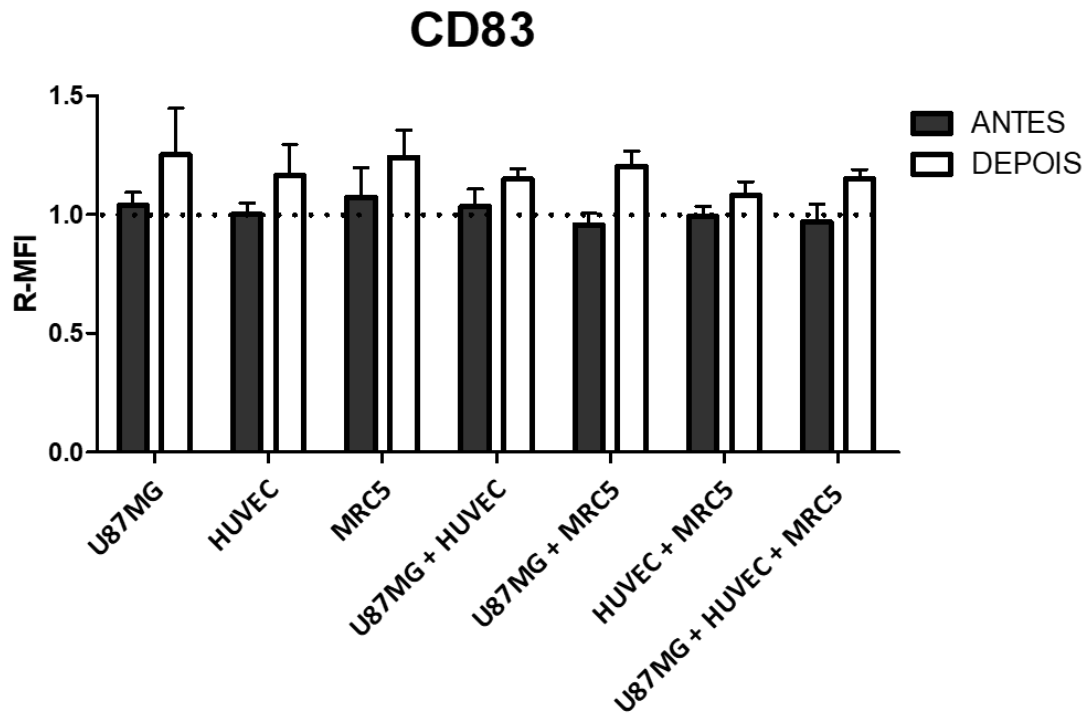
sobrenadante de alguns esferóides heterotípicos, principalmente dos que continham células endoteliais (U87MG + HUVEC, HUVEC + MRC5) (**Figura 21**).

Figura 21. Expressão do R-MFI de CD80 nas mo-DCs tratadas com meio condicionado. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Não obstante, se observou uma diminuição na expressão de CD80 no grupo U87MG + HUVEC tratado depois da estimulação com TNF- α em relação aos outros grupos. As linhas pontilhadas indicam a expressão de CD80 do grupo controle (n= 7).



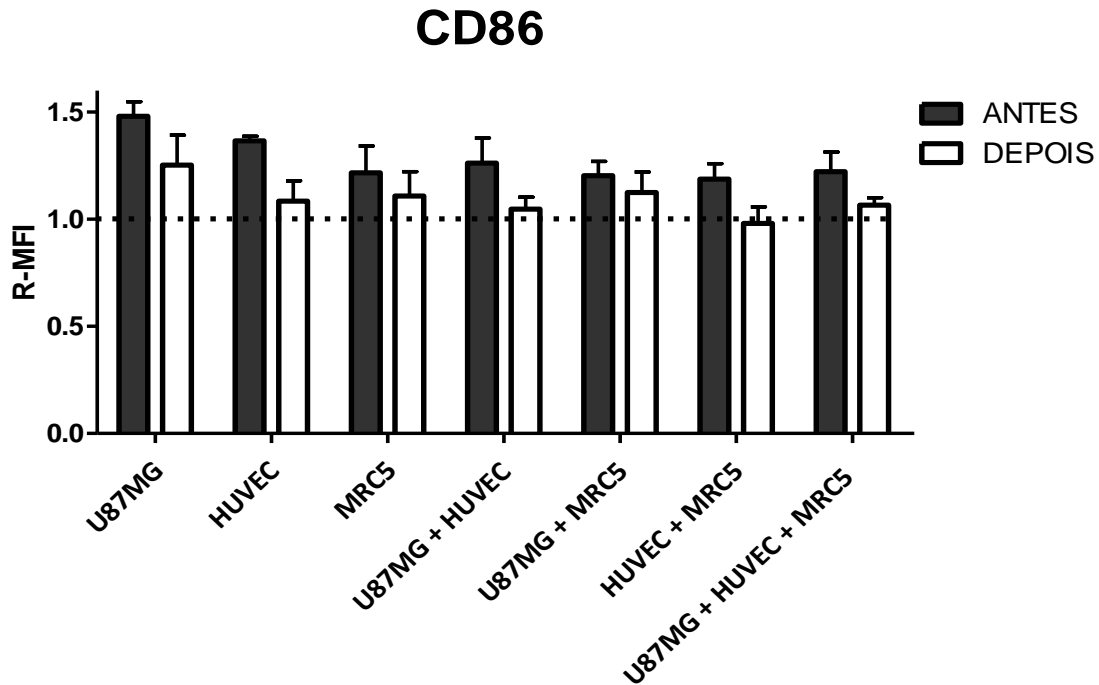
A expressão da molécula co-estimuladora CD83 não foi significativamente diferente em relação ao controle. Havendo, no entanto, uma tendência a serem os níveis desta molécula menores quando a adição do sobrenadante ocorreu antes da ativação com TNF- α e maiores depois desta. Porém, pequenas variações em relação as mo-DCs tratadas com o sobrenadante dos modelos homotípicos em relação aos heterotípicos foram observadas. Novamente, a presença de HUVEC nos esferóides heterotípicos diminuiu a expressão de CD83 (**Figura 22**).

Figura 22. Expressão do R-MFI de CD83 nas mo-DCs tratadas com meio condicionado. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Não obstante, se observou uma diminuição na expressão de CD83 nos grupos de esferoides heterotípicos que tinham HUVEC na sua composição. Em cinza o grupo de mo-DCs tratadas 24h antes do dia de ativação com TNF- α , e em branco, o grupo de mo-DCs tratadas 24h após o dia da ativação. As linhas pontilhadas indicam a expressão de CD83 do grupo controle (n=7)



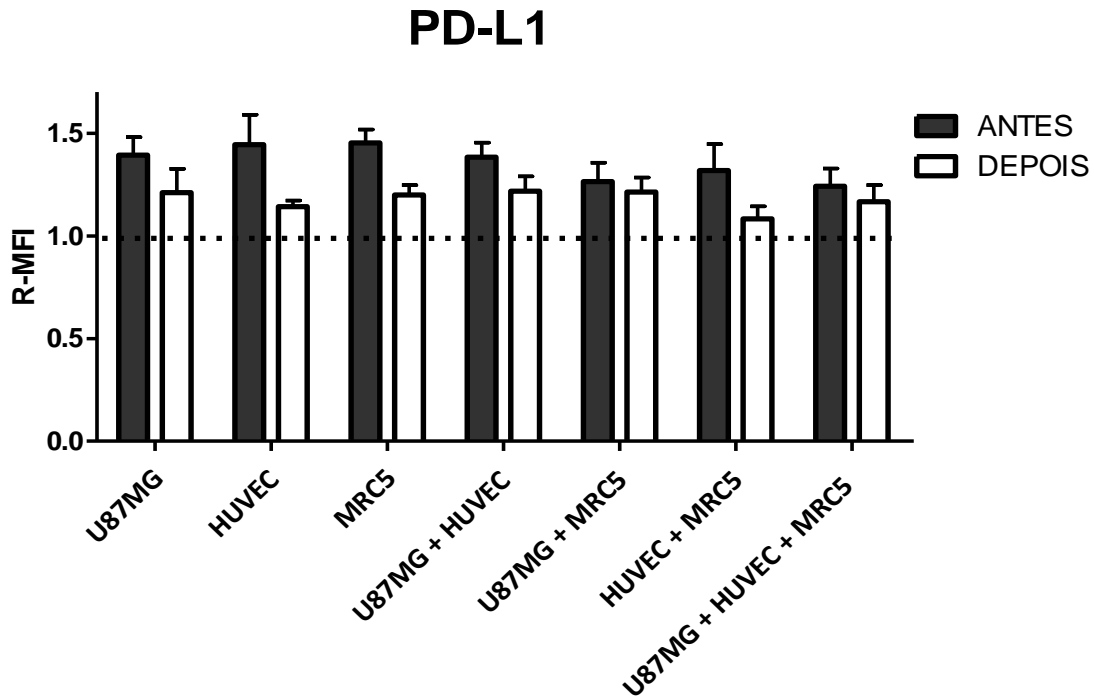
A expressão de CD86, em quase todos os grupos, foi maior que no controle, embora, mais uma vez, as diferenças não tenham atingido significância estatística. De modo geral, observou-se uma diminuição da expressão de CD86 nos grupos de mo-DCs tratadas antes do dia da ativação com TNF- α com o sobrenadante dos esferóides compostos por fibroblastos (MRC5). Nos grupos tratados após a ativação, os níveis de CD86 foram ainda menores. É interessante que, mais uma vez, um esferoide contendo células endoteliais (HUVEC + MRC5) foi aquele em que se observou o menor nível de expressão de mais uma molécula co-estimuladora pelas mo-DCs, o CD86 (**Figura 23**).

Figura 23. Expressão do R-MFI de CD86 nas mo-DCs tratadas com meio condicionado. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Não obstante, se observou uma diminuição na expressão de CD86 nos grupos tratados com sobrenadante de esferóides heterotípicos que tinham MRC5 na sua composição, ainda mais naquelas mo-DCs tratadas depois da ativação com o sobrenadante de HUVEC + MRC5, se observou uma diminuição da expressão de CD86 em relação ao controle porém não é estatisticamente significativo. Em cinza o grupo de mo-DCs tratadas 24h antes do dia de ativação com TNF- α , e em branco, o grupo de mo-DCs tratadas 24h após o dia da ativação. As linhas pontilhadas indicam a expressão de CD86 do grupo controle. (n=8)



No caso da expressão de PD-L1, da mesma forma que os marcadores anteriores, não houve diferenças significativas em relação ao controle, porém os valores foram maiores do que os do grupo controle. A máxima expressão foi obtida nas mo-DCs tratadas antes da ativação com o sobrenadante dos esferóides homotípicos da linhagem HUVEC. Chama a atenção que as mo-DCs tratadas antes da ativação com sobrenadante de esferóides que tinham na sua composição a linhagem U87MG, o nível de expressão de PD-L1 diminuía, não obstante, quando as mo-DCs foram tratadas depois da ativação com o sobrenadante dos mesmos esferóides, aqueles que tinham a U87MG na sua composição expressavam mais PD-L1 que aqueles que não tinham (**Figura 24**).

