

**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

## 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.

## 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.

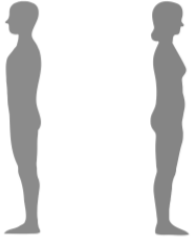
Dentre as diversas estratégias abordadas pela imunoterapia, algumas visam ativar o próprio sistema imune dos pacientes, especificamente, aqueles componentes que no contexto tumoral possam se encontrar inoperantes ou deficientes. Tais estratégias, classificadas como de “imunoterapia ativa”, porém, se 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%	<b>Homens</b> 	<b>Mulheres</b>	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.

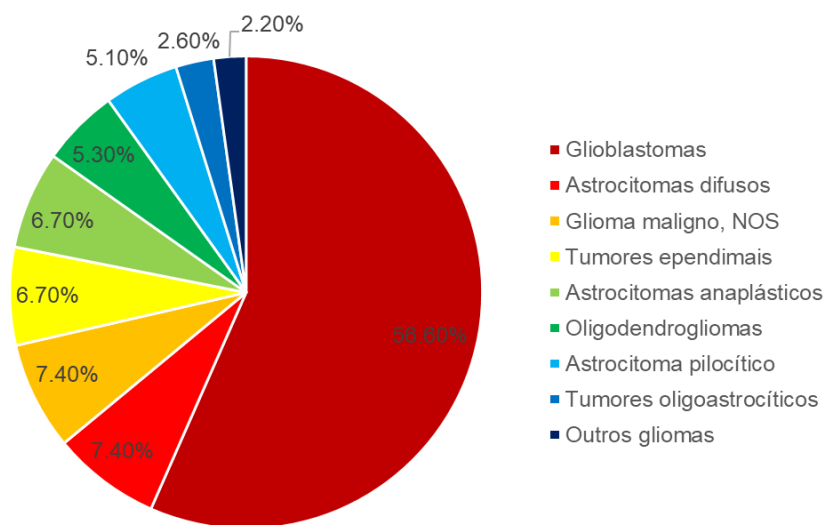
Atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o GBM segundo a presença ou ausência de mutações no gene de isocitrato desidrogenase (IDH) como: GBM primário (correspondendo a 90% dos casos), que apresenta o IDH selvagem, seria originado a partir de mutações nas células gliais e mais frequente 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- $\gamma$  e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), 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- $\beta$ ) 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- $\beta$ , 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- $\beta$  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 $\alpha$  e a produção de IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> antígeno-específicos produtores de IFN- $\gamma$  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 câncer 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.

## 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  $\alpha$  v $\beta$ 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  $\alpha$  . 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 $\alpha$  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/](http://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*