

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Caracterização transcricional de infiltrados imunológicos e sua relação com a
sobrevida de pacientes com glioblastoma

Mariana Brutschin Pereira

Abril de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Caracterização transcricional de infiltrados imunológicos e sua relação com a
sobrevida de pacientes com glioblastoma

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Biotecnologia
da UFRGS como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Mariana Brutschin Pereira

Orientador: Dr. Guido Lenz

Porto Alegre, abril de 2017

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Brasil

Fontes Financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários e professores da Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, especialmente à Sílvia e ao Luciano, que sempre estiveram dispostos a ajudar e orientar em todos os assuntos referentes ao mestrado.

Ao professor Guido, um exemplo de professor e orientador, sempre disposto a discutir novas ideias e encarar desafios. Agradeço à compreensão e, principalmente, ao incentivo, preocupação, paciência e presença durante todo o mestrado. Foi uma honra trabalhar e, acima de tudo, aprender com esse grande profissional.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório, pelas discussões, companheirismo, e momentos de descontração, em especial aos queridos amigos: Alexandra, Giovana e Marcos.

Aos amigos da graduação, que sempre estiveram presentes, dividindo felicidades, frustrações e conselhos, em especial a Marina, as Fernandas e a Carolina.

Aos meus amigos que estiveram