Figura 24. Expressão do R-MFI de PD-L1 nas mo-DCs tratadas com meio condicionado. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Não obstante, se observou uma diminuição na expressão de PD-L1 nos grupos tratados antes da ativação com sobrenadante de esferóides heterotípicos que tinham U87MG na sua composição, o fenômeno contrário foi observado no grupo tratado após ativação. Em cinza o grupo de mo-DCs tratadas 24h antes do dia de ativação com TNF- α , e em branco, o grupo de mo-DCs tratadas 24h após o dia da ativação. As linhas pontilhadas indicam a expressão de PD-L1 do grupo controle. (n=8)



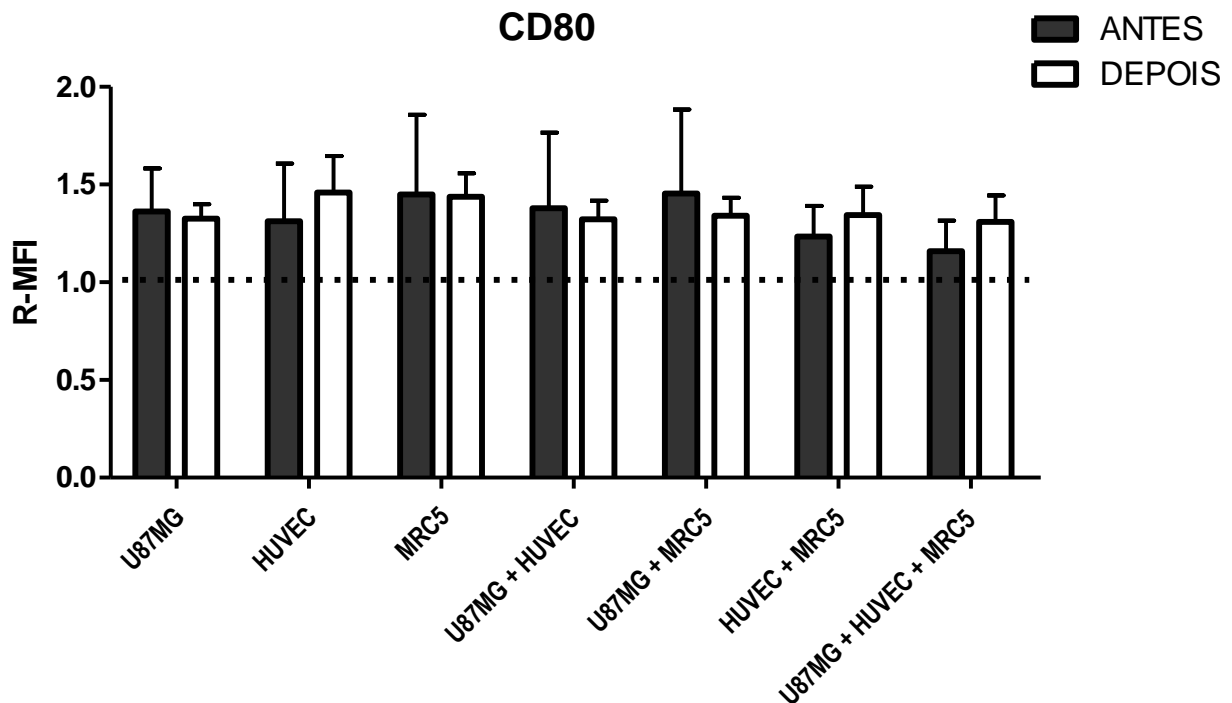
5.4.6. Efeito juxtácrino do microambiente tumoral sobre as mo-DCs

As mo-DCs cultivadas em contato direto com os esferóides foram avaliadas para os marcadores CD80, CD83, CD86 e PD-L1. Os esferóides foram adicionados 24h antes ou 24h depois da ativação.

A expressão de CD80 foi avaliada em todos os grupos experimentais, e não se encontraram diferenças significativas. Não obstante cabe destacar, que de igual modo ao efeito parácrino, a presença das células endoteliais na cultura das mo-DCs tratadas antes da ativação, produz uma diminuição nos níveis de CD80; mesmo assim, esses valores foram maiores em relação ao controle. Por outro lado, a expressão de CD80

diminuiu naqueles grupos de mo-DCs tratados após ativação na presença de células de glioblastoma U87MG, contudo, esses valores ainda foram maiores do que observados no grupo controle (**Figura 25**).

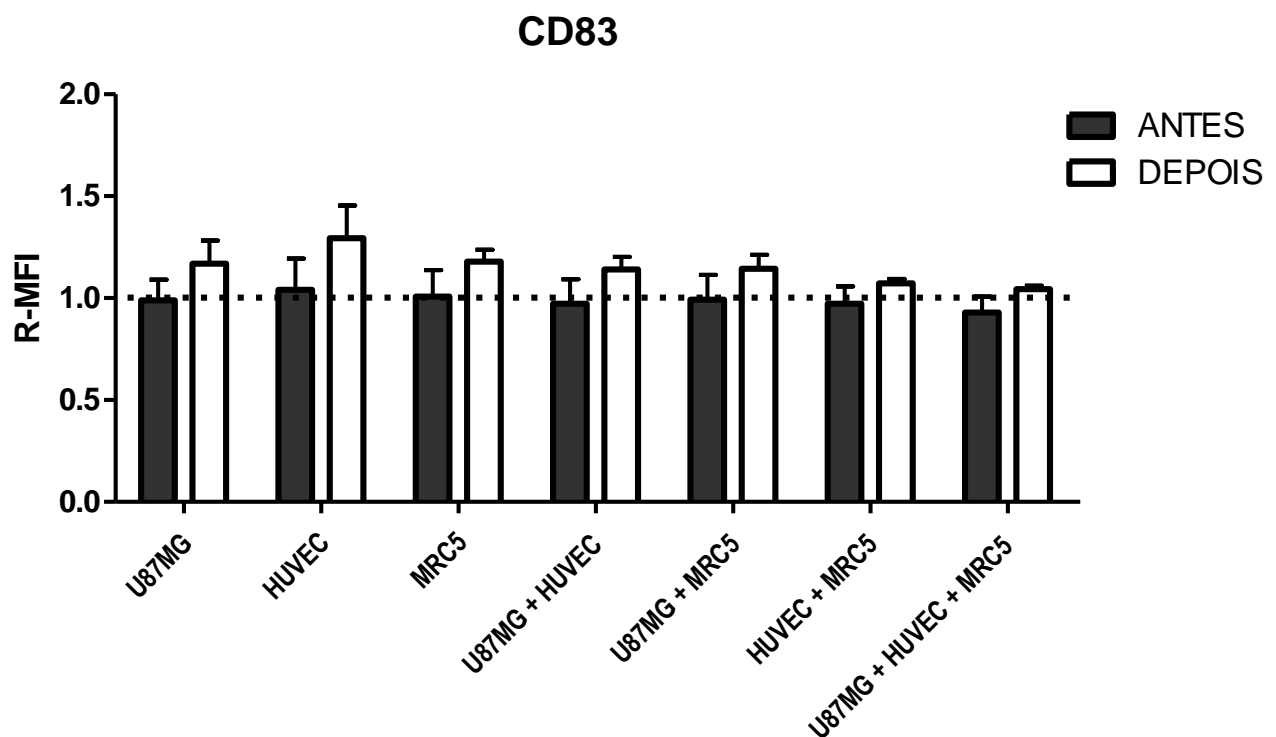
Figura 25. Expressão do R-MFI de CD80 nas mo-DCs cultivadas em contacto com os esferóides. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Não obstante, se observou uma diminuição na expressão de CD80 nos grupos cultivados em contato com os esferóides que tinham HUVEC ou MRC5 na sua composição, antes e depois da ativação respectivamente. Em cinza o grupo de mo-DCs postas em contato com esferóides 24h antes do dia de ativação com TNF- α , e em branco, o grupo de mo-DCs cultivadas em contato com esferóides 24h após o dia da ativação. As linhas pontilhadas indicam a expressão de CD80 do grupo controle. (n=4)



Quando foi avaliada a expressão de CD83 nas mo-DCs cultivadas em contato 24h antes da ativação com os esferóides que tinham a linhagem HUVEC na sua composição, à diferença daquelas que foram cultivadas na presença apenas do sobrenadante, observou-se uma diminuição dos níveis de expressão de CD83 que foi igual ou menor

que o controle; mais uma vez, todavia, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Por outro lado, as mo-DCs cultivadas em contato, após a ativação, com os esferóides heterotípicos que tinham HUVEC ou U87MG na sua composição, diminuíram a expressão de CD83 (**Figura 26**).

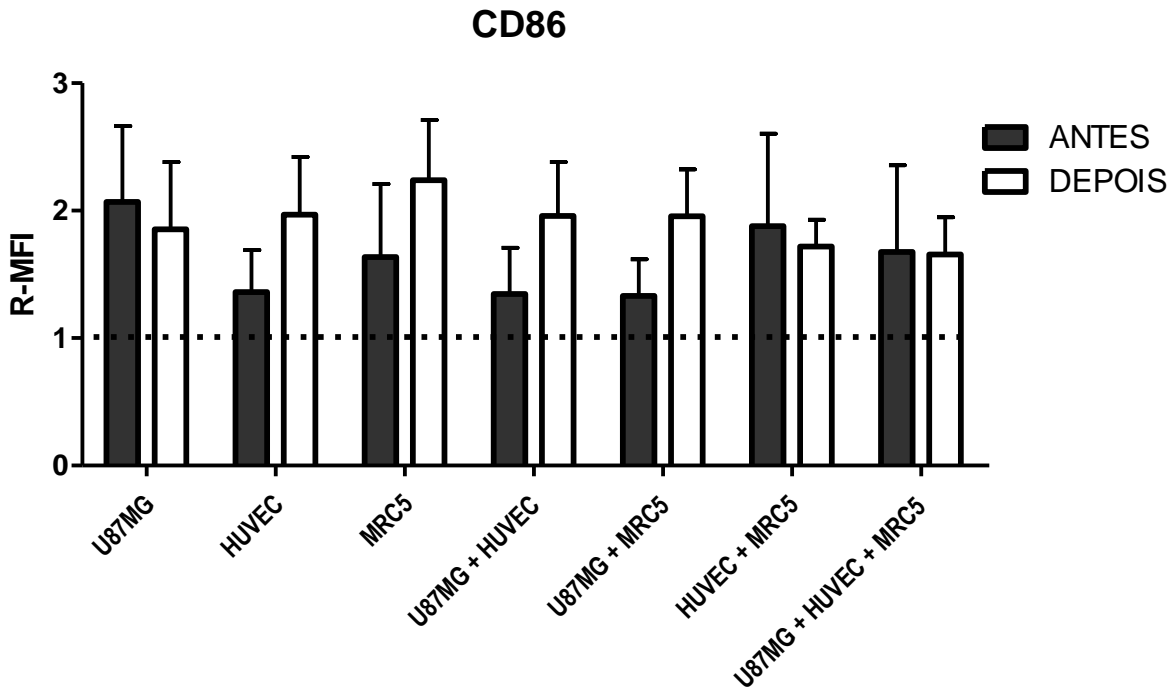
Figura 26. Expressão do R-MFI de CD83 nas mo-DCs nas mo-DCs cultivadas em contacto com os esferóides. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Não obstante, se observou uma diminuição na expressão de CD83 nos grupos cultivados em contato com os esferóides que tinham HUVEC ou U87MG na sua composição, antes e depois da ativação respectivamente. Em cinza o grupo de mo-DCs postas em contato com esferóides 24h antes do dia de ativação com TNF- α , e em branco, o grupo de mo-DCs cultivadas em contato com esferóides 24h após o dia da ativação. As linhas pontilhadas indicam a expressão de CD83 do grupo controle. (n=4)



As mo-DCs cultivadas em contato antes da ativação, com esferóides heterotípicos que tinham a linhagem U87MG na sua composição, apresentaram níveis de CD86 menores que o resto dos grupos, não obstante não atingindo significância estatística. Contrário ao fenômeno observado nas mo-DCs tratadas com o sobrenadante, os níveis de CD86 nas

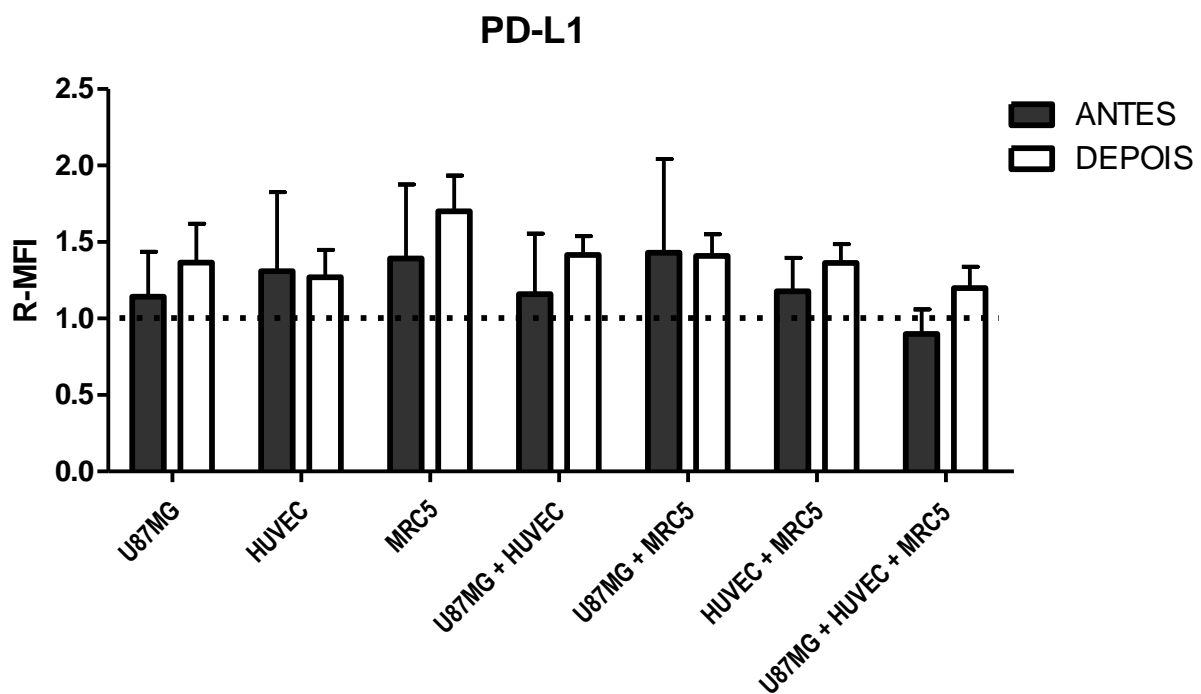
mo-DCs cultivadas, após ativação, em contato com os esferóides homotípicos constituídos por HUVEC ou MRC5, aumentaram (**Figura 27**).

Figura 27. Expressão do R-MFI de CD86 nas mo-DCs cultivadas em contacto com os esferóides. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Não obstante, se observou uma diminuição na expressão de CD86 nos grupos cultivados em contato com os esferóides que tinham U87MG na sua composição, antes e um aumento com HUVEC e MRC5, depois da ativação respectivamente. Em cinza o grupo de mo-DCs postas em contato com esferóides 24h antes do dia de ativação com TNF- α , e em branco, o grupo de mo-DCs cultivadas em contato com esferóides 24h após o dia da ativação. As linhas pontilhadas indicam a expressão de CD86 do grupo controle. (n=4)



Ao avaliar a expressão de PD-L1, observou-se fenômeno contrário ao acontecido nas mo-DCs tratadas com o sobrenadante. No grupo cultivado em contato, após ativação, com os esferóides que tinham MRC5 na sua composição, notou-se aumento na expressão de PD-L1. Pelo contrário, quando essas células foram cultivadas, antes da ativação, com os esferóides que tinham U87MG na sua composição ocorreu uma diminuição nos valores de PD-L1. Esses resultados, contudo, não representam diferenças estatisticamente significativas. (**Figura 28**).

Figura 28. Expressão do R-MFI de PD-L1 nas mo-DCs cultivadas em contacto com os esferóides. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Não obstante, se observou uma diminuição na expressão de PD-L1 nos grupos cultivados em contato com os esferóides que tinham U87MG na sua composição, antes e um aumento com MRC5, depois da ativação respectivamente. Em cinza o grupo de mo-DCs postas em contato com esferóides 24h antes do dia de ativação com TNF- α , e em branco, o grupo de mo-DCs cultivadas em contato com esferóides 24h após o dia da ativação. As linhas pontilhadas indicam a expressão de CD86 do grupo controle. (n=4)

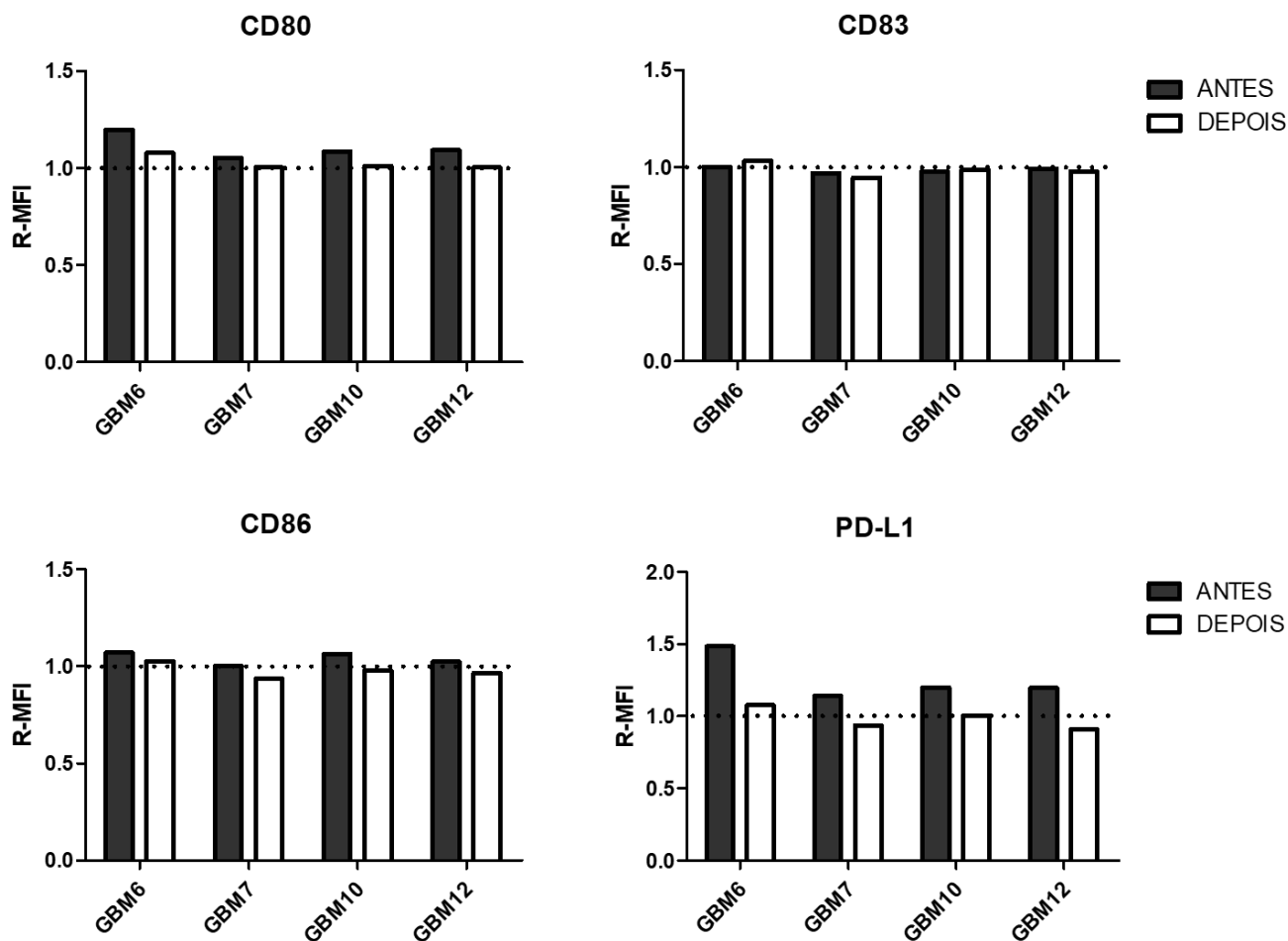


5.4.7. Efeito do microambiente tumoral gerado a partir de esferóides derivados de pacientes sobre mo-DCs.

mo-DCs de doadores saudáveis foram tratadas com o sobrenadante da cultura de esferóides tumorais derivados de pacientes segundo o item 4.4.2, mas, infelizmente, este experimento não pode ser repetido ainda. Entre os resultados obtidos (**Figura 29**), o que mais chama a atenção é a modificação da expressão de PD-L1 pelo contato das mo-DCs com os sobrenadantes. Quando adicionados antes do TNF- α , os sobrenadantes

levaram ao aumento da expressão de PD-L1, enquanto que, a adição do sobrenadante após a ativação, levou à diminuição de PD-L1 em relação ao controle.

Figura 29. Expressão do R-MFI das moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1 das mo-DCs tratadas com sobrenadante de esferóides tumorais derivados de pacientes. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Expressão de R-MFI de CD80, CD83, CD86 e PD-L1 em mo-DCs tratados com o sobrenadante de esferóides tumorais dos pacientes GBM6, GBM7, GBM10 e GBM12, 24h antes e depois do estímulo de ativação com TNF- α , n=1.



5.5. A capacidade linfoestimuladora das mo-DC é afetada pela exposição a diferentes ambientes

Foi avaliada a capacidade linfoestimuladora das mo-DCs de pacientes antes e depois da cirurgia e após primeira e segunda vacinação. Cada vez que um paciente era avaliado, se coletava sangue de um controle sadio.

Não se observaram diferenças significativas em relação aos controles. Não obstante, se observou que na maioria dos pacientes, antes da cirurgia a porcentagem de proliferação alógena de linfócitos CD4+ e CD8+ era menor em relação ao controle (**Figura 30A**). Após a cirurgia houve um aumento da proliferação de CD4+ e CD8+ em relação a seus respectivos controles (**Figura 30B**). Nos pacientes que receberam a primeira dose de vacinação se observou uma diminuição na proliferação de linfócitos CD4+ e um aumento da proliferação do CD8+ (**Figura 30C**). Após a segunda dose esta tendência se manteve para um dos pacientes (GBM2) (**Figura 30D e 31**).

Figura 30. Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs de pacientes. Gráficos representando a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4+ e CD8+ alógenos co-cultivados com as mo-DCs dos pacientes antes da cirurgia (A) e depois (B), depois da primeira dose de vacinação (C) e após a segunda dose de vacinação (D).

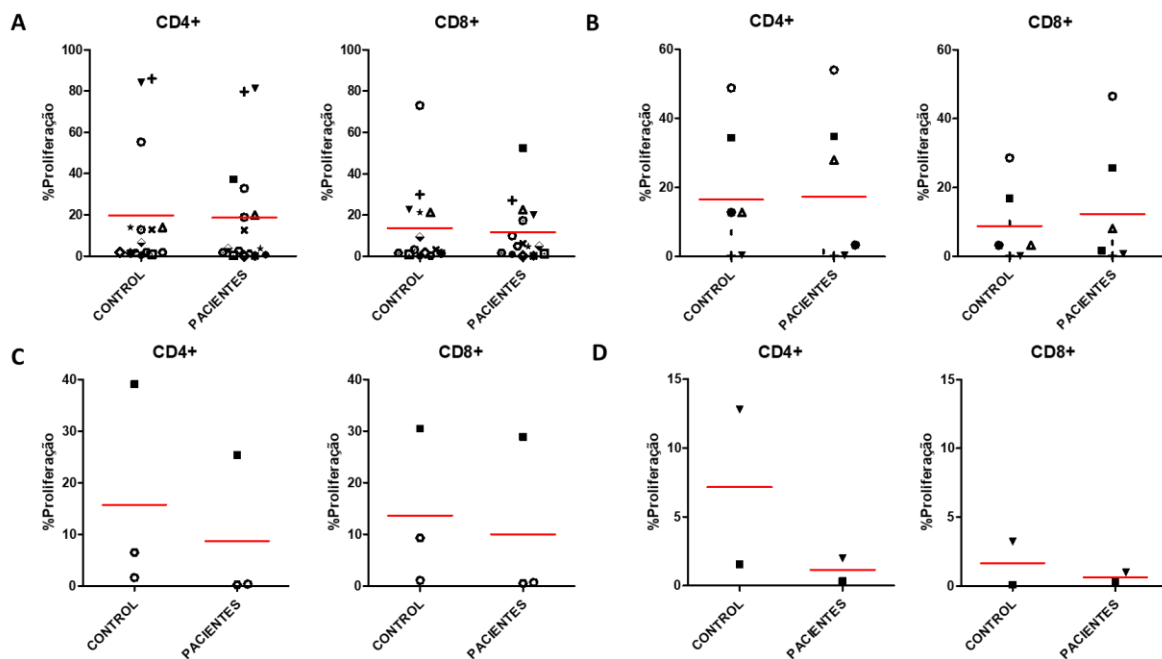
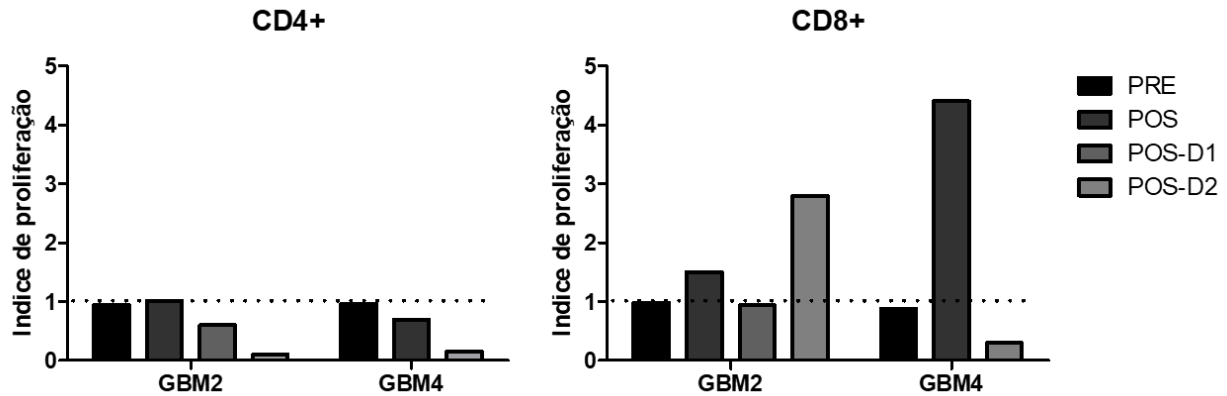


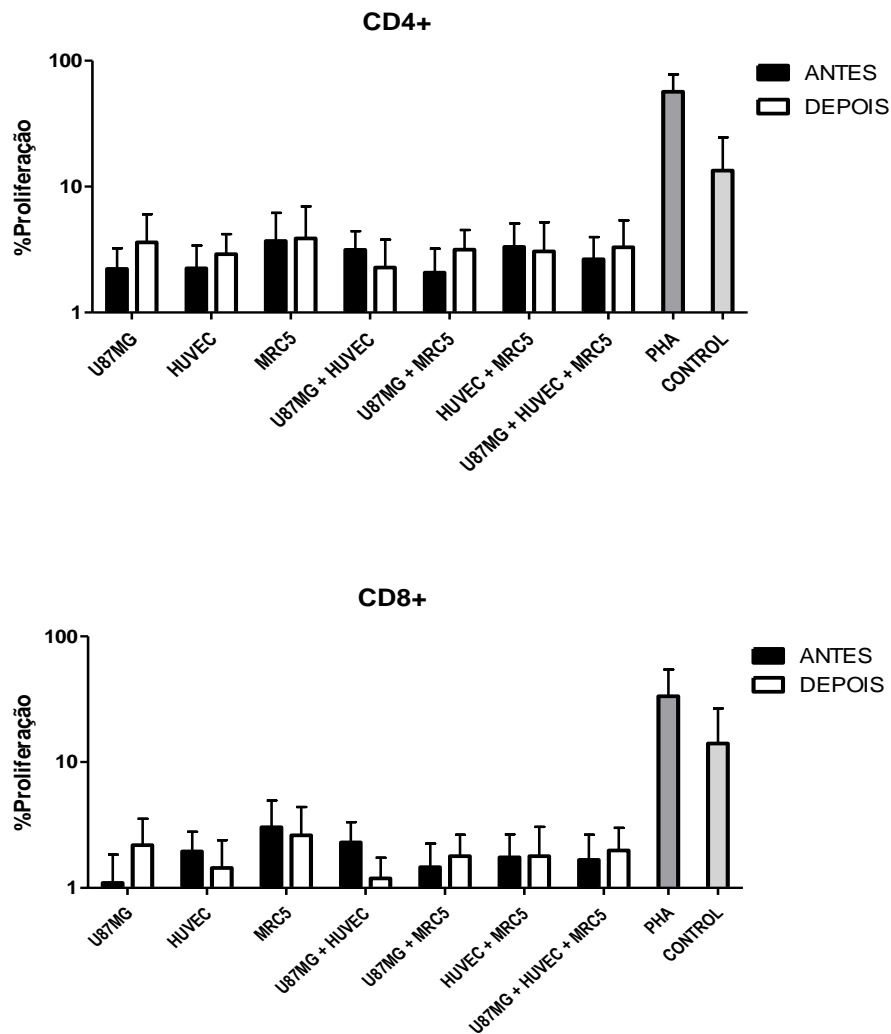
Figura 31. Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs de pacientes. Gráficos representando a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4+ e CD8+ alogeneicos co-cultivados com as mo-DCs dos pacientes GBM2 e GBM4 antes e depois da cirurgia e após primeira e segunda dose de vacinação. As linhas pontilhadas indicam o índice da proliferação do controle sadio em co-cultura com mo-DCs de doador saudável não relacionado.



As mo-DCs tratadas com o sobrenadante de nossos diferentes esferóides antes e depois do estímulo de ativação foram colocadas em co-cultura com linfócitos alogeneicos para avaliar sua capacidade de induzir proliferação. Se observou que, em relação ao controle, as mo-DCs tratadas eram ineficientes para induzir uma proliferação, em relação ao controle (mo-DCs sem tratamento).

Por outro lado, se observou que o fato destas mo-DCs serem cultivadas na presença de sobrenadante de esferóides que tinham U87MG ou HUVEC afetou ainda mais a capacidade destas células de induzir proliferação. É curioso notar que as mo-DCs que foram cultivadas na presença do sobrenadante de esferóides que tinham MRC5 na sua composição antes o depois do estímulo de ativação, conseguiram induzir uma proliferação maior de CD4+ e CD8+ em ambos grupos (**Figura 32**).

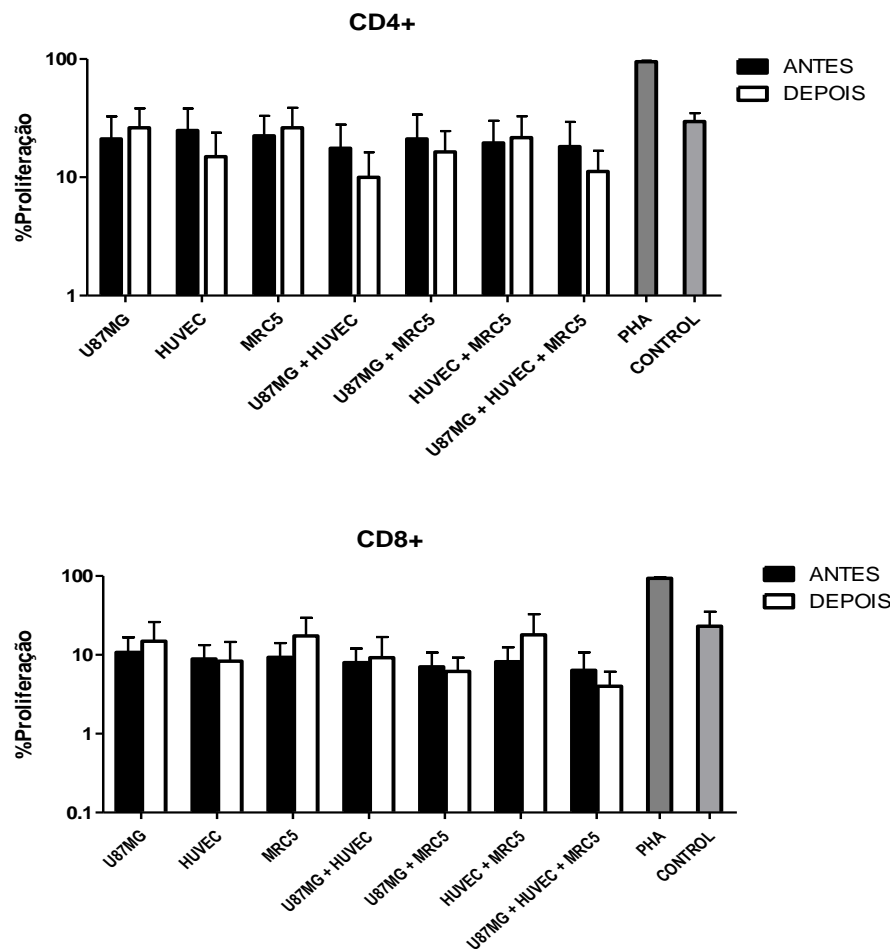
Figura 32. Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs tratadas com sobrenadante de esferóides. Gráficos representando a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4+ e CD8+ alógenos co-cultivados com as mo-DCs tratadas 24h antes e depois do estímulo de ativação com TNF- α , com o sobrenadante de esferóides homo ou heterotípicos. PHA: fitohemaglutinina, CONTROL: mo-DCs cultivadas apenas em R-10 + IL-4 + GM-CSF e ativadas com TNF- α . n=6.



Por outro lado, as mo-DCs colocadas em contacto com os esferóides antes e depois do dia de ativação, induziram uma maior proliferação de linfócitos alógenos CD4+ e CD8+ em relação as mo-DCs apenas tratadas com o sobrenadante dos esferóides. Uma vez mais, as mo-DCs que foram co-cultivadas na presença de esferóides que tinham na sua composição a linhagem MRC5, induziram uma maior linfoproliferação, porém,

quando o modelo de esferóides estava constituído por U87MG ou HUVEC, esta proliferação diminuía. Não obstante não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (**Figura 33**).

Figura 33. Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs co-cultivadas com esferóides. Gráficos representando a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4+ e CD8+ alogeneicos co-cultivados com as mo-DCs cultivadas 24h antes e depois do estímulo de ativação com TNF- α , com esferóides homo ou heterotípicos. PHA: fitohemaglutinina, CONTROL: mo-DCs cultivadas apenas em R-10 + IL-4 + GM-CSF e ativadas com TNF- α . n=6.



5.6. Linfócitos CD3+ alogênêicos apresentam baixo potencial citotóxico após encontro com mo-DCs expostas a esferóides.

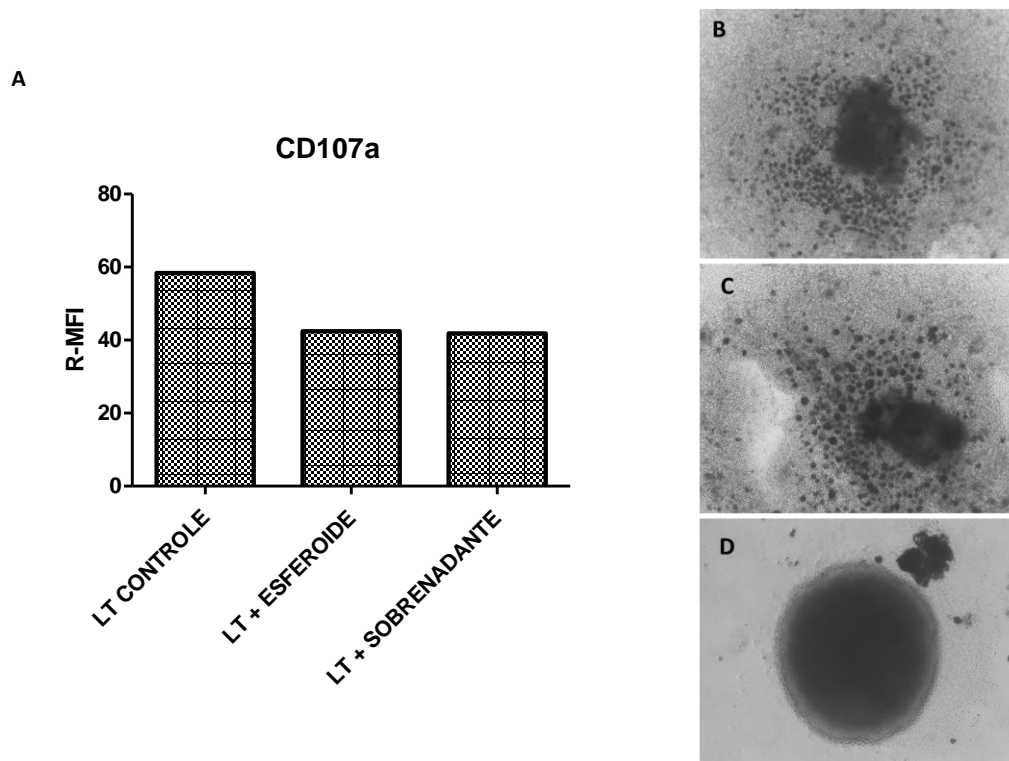
Linfócitos provenientes da co-cultura com mo-DCs tratadas em diferentes ambientes gerados pelos esferóides, foram colocados em co-cultura contra estes últimos. Após 24h,

foi avaliado o potencial citotóxico dos linfócitos, mediante a expressão do marcador de degranulação 107a.

Notou-se que os linfócitos que tinham sido co-cultivados com mo-DCs tratadas com o sobrenadante, apresentaram uma menor expressão de CD107a que aqueles que foram cultivados com mo-DCs co-cultivados com esferóides. Ambos valores, foram menores em relação ao controle, linfócitos que foram co-cultivados com mo-DCs sem nenhum tratamento (**Figura 34A**). Curiosamente ao observar os esferóides no microscópio, notou-se que nos poços onde linfócitos tinham sido co-cultivados com mo-DCs tratadas, os esferóides tinham perdido sua estrutura, observando-se pequenos grupos de células esparzidas (**Figura 34B-D**).

Embora, estes resultados complementem o observado nos ensaios previamente mencionados, precisa-se de mais repetições para se chegar a conclusões.

Figura 34. Avaliação do potencial citotóxico de linfócitos. Gráfico representando o R-MFI da expressão de CD107a em linfócitos após encontro com mo-DCs tratadas com esferóides tumorais ou na presença do sobrenadante destes últimos, n=1. LT: linfócito. (A). Microfotografias mostrando linfócitos procedentes da co-cultura com mo-DCs tratadas com sobrenadante de esferóides (B) ou em presença do esferoide (C), co-cultivados com o mesmo esferóide, e linfócitos procedentes da co-cultura com mo-DCs sem nenhum tratamento (D), n=1.



6. DISCUSSÃO

No presente estudo descreve-se o impacto do GBM sobre a função de células dendríticas derivadas de monócitos, utilizando-se diferentes modelos. Tais modelos procuraram constituir aproximações *in vitro* ao microambiente tumoral ou se buscou avaliar *ex vivo* as mo-DCs de pacientes com GBM, submetidos ou não à imunoterapia com células dendríticas.

Assim, foram elaborados 3 tipos de esferóides: homotípicos, heterotípicos e derivados de pacientes visando reconstruir *in vitro* o microambiente tumoral, incorporando linhagens tumorais estabelecidas que representem parte das populações características no tumor além das células cancerígenas (U87MG). Assim, células endoteliais (HUVEC) e de fibroblasto (MRC5) se usaram na construção dos esferóides. Modelos similares foram usados para mimetizar a complexidade do câncer pancreático (LAZZARI *et al.*, 2018) e câncer de mama (JAGANATHAN *et al.*, 2018), mostrando a importância desses modelos para o entendimento das interações no microambiente tumoral.

A metodologia usada no presente trabalho foi uma adaptação do *overlay liquid technique* (CARLSSON E JUHAS, 1984), embora essa técnica foi estabelecida há quase 50 anos atrás, hoje em dia representa uma das técnicas mais econômicas para a geração de esferóides. Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas técnicas para a elaboração de esferóides desde *hanging drop*, gravitação, rotação ou uso de placas não aderentes, todas estas técnicas requerem reagentes especiais ou uso de determinados equipamentos supondo um maior gasto econômico e de tempo. Pelo contrário, a metodologia padronizada e usada neste trabalho é econômica, rápida e com uma alta reprodutibilidade, características importantes na geração de esferóides.

Por outro lado, a manutenção das culturas primárias celulares sempre foi um desafio. Com cada passagem se perdem populações celulares devido à seleção constante que as células sofrem, produzindo alterações externas ou internas que afetam a viabilidade das células. Não obstante, as culturas primárias representam uma verdadeira ferramenta para avaliar de maneira mais precisa a resposta do paciente frente a um determinado tratamento, motivo pelo qual nos últimos anos tem sido a plataforma preferida dos pesquisadores. Neste trabalho conseguiu-se manter 16 culturas primárias de pacientes

com GBM e formar a partir de 4 delas esferóides tumorais, não obstante são poucos estudos que relatam o sucesso da geração de esferóides a partir de explantes (SONG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018). Portanto ainda é necessário a otimização destes protocolos quando se trate de células de cultura primária.

Uma vez estabelecidos nossos esferóides, nos perguntamos se havia alguma diferença em relação ao perfil de citocinas produzidas, portanto se avaliou a presença de mediadores solúveis inflamatórios nos sobrenadantes das culturas. De todas as citocinas testadas, se observou um incremento de IL-6 e IL-8 ao longo dos quatro dias nos esferóides heterotípicos e derivados de pacientes, e um aumento de IL-10 só no grupo de esferóides derivados de pacientes. Estes resultados concordam com a literatura, onde a alta expressão de IL-6 em amostras de tumor de pacientes com GBM e em linhagens de GBM como U87MG e U251, está relacionado com a proliferação tumoral e a angiogênese, e é, portanto, considerado um biomarcador de prognóstico ruim para GBM (GOSWAMI *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 2005). Por outro lado, o aumento da expressão do IL-6 no quarto dia de cultura pode estar relacionado ao aumento da hipóxia ao longo do tempo. Condições de estresse como o gerado pela hipóxia podem aumentar a expressão de IL-6 (HORI *et al.*, 1996) e este a sua vez promover autofagia, um mecanismo muito usado pelas células do GBM para escapar ao controle imunitário (XUE *et al.*, 2016). A expressão de IL-8 em células do glioma está relacionado com uma alta gliomagênese e um elevado índice de angiogênese (BRAT *et al.*, 2005). Em modelos *in vitro* de gliomas, IL-10 aumenta a proliferação e a capacidade migratória das células malignas (HUETTNER *et al.*, 1997), no entanto, a expressão de IL-10 em biopsias de pacientes com GBM se atribui à micróglia (WAGNER *et al.*, 1999), motivo pelo qual se observou a presença de esta citocina nos esferóides tumorais derivados de pacientes, já que estes apresentam na sua composição diferentes populações celulares que incluem micróglia.

Já a avaliação do infiltrado tumoral em amostras de pacientes, mostrou a presença de células CD45+, entre elas CD11b+ e CD11c+, os quais são marcadores comuns para micróglia/macrófago (HUSSAIN *et al.*, 2006; PARNEY *et al.*, 2009). A presença de tais células em resposta aos danos produzidos no microambiente presumivelmente implicaria

a secreção de citocinas pro-inflamatórias, não obstante, os sinais supressores produzidas na interação com outras populações presentes no microambiente induz a polarização das células para um perfil pro-tumorigênico e anti-inflamatório (ROESCH *et al.*, 2018). Entre outras populações imunes achadas no microambiente se encontraram células CD14+ e CD16+, marcadores para monócitos e neutrófilos respectivamente, ambas populações estão relacionadas com a progressão tumoral em glioblastoma (LIN *et al.*, 2008; MASSARA *et al.*, 2017). Monócitos isolados de pacientes com GBM e cultivados *in vitro* para ser diferenciadas em DCs mostraram baixa expressão de CD80 e CD86 e não foram capazes de induzir a proliferação de linfócitos autólogos (LIN *et al.*, 2008). Por outro lado, a presença de neutrófilos em gliomas se correlaciona a um aumento na produção de VEGF e da arginase I, ambas moléculas relacionadas a imunossupressão dos linfócitos T (MASSARA *et al.*, 2017; SIPPEL *et al.*, 2011).

Conhecendo, então o entorno não celular e celular do GBM, se busco avaliar primeiro o efeito sistêmico do GBM sobre as mo-DCs de pacientes antes e após tratamento imunoterápico e segundo se mo-DCs de doadores saudáveis tratadas com sobrenadante de culturas de esferóides ou colocadas em contato com esferóides podem ter alterações fenotípicas.

mo-DCs de pacientes foram obtidas a partir da diferenciação de monócitos de sangue periférica. Estas células foram cultivadas na presença de IL-4 e GM-CSF por sete dias e no quinto dia foram estimuladas com TNF- α , segundo o protocolo estabelecido por SALLUSTO e LANZAVECHIA (1994). Curiosamente ao avaliar a expressão de CD80 antes e após cirurgia notou-se um aumento em relação aos seus respectivos controles saudáveis, esta tendência a aumento se manteve ainda após duas doses de vacinação. A expressão de CD83 e CD86 não mostrou variações em relação aos controles ao longo do monitoramento. Estes resultados são contrários ao descrito na literatura para pacientes com leucemia mieloide crônica (BROWN *et al.*, 2014), mieloma múltiplo (WANG *et al.*, 2006) e câncer colorretal (ORSINI *et al.*, 2013) onde a expressão de CD80, CD83 e CD86 em mo-DCs está diminuída. Não obstante, nossos resultados concordam com os achados pelo grupo de RAPP e colaboradores (2006), onde a avaliação de 26 pacientes com GBM, mostraram um aumento na expressão de CD80 sem variações na

expressão de CD83 e CD86 em relação a doadores saudáveis. Por outro lado, a expressão de PD-L1 em pacientes após cirurgia e tratamento aumentou em relação aos controles saudáveis, uma vez mais, esses resultados são contrários ao esperado, pois a expressão aumentada de PD-L1 é considerada de prognóstico ruim, já que a interação com o receptor de morte programada 1 (PD-1) leva a linfócitos disfuncionais incapazes de manter uma resposta imune segundo o revisado pelo TANG e ZHENG (2018). Não obstante, o aumento da expressão de PD-L1 observada ao longo do tratamento num dos pacientes com GBM correlaciona-se com a regressão total do tumor após os primeiros 6 meses de tratamento. É interessante observar que ao analisar a capacidade linfoestimuladora das mo-DCs de este último paciente, encontrou-se que após as primeiras doses de vacinação houve um aumento na tendência na proliferação de linfócitos alogeneicos T CD8+ e uma diminuição na proliferação dos linfócitos T CD4+, tais resultados junto com o análise clínico (dados não mostrados) corroboram a eficácia da estratégia de imunoterapia contra o GBM, mesmo que se trate apenas de um paciente, considerando que um paciente com GBM tem uma mediana de sobrevida limitada a 12 meses aproximadamente após diagnóstico o qual pode ir diminuindo frente as recorrências, é surpreendente ver que após 6 meses de tratamento, os índices imunológicos se mostrem favoráveis.

Tendo observado o comportamento das mo-DCs de pacientes antes da cirurgia, nos perguntamos se mo-DCs “saudáveis” ao ser expostas a um ambiente similar ao tumoral podia ter as mesmas características das mo-DCs “doentes”. Assim mo-DCs de doadores saudáveis foram tratadas em dois pontos, antes e depois da ativação com TNF- α , com o objetivo de entender se a exposição ao microambiente antes da maturação ou depois de esta pode afetar a expressão de moléculas como CD80, CD83, CD86 e PD-L1.

Embora não houve diferenças significativas em relação ao grupo controle, encontrou-se interessantes fenômenos que precisam ser explicados. De modo geral, tanto as mo-DCs sometidas ao efeito parácrino como juxtácrino, apresentaram expressão de CD80, CD83, CD86 e PD-L1 muito similares as mo-DCs dos pacientes antes de serem operados. A exposição de mo-DCs ao sobrenadante de esferóides homotípicos e heterotípicos antes da ativação com TNF- α , induziu uma maior expressão de CD80, CD86 e PD-L1 em

relação ao controle, porém ao analisar a expressão entre os grupos experimentais, observou-se que a presença de HUVEC na composição dos esferóides diminuía a expressão do CD80, CD86 e aumentava a expressão de PD-L1, no entanto a presença de U87MG na composição dos esferóides diminuía a expressão de PD-L1. A expressão de CD83, considerado o marcador de maturação não sofreu nenhuma alteração na expressão em relação ao controle e entre os grupos tratados sob as mesmas condições. Sendo a HUVEC, uma linhagem de células endoteliais que produz VEGF, é provável que a diminuição observada entre os grupos se deva a um efeito desta molécula. Assim, estudos feitos com DCs diferenciadas a partir de células CD14+/CD34- de cordão umbilical e tratadas com VEGF, após estimulação com LPS, mostraram uma diminuição nos níveis de CD83, marcador de maturação nas DCs (MARTI *et al.*, 2005). Em contraste, estudos feitos por Takahashi e colaboradores (2004), mostraram que as DCs tratadas com VEGF e estimuladas com LPS apresentavam baixos níveis de CD80 e CD86, no entanto aquelas que foram tratadas com VEGF, mas estimuladas com um coquetel de citocinas pro-inflamatórias (TNF α , IL-6 e IL-1beta) não apresentaram baixos níveis de CD80 e CD86. Todos estes estudos mostram diferentes respostas das DCs frente ao VEGF, mas nenhuma delas reporta aumento nos níveis das moléculas co-estimuladoras das DCs, fenômeno observado em relação aos controles no presente trabalho. Porém, a expressão de VEGF nos pulmões de camundongos, induz ativação das DCs, o que se observa num aumento de CD80 e CD86, não obstante, estas DCs se encontram num estado intermédio (a julgar por a sua produção de quimioquinas), o que leva a explicar que estas poderiam estar relacionadas com uma resposta de tipo Th2, que em termos de eficiência frente ao câncer não seria a melhor resposta (CHAPOVAL *et al.*, 2009). Embora estes resultados sejam parecidos aos obtidos no presente estudo, trata-se aqui de contextos distintos que acontecem em diferentes órgãos (pulmão e cérebro), mas que podem ajudar muito se os mecanismos que fundamentam tais respostas forem estudados a profundidade. Se bem a secreção de IL-6 por parte de células de glioma e linhagens de GBM induzem o incremento da expressão de PD-L1 nas populações mieloides (LAMANO *et al.*, 2019), este fenômeno pode-se ver alterado dependendo do estado fisiológico em que a célula se encontra ao momento da interação com os componentes secretados pelas células tumorais. Assim, em mo-DCs tratadas

após o estímulo com TNF- α , observou-se uma vez mais, um aumento na expressão de CD80, CD83, CD86 e PD-L1 em relação ao controle, não obstante também se registraram pequenas diferenças entre os grupos. Houve uma diminuição de CD80 e CD86 nas mo-DCs tratadas com sobrenadante proveniente de esferóides constituídos por HUVEC, notou-se também que em relação ao grupo tratado antes da ativação, houve um aumento de CD83 e uma diminuição de PD-L1, porém dentro dos grupos de mo-DCs tratadas com o sobrenadante de esferóides que apresentavam U87MG na sua composição observou-se uma maior expressão de esta molécula. Desta forma, ressalta-se a importância do estudo de mecanismos que sob certas condições e interações temporais e espaciais determinam respostas diferentes.

Se sabe que no TEM, além das citocinas, a comunicação direta entre as diferentes populações celulares pode levar a um prognóstico ruim ou bom (BURGETT *et al.*, 2016; METTANG *et al.*, 2018). Assim ao avaliar as mo-DCs co-cultivadas com esferóides heterotípicos ou homotípicos, se observaram algumas diferenças importantes entre os grupos tratados. Notou-se um aumento de CD80, CD83, CD86 e PD-L1 nas mo-DCs co-cultivadas com os esferóides homotípicos após ativação, embora essas diferenças não foram estatisticamente significativas, a expressão de todos esses marcadores foi maior em relação ao controle. Cabe destacar, que uma vez mas a presença de HUVEC na cultura diminuiu a expressão de CD80 e CD86, não obstante quando as mo-DCs foram co-cultivadas antes da ativação com o esferóide conformado pelas três linhagens o valor de PD-L1 diminui em relação ao controle. De fato é difícil discernir quais dos componentes em nossos modelos tridimensionais teve um efeito estimulador ou supressor, se bem a constante da presença de HUVEC correlaciona-se com a diminuição da expressão das moléculas co-estimuladoras, não é claro como a interação com outras linhagens pode levar ao aumento da expressão das mesmas moléculas, ou como a presença de células cancerígenas de glioblastoma podem aumentar a expressão de PD-L1 mas quando estão em contato com outras células como fibroblastos diminuem a expressão da mesma molécula. Não obstante, estes resultados dão uma visão geral da forma em como as interações entre as diferentes populações presentes no microambiente tumoral podem modelar o fenótipo das células afetando provavelmente sua funcionalidade.

Mesmo assim, nossas mo-DCs tratadas com os esferóides apresentem uma maior expressão de moléculas co-estimuladoras, é necessário saber se a capacidade funcional para estimular a proliferação de linfócitos alogeneicos se encontra alterada ou não. Assim, se observou que as mo-DCs tratadas em presença do sobrenadante dos esferóides foram ineficientes para estimular a linfoproliferação, apesar de estas células apresentarem maior expressão de moléculas co-estimuladoras, a porcentagem de proliferação foi menor que o controle. Por outro lado, as mo-DCs co-cultivadas com os esferóides tiveram uma porcentagem de proliferação quase igual ao do controle. Portanto, parece ser que o contato indireto mediado por citocinas presentes no sobrenadante afetam a funcionalidade das células, no entanto o encontro direto com as populações presentes no microambiente e a comunicação entre elas pode fornecer um estímulo suficientemente forte para a ativação das mo-DCs. Consequentemente, estas células já “aptas” possam cumprir sua função de APC de forma eficiente com os linfócitos, sendo o papel de estes últimos, a resposta imune específica.

Após a co-cultura das mo-DCs com os linfócitos, estes últimos foram co-cultivados novamente com os esferóides que tinham sido usados para o tratamento das mo-DCs. Surpreendentemente após 24h os esferóides foram desfeitos, tanto no grupo de linfócitos co-cultivados com mo-DCs tratadas com o sobrenadante como as que estiveram em contacto com o esferóide. Ora, a destruição do esferóide pode implicar que houve um efeito “citotóxico”, que conseguiu romper a arquitetura elaborada do esferóide atacando principalmente as células na periferia ou simplesmente a presença de linfócitos no ambiente levou a uma migração das células presentes nos esferóides destruindo-se o esferóide. Tendo em consideração que os linfócitos procediam de uma co-cultura com mo-DCs “maduros” poderia se considerar a primeira explicação, porém, o estado pseudo ativo das mo-DCs, evidenciado na falta de capacidade para estimular a proliferação, poderia nos explicar a segunda resposta. Visto que estes resultados foram apenas obtidos uma vez, é preciso fazer mais réplicas para ter uma conclusão definitiva.

Finalmente, se bem os diferentes fenômenos observados aqui entre a interação entre o TME e o sistema imune *in vivo* e *in vitro* levanta muitas dúvidas mas que dissipa-las, nos deixa com a vontade de seguir na procura do porque de tais fenômenos.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- Os esferóides tumorais podem ser formados a partir de linhagens celulares estabelecidas ou células derivadas de pacientes num período de 4 dias mediante a metodologia padronizada;
- Os esferóides heterotípicos e derivados de células de pacientes produzem quantidades altas de IL-6;
- Os esferóides heterotípicos e derivadas de células de pacientes assemelham-se ao TME em GBM;
- O infiltrado leucocitário em GBM, é regido principalmente por células de origem mieloide;
- As mo-DCs de pacientes com GBM, antes e após cirurgia apresentam um fenótipo “maduro” com diminuição de expressão de PD-L1, correlacionado com sua capacidade para induzir proliferação de linfócitos alogeneicos;
- As mo-DCs de pacientes com GBM vacinados com 2 doses apresentam um fenótipo “maduro” com aumento de expressão de PD-L1, correlacionado com sua capacidade para induzir proliferação de linfócitos alogeneicos;
- As mo-DCs de doadores saudáveis, expostos aos mediadores solúveis produzidos pelos esferóides ou em contato com os próprios, apresentaram um fenótipo pseudo “maduro” mesmo quando a exposição foi feita antes ou depois de dar o estímulo de maturação, correlacionado com a incapacidade para induzir a linfoproliferação alogênica;
- As mo-DCs de doadores saudáveis, sob a influência do TME (mediadores solúveis + células) *in vitro*, uma vez ativadas aumentam a expressão de PD-L1;
- Os esferóides constituem plataformas para avaliar os efeitos dos linfócitos ou outras populações imunes na progressão a regressão da doença.

REFERENCIAS

- AALAMIAN M, PIRTSKHALAISHVILI G, NUNEZ A, ESCHE C, SHURIN G, HULAND E, et al.** (2001). Human prostate cancer regulates generation and maturation of monocyte-derived dendritic cells. *Prostate*, 46(1):68-75.
- AGNER, S. W., ZUB, S. C., REIF, M. G., INCE, G. H. V, & NICOLE, S. U.** MICROGLIAL / MACROPHAGE EXPRESSION OF INTERLEUKIN 10. (2016). *Int J Cancer*, 82, 12–16
- AMEZQUITA, R. A., & KAECH, S. M.** (2017) Immunology: The chronicles of T-cell exhaustion. *Nature*, 543(7644), 190–191.
- AVIGAN D, VASIR B, GEORGE D, OH W, ATKINS M, MCDERMOTT D, et al.** (2007) Phase I/II Study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma ;30(7):749-61.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y.-J., PALUCKA, K.** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18, 767–811.
- BARBUTO J, ENSINA L, NEVES A, BERGAMI P, LEITE K, MARGUES R, et al.** (2004). Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.*, 53(12):1111-8,
- BARBUTO J.** (2013). Are dysfunctional monocyte-derived dendritic cells in cancer an explanation for cancer vaccine failures?. *Immunotherapy*, 5(2):105-7
- BENVENUTI, F., LAGAUDRIERE-GESBERT, C., GRANDJEAN, I., JANCIC, C., HIVROZ, C., TRAUTMANN, A., AMIGORENA, S.** (2004). Dendritic Cell Maturation Controls Adhesion, Synapse Formation, and the Duration of the Interactions with Naive T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 172(1), 292–301.
- BRAT, D. J.** (2005).The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncology*, 7(2), 122–133.
- BROWN R, POPE B, MURRAY A, ESDALE W, SZE D, GIBSON J, et al.** (2001). Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*;98(10):2992-8.
- BROWN, S., HUTCHINSON, C. V, DEA, M. A., WHETTON, A. D., SUZANNE, M., REES-UNWIN, K., & BURTHEM, J.** (2014). Monocyte-derived dendritic cells from chronic myeloid leukaemia have abnormal maturation and cytoskeletal function that is associated with defective localisation and signalling by normal ABL1 protein. *European Journal of Haematology*, 93(5), 96–102.
- BURGETT, M. E., LATHIA, J. D., ROTH, P., NOWACKI, A. S., DENI, S., PUGACHEVA, E., GLADSON, C. L.**(2016). Direct contact with perivascular tumor cells enhances

integrin α v β 3 signaling and migration of endothelial cells. *Oncotarget*, 7(28), 43852–43867.

CARLSSON, J., & YUHAS, J. M. (1984). Liquid-Overlay Culture of Cellular Spheroids. *Recent Results in Cancer Research*, 95, 1–23.

CATHELIN D, NICOLAS A, BOUCHOT A, FRASZCZAK J, LABBE J, BONNOTTE B. (2011). Dendritic cell-tumor cell hybrids and immunotherapy: what's next? *Cytotherapy*, 13(7):774-85.

CBTRUS. (2018). Central Brain Tumor Registry of the United States. CBTRUS Statistical report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States.

CHAN, H. F., ZHANG, Y., HO, Y. P., CHIU, Y. L., JUNG, Y., & LEONG, K. W. (2013). Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment. *Scientific Reports*, 3, 1–8.

CHANG, C. Y., LI, M. C., LIAO, S. L., HUANG, Y. L., SHEN, C. C., & PAN, H. C. (2005). Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*, 12(8), 931–934.

CHAPOVAL, S. P., LEE, C. G., TANG, C., KEEGAN, A. D., BOTTOMLY, K., & ELIAS, J. A. (2009). Lung vascular endothelial growth factor expression induces local myeloid dendritic cell activation. *Clin Immunol.*, 132(3), 371–384.

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 Immunol Immunotherapy*, 2014.

CLAVREUL, A., GUETTE, C., FAGUER, R., BOISSARD, A., LEMAIRE, L., ROUSSEAU, A., MENEI, P. (2014). Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *Journal of Pathology*, 233(February), 74–88.

COSTA, E. C., GASPAR, V. M., COUTINHO, P., & CORREIA, I. J. (2014). Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(8), 1672–1685.

COSTA, E. C., MOREIRA, A. F., DE MELO-DIOGO, D., GASPAR, V. M., CARVALHO, M. P., & CORREIA, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1427–1441.

DANGLES, V., VALIDIRE, P., WERTHEIMER, M., RICHON, S., BOVIN, C., ZELISZEWSKI, D., BELLET, D. (2002). Impact of human bladder cancer cell architecture on autologous T-lymphocyte activation. *International Journal of Cancer*, 98(1), 51–56.

DAVIS, M. E. (2016). HHS Public Access. *Clin J Oncol Nurs*, 20(5), 1–14. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8.Glioblastoma>

DHODAPKAR, M. V. (2008). Crosspresentation and Loading of Tumor Antigens for Dendritic Cell Vaccination against Cancer. In *Handbook of Dendritic Cells* (eds M. B. Lutz, N. Romani and A. Steinkasserer).

DIDENKO, V. V, NGO, H. N., MINCHEW, C., & BASKIN, D. S. (2002). Apoptosis of T lymphocytes invading glioblastomas multiforme: a possible tumor defense mechanism. *Journal of Neurosurgery*, 96(3), 580–584.

ELIA, A. R., CAPPELLO, P., PUPPO, M., FRAONE, T., VANNI, C., EVA, A., GIOVARELLI, M. (2008). Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(6), 1472–1482.

ERKAU, S. K., IECKMANN, P. R., AGNER, S. W., ZUB, S. C., REIF, M. G., INCE, G. H.V, & NICOLE, S. U. (1999). MICROGLIAL / MACROPHAGE EXPRESSION OF INTERLEUKIN 10 IN HUMAN GLIOBLASTOMAS. *Int J Cancer*, 16(January), 12–16.

FABRE, J. W. (2001). The allogeneic response and tumor immunity. *Nature Medicine*, 7(6), 649–652.

FENG, X., SZULZEWSKY, F., YEREVANIAN, A., CHEN, Z., HEINZMANN, D., RASMUSSEN, R. D., HAMBARDZUMYAN, D. (2015). Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget*, 6(17), 15077–15094.

GARNIER, D., RENOULT, O., PARIS, F., & CORBET, C. (2019). Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target. *Frontiers in Oncology*, 9(March), 1–18.

GONG J, CHEN L, CHEN D, KASHIWABA M, MANOME Y, TANAKA T, et al. Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells. *Gene Ther.* 1997;4(10):1023-8.

GOSWAMI, S., GUPTA, A., & SHARMA, S. K. (1998). Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *Journal of Neurochemistry*, 71(5), 1837–1845. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9798907>

GUERMONPREZ, P., VALLADEAU, J., ZITVOGEL, L., THÉRY, C., & AMIGORENA, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 621–667.

HAMBARZUMYAN, D., & BERGERS, G. (2015). Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends in Cancer*.

HANAHAH, D., & COUSSENS, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322.

HAO, C., PARNEY, I. F., ROA, W. H., TURNER, J., PETRUK, K. C., & RAMSAY, D. A. (2002). Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: Evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation. *Acta Neuropathologica*, 103(2), 171–178.

HEIMBERGER, A. B., ABOU-GHAZAL, M., REINA-ORTIZ, C., YANG, D. S., SUN, W., QIAO, W., FULLER, G. N. (2008). Incidence and Prognostic Impact of FoxP3+ Regulatory T Cells in Human Gliomas. *Clinical Cancer Research*, 14(16), 5166–5172.

HORI, O., MATSUMOTO, M., KUWABARA, K., MAEDA, Y., UEDA, H., OHTSUKI, T., KAMADA, T. (1996). Exposure of astrocytes to hypoxia/reoxygenation enhances expression of glucose-regulated protein 78 facilitating astrocyte release of the neuroprotective cytokine interleukin 6. *Journal of Neurochemistry*, 66(3), 973–979.

HUETTNER, C., CZUB, S., KERKAU, S., ROGGENDORF, W., AND TONN, J.C. (1997) Interleukin 10 is expressed in human gliomas *in vivo* and increases glioma cell proliferation and motility *in vitro*. *Anticancer Res.*, 17, 3217–3224.

HUSSAIN, S. F., YANG, D., SUKI, D., ALDAPE, K., GRIMM, E., & HEIMBERGER, A. B. (2006). The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses 1. *Neuro-Oncology*, 2006, 261–279.

IACOB, G., & DINCA, E. B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of Medicine and Life*, 2(4), 386–393.

INCA. Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva, 201.

ITANO, N., ZHUO, L., & KIMATA, K. (2008). Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. *Cancer Sci*, 99, 1720–1725.

JAGANATHAN, H., GAGE, J., LEONARD, F., SRINIVASAN, S., SOUZA, G. R., DAVE, B., & GODIN, B. (2014). Three-Dimensional In Vitro Co-Culture Levitation. *Scientific Reports*, 4, 1–9.

JOFFRE, O., SEGURA, E., SAVINA, A., & AMIGORENA, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev Immunol*, 12(8), 557;569.

JUNG, S., UNUTMAZ, D., WONG, P., SANO, G. I., DE LOS SANTOS, K., SPARWASSER, T., ... LANG, R. A. (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells

abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*, 17(2), 211–220.

KATSENELSON N, SHURIN G, BYKOVSKAIA S, SHOGAN J, SHURIN M. (2001) Human Small Cell Lung Carcinoma and Carcinoid Tumor Regulate Dendritic Cell Maturation and Function. *Mod Pathol.* ;14(1):40-5.

KESARI, S. (2011). Understanding glioblastoma tumor biology: The potential to improve current diagnosis and treatments. *Seminars in Oncology*, 38(SUPPL. 4), S2–S10.

KIM, Y., & KUMAR, S. (2015). CD44-mediated Adhesion to Hyaluronic Acid Contributes to Mechanosensing and Invasive Motility. *Mol Cancer Res*, 12(10), 1416–1429. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0629>.CD44-mediated

KIMELBERG, H. K. (2004). The Role of Hypotheses in Current Research , Illustrated by Hypotheses on the Possible Role of Astrocytes in Energy Metabolism and Cerebral Blood Flow : From Newton to Now. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24, 1235–1239. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000138668.10058.8C>

KOHANBASH, G., & OKADA, H. (2012). Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSCs) in gliomas and glioma-development. *Immunological Investigations*, 41(6–7), 658–679.

KOVRT H, TUMEH P, BENSON D, BHARDWAJ N, BRODY J, FORMENTI S, et al. Immunodynamics: a cancer immunotherapy trials network review of immune monitoring in immuno-oncology clinical trials. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2016;4(15):1-16.

KUMAR, R., KAMDAR, D., MADDEN, L., HILLS, C., CROOKS, D., O'BRIEN, D., & GREENMAN, J. (2006). Th1/Th2 cytokine imbalance in meningioma, anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme patients. *Oncology Reports*, 15(6), 1513–1516.

LAKOMY C, BUDINSKY A, WOLFRAM R, HELLAN M, WILTSCHIKE C, BRODOWICZ T, et al. (2006). Deficiencies in phenotype expression and function of dendritic cells from patients with early breast cancer. *Eur J Med Res.*;11:7-12.

LAMANO J, WINWARD C., VELICEASA D, DIDOMENICO J, OYON D, AND BLOCH O. (2017). Glioblastoma-derived IL-6 induces immunosuppressive peripheral myeloid cell PD-L1 expression and tumor progression. *Neuro Oncology*. vi120.

LAZZARI, G., NICOLAS, V., MATSUSAKI, M., AKASHI, M., COUVREUR, P., & MURA, S. (2018). Multicellular spheroid based on a triple co-culture : a novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. *Acta Biomaterialia*.

LEE, P. P., YEE, C., SAVAGE, P. A., FONG, L., BROCKSTEDT, D., WEBER, J. S., ... DAVIS, M. M. (1999). Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature Medicine*, 5(6), 677–685.

LEWIS, K., & REIZIS, B. (2012). Dendritic Cells : Arbiters of Immunity and Immunological Tolerance. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007401>

LIANG, H., YI, L., WANG, X., ZHOU, C., & XU, L. (2014). 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*, 80(2), 144–150.

LIAU, L. M., ASHKAN, K., TRAN, D. D., CAMPIAN, J. L., TRUSHEIM, J. E., COBBS, C. S., SCHULDER, M. (2018). First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Translational Medicine*, (June), 1–9. ht

LOUIS, D. N., PERRY, A., REIFENBERGER, G., VON DEIMLING, A., FIGARELLA-BRANGER, D., CAVENEE, W. K., ELLISON, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.

MA Y, SHURIN G, PEIYUAN Z, SHURIN M. Dendritic Cells in the Cancer Microenvironment. *J Cancer*. 2013;4(1):36-44.

MAPARA, M. Y., & SYKES, M. (2004). Tolerance and cancer: Mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of Clinical Oncology*, 22(6), 1136–1151.

MARSLAND, B. J., BÄTTIG, P., BAUER, M., RUEDL, C., LÄSSING, U., BEERLI, R. R., BACHMANN, M. F. (2005). CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity*, 22(4), 493–505.

MARTI, L., & MOREIRA-FILHO, C. A. (2005). Vascular endothelial growth factor inhibits dendritic cell maturation O fator de crescimento endotelial vascular inibe o processo Vascular endothelial growth factor inhibits dendritic cell maturation O fator de crescimento endotelial vascular inibe o. *Einstein*, (May).

MASSARA, M., PERSICO, P., BONAVITA, O., MOLLICA, V., LOCATI, M., SIMONELLI, M., & BONECCHI, R. (2017). Neutrophils in Gliomas. *Frontiers in Immunology*, 8(October), 1–7.

MCDONNELL, A. M., ROBINSON, B. W. S., & CURRIE, A. J. (2010). Tumor antigen cross-presentation and the dendritic cell: Where it all begins? *Clinical and Developmental Immunology*, 2010.

MELLMAN, I., & STEINMAN, R. M. (2001). Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3), 255–258.

METTANG, M., MEYER-PANNWITT, V., KARPEL-MASSLER, G., ZHOU, S., DAHLHAUS, M., SIEGELI, M. D., WESTHOFF, M. (2018). Blocking distinct interactions

between Glioblastoma cells and their tissue microenvironment : A novel multi-targeted therapeutic approach. *Scientific*, 8(November 2017), 1–14.

MINCHINTON, A. I., & TANNOCK, I. F. (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*, 6(8), 583–592.

MONTEIRO, A. R., & HILL, R. (2017). The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *MDPI*, 6, 2–24.

OCHSENBEIN, A. F., KLENERMAN, P., KARRER, U., LUDEWIG, B., PERICIN, M., HENGARTNER, H., & ZINKERNAGEL, R. M. (1999). Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 2233–2238.

OGINO, T., ONISHI, H., SUZUKI, H., MORISAKI, T., TANAKA, M., & KATANO, M. (2012). Inclusive estimation of complex antigen presentation functions of monocyte-derived dendritic cells differentiated under normoxia and hypoxia conditions. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(3), 409–424.

ONISHI H, MORISAKI T, BABA E, KUGA H, KUROKI H, MATSUMOTO K, et al. Dysfunctional and short-lived subsets in monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer. *Clin Immunol*. 2002;105(3):286-95.

ORSINI, G., LEGITIMO, A., FAILLI, A., FERRARI, P., & NICOLINI, A. (2013). Defective Generation and Maturation of Dendritic Cells from Monocytes in Colorectal Cancer Patients during the Course of Disease. *Int J Mol Sci*, 14, 22022–22041.

OSBORNE, B. Y. D. P., & KATZ, J. R. A. D. H. (1984). The allogeneic effect in inbred mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 138, 825–838.

PARK, J. B., KWAK, H., & LEE, S. (2008). Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adhesion & Migration*, 2(3), 202–207.

PARNEY, I. F., WALDRON, J. S., & PARSA, A. (2011). Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma– associated macrophages. *J Neurosurg*, 110(2), 572–582.

PERRIN, S. L., BARDY, C., HILDER, E. F., DEFOREST, C. A., & ARRUA, R. D. (2018). Review : Synthetic scaffolds to control the biochemical , mechanical , and geometrical environment of stem cell-derived brain organoids. *APL Bioengineering*, 041501, 2–20.

PERRIN, S. L., SAMUEL, M. S., KOSZYCA, B., BROWN, M. P., EBERT, L. M., OKSDATH, M., & GOMEZ, G. A. (2019). Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochemical Society Transactions*, (November 2018), 1–14.

PHUPHANICH, S., WHEELER, C. J., RUDNICK, J. D., MAZER, M., WANG, H., NUÑO, M. A., YU, J. S. (2013). Phase i trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for

patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(1), 125–135.

PINHO M, SUNDARASETTY B, BERGAMI P, STEPONAVICIUS K, KLEBER A, STRIPECKE R, et al. Dendritic-tumor cell hybrids induce tumor-specific immune responses more effectively than the simple mixture of dendritic and tumor cells. *Cytotherapy*. 2016;18:570-80

RAMOS R, CHIN L, DOS SANTOS A, BERGAMI P, LAGINHA F, BARBUTO J. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*. 2012;92(3):673-82.

RATTA M, FAGNONI F, CURTI A, VESCOVINI R, SANSONI P, OLIVIERO B, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*. 2002;100(1):230-7.

RAZAVI, S., LEE, K., JIN, B., AUJLA, P., GHOLAMIN, S., & LI, G. (2016). Immune evasion strategies of Glioblastoma. *Frontiers in Surgery*, 3(11), 1–9.

RICHARDS, D. M., HETTINGER, J., & FEUERER, M. (2013). Monocytes and macrophages in cancer: Development and functions. *Cancer Microenvironment*, 6(2), 179–191.

RODRIGUES, J. C., GONZALEZ, G. C., ZHANG, L., IBRAHIM, G., KELLY, J. J., GUSTAFSON, M. P., PARNEY, I. F. (2010). Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. *Neuro-Oncology*, 12(4), 351–365. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop023>

RODRÍGUEZ, C.E., MOVERER, L.M., REIDEL, S.I., MARINO, L., DE KIER JOFFÉ, E.D.B., JASNIS, M.A., FISZMAN, G.L., 2012. Cytotoxic effect of trastuzumab on macrophage-infiltrated human mammary tumor spheroids. *Cancer Res*. 72, 2881.

ROESCH, S., RAPP, C., DETTLING, S., & HEROLD-MENDE, C. (2018). When Immune Cells Turn Bad — Tumor-Associated Microglia / Macrophages in Glioma. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1–20.

ROMANI, N., GRUNER, S., BRANG, D., KÄMPGEN, E., LENZ, A., TROCKENBACHER, B., ... SCHULER, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(1), 83–93.

SACKS, P. G., TAYLO, D. L., RACZ, T., VASEY, T., OKE, V., & SCHANTZ, S. P. (1990). A multicellular tumor spheroid model of cellular immunity against head and neck cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 32, 195–200.

SALLUSTO, F. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*, 179(4), 1109–1118.

SALLUSTO, F. (1995). 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. *Journal of Experimental Medicine*, 182(2), 389–400.

SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A., (1994). Pillars Article : Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte / macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J . Exp . Med . The Journal of Immunology*, 179, 1109–1118.

SALLUSTO, F., SCHAERLI, P., LOETSCHER, P., SCHANIEL, C., LENIG, D., MACKAY, C. R., ... LANZAVECCHIA, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*, 28(9), 2760–2769.

SAMPAIO, P. C. DE, AUSLAENDER, D., KRUBASIK, D., FAILLA, A. V., SKEPPER, J. N., MURPHY, G., & ENGLISH, W. R. (2012). A Heterogeneous In Vitro Three Dimensional Model of Tumour-Stroma Interactions Regulating Sprouting Angiogenesis. *PLoS ONE*, 7(2), 1–14.

SHAN, Y., HE, X., SONG, W., HAN, D., NIU, J., & WANG, J. (2015). Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. *Int J Clin Exp Med*, 8(6), 9114–9120.

SHATTAPORN S, ROBINS A, VASSANASIRI W, EL-SHEEMY M, CLARK D, JIBRIL J, et al. Dendritic cells are dysfunctional in patients with operable breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(6):510-8.

SHURIN G, AALAMIAN M, PIRTSKHALAISHVILI G, BYKOVSKAIA S, HULAND E, HULAND H, et al. Human prostate cancer blocks the generation of dendritic cells from CD34+ hematopoietic progenitors. *Eur Urol*. 2001;39(4):37-40.

SIPPEL, T. R., WHITE, J., & NAG, K. (2011). Neutrophil Degranulation and Immunosuppression in Patients with GBM : Restoration of Cellular Immune Function by Targeting Arginase I Neutrophil Degranulation and Immunosuppression in by Targeting Arginase I. *Clin Cancer Res*, 17, 6992–7002.

SMINIA, P., & WESTERMAN, B. A. (2016). Blood-brain barrier crossing and breakthroughs in glioblastoma therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 81(6)

SONG, Y., KIM, J., KIM, S., PARK, Y. K., YU, E., KIM, K., SEO, H. R. (2018). Patient-derived multicellular tumor spheroids towards optimized treatment for patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37, 1–13.

SOTOMAYOR, E. M., BORRELLO, I., RATTIS, F. M., CUENCA, A. G., ABRAMS, J., STAVELEY-O'CARROLL, K., & LEVITSKY, H. I. (2001). Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. *Blood*, 98(4), 1070–

SPIRIG, R., DJAFARZADEH, S., REGUEIRA, T., SHAW, S. G., VON GARNIER, C., TAKALA, J., LEPPER, P. M. (2010). Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 α and dendritic cell maturation under normoxic conditions. *PLoS ONE*, 5(6), 1–12.

STEINMAN, R. (1978). Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 157(2), 613–627.

STRLE K, ZHOU JH, SHEN WH, BROUSSARD SR, JOHNSON RW, FREUND GG, et al. (2001). Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*, 21:427–49. doi:10.1615/CritRevImmunol.v21.i5.20

SILBERGELD D, ROSTOMILY R, ALVORD E. (1991). The cause of death in patients with glioblastoma is multifactorial : Clinical factors and autopsy findings in 117 cases of supratentorial glioblastoma in adults. *Journal of Neuro-Oncology*, 10, 179–185.

SUTHERLAND, R. M., MACDONALD, H. R., & HOWELL, R. L. (1977). Multicellular Spheroids: A New Model Target for In Vitro Studies of Immunity to Solid Tumor Allografts: Brief Communication. *J. Natl Cancer Inst*, 58(6), 1849–1853.

SYMONS H, LEVY M, WANG J, ZHOU X, ZHOU G, COHEN S, et al. The allogeneic effect revisited: exogenous help for endogenous, tumor-specific T cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(5):499-509

TAKAHASHI, A., KONO, K., ICHIHARA, F., SUGAI, H., FUJII, H., & MATSUMOTO, Y. (2004). Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(6), 543–550.

TANG, F., & ZHENG, P. (2018). Tumor cells versus host immune cells : whose PD - L1 contributes to PD - 1 / PD - L1 blockade mediated cancer immunotherapy? *Cell & Bioscience*, 1–8.

TRÉDAN, O., GALMARINI, C. M., PATEL, K., & TANNOCK, I. F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1441–1454. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>

TRYLCOVA, J., BUSEK, P., JR, K. S., & BALAZIOVA, E. (2015). Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. *Tumor Biol*, 3–9. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3259-8>

URBANSKA, K., SOKOLOWSKA, J., SZMIDT, M., & SYSA, P. (2014). Glioblastoma multiforme - An overview. *Wspolczesna Onkologia*, 18(5), 307–312. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>

VAN DIJK, M., GÖRANSSON, S. A., & STRÖMBLAD, S. (2013). Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer. *Experimental Cell Research*, 319(11), 1663–1670. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.02.006>

VAN MIERLO, G. J. D., BOONMAN, Z. F. H. M., DUMORTIER, H. M. H., DEN BOER, A. T., FRANSEN, M. F., NOUTA, J., MELIEF, C. J. M. (2004). Activation of Dendritic Cells That Cross-Present Tumor-Derived Antigen Licenses CD8+ CTL to Cause Tumor Eradication. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6753–6759. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6753>

VIRGA, J., SZIVOS, L., HORTOBÁGYI, T., & CHALSARAEI, M. K. (2019). Extracellular matrix differences in glioblastoma patients with different prognoses. *Oncology Letters*, 17, 797–806. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9649>

WANG, S., HONG, S., YANG, J., QIAN, J., ZHANG, X., SHPALL, E., YI, Q. (2016). Optimizing immunotherapy in multiple myeloma: restoring the function of patients' monocyte-derived dendritic cells by inhibiting p38 or activating MEK / ERK MAPK and neutralizing interleukin-6 in progenitor cells. *Blood*, 108(13), 4071–4078. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016980>.The

WARBURG, O. (1956). Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191).

Ward, J. ., & King, J. . (1997). Mathematical Modelling of avascular-tumor growth. *IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology*, 14, 39–69.

Wei, J., Wu, A., Kong, L. Y., Wang, Y., Fuller, G., Fokt, I., ... Heimberger, A. B. (2011). Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016195>

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., & Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(4), 842–857. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.022>

Wesseling, P., Ruiter, D. J., & Burger, P. C. (1997). Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1023/A:1005746320099>

WHO. World Health Organization, “Cancer”, *World Health Organization*, 2015, www.who.int/topics/cancer/en/.

WICK, M., DUBEY, P., KOEPPEN, H., SIEGEL, C. T., FIELDS, P. E., CHEN, L., ... SCHREIBER, H. (1997). Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(2), 229–238.

WOJTKOWIAK, J. W., VERDUZCO, D., SCHRAMM, K. J., & GILLIES, R. J. (2011). Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 2032–2038.

XIAO, W., SOHRABI, A., & SEIDLITS, S. K. (2017). Integrating the glioblastoma microenvironment into engineered experimental models. *Future Science OA*, 3(3), FSO189.

XUE, H., YUAN, G., GUO, X., LIU, Q., ZHANG, J., GAO, X., LI, T. (2016). BASIC RESEARCH PAPER A novel tumor-promoting mechanism of IL6 and the therapeutic efficacy of tocilizumab : Hypoxia-induced IL6 is a potent autophagy initiator in glioblastoma via the p-STAT3- MIR155-3p -CREBRF pathway. *Autophagy*, 12(7), 1129–1152.

YEON, S. E., NO, D. Y., LEE, S. H., NAM, S. W., OH, I. H., LEE, J., & KUH, H. J. (2013). Application of Concave Microwells to Pancreatic Tumor Spheroids Enabling Anticancer Drug Evaluation in a Clinically Relevant Drug Resistance Model. *PLoS ONE*, 8(9), 1–12.

YONG, R. L., & LONSER, R. R. (2011). Surgery for glioblastoma multiforme: Striking a balance. *World Neurosurgery*, 76(6), 528–530.

ZELENAY, S., & REIS E SOUSA, C. (2013). Adaptive immunity after cell death. *Trends in Immunology*, 34(7), 329–335.

ZHANG, Z., WANG, H., DING, Q., XING, Y., XU, Z., LU, C., ... SHI, M. (2018). Establishment of patient-derived tumor spheroids for non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*, 1–8.

ANEXO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:
.....BAIRRO: CIDADE
.....CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
.....2. RESPONSÁVEL LEGAL
.....NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Células dendríticas na imunoterapia de gliomas malignos**

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **Jose Alexandre Barbuto**

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 41567

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Clínica Médica - FMUSP

PESQUISADOR EXECUTANTE: **Guilherme Alves Lepski**

CARGO/FUNÇÃO: Professor Livre Docente do Departamento de Neurologia, Disciplina de Neurocirurgia da USP, Supervisor da Neurocirurgia do Icesp

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 93887

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

Trata-se de um estudo clínico prospectivo de fase II e III sobre a eficácia clínica de uma terapia experimental com células autólogas (próprias do seu corpo) provenientes do seu sistema imunológico, no combate a tumores malignos do sistema nervoso central (glioblastoma multiforme). O presente estudo tem como objetivo estudar parâmetros clínico-oncológicos e imunológicos em pacientes portadores de um tipo de glioma maligno (GBM), oferecendo para aqueles que se enquadrarem nos critérios discriminados um protocolo de vacinação terapêutica com células híbridas autólogas dendríticas-tumorais. Serão analisadas as células imuno-inflamatórias no tumor e no sangue periférico, bem como o padrão de resposta clínica à terapia proposta.

2 – Procedimentos que serão realizados e seus propósitos

O tecido tumoral e sanguíneo coletados da cirurgia para tratamento do tumor cerebral serão levados ao laboratório, onde passarão por diversas etapas de separação das células inflamatórias do tumor e do sangue periférico, assim como por etapas de processamento do tumor para a produção da vacina. Uma vez constituída a vacina, serão aplicadas doses a cada dois meses durante a terapia convencional de quimio-radioterapia. Durante a fase II, 20 doentes consecutivos serão incluídos no estudo, e na fase III, 53 doentes vão ser sorteados para receber a vacina, outros 53 receberão vacinação-sham com soro fisiológico (controle). Nem o médico tratador nem os pacientes saberão se receberam a vacina ativa ou o soro fisiológico durante a fase III.

3 - Relação dos procedimentos rotineiros

O restante do tratamento seguirá protocolo institucional para tratamento neuro-oncológico de glioblastomas, composto de cirurgia seguida de quimio- e radioterapia. Os tipos de exames complementares (ressonância magnética principalmente e eventualmente CT), bem como sua periodicidades, seguirão a rotina clínica estabelecida mundialmente para tratamento desses tumores. Não haverá diferenças entre os dois grupos (controle e experimental) com relação ao tratamento convencional.

4 – Descrições dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos

Não haverá desconforto para o paciente referente à coleta de tecido tumoral, uma vez que este procedimento cirúrgico faz parte integrante do tratamento proposto para a doença. Há baixo risco de reação alérgica local na pele, no local de injeção da vacina (coceira e vermelhidão), que podem sere tratadas com medicação sintomática.

5 – Descrições dos benefícios esperados nos procedimentos

Há um potencial benefício terapêutico para os pacientes com GBM, que pode se traduzir em aumento do tempo de sobrevida, aumento do tempo livre de progressão da doença ou melhora da qualidade de vida. A compreensão dos mecanismos imunológicos que se associam ao processo de recorrência e de progressão da doença poderá abrir caminho para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de acompanhamento da doença.

6 – Procedimentos alternativos:

O paciente possui autonomia para recusar a participação no presente estudo e manter o tratamento neuro-oncológico no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Se optar por não participar do estudo, o paciente receberá o tratamento convencional preconizado (cirurgia e quimio-radioterapia). Não existem outras opções viáveis e estabelecidas para o tratamento desse tipo de tumor.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr Guilherme Alves Lepski**, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 251, Cerqueira César, São Paulo; Telefone (11) 3893 2000. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): **Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000** Tel: 3893-4401/4407 E-mail: cep.fm@usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ” **Células dendríticas na imunoterapia de glioblastomas**”.

Eu discuti com o Dr. **Guilherme Alves Lepski** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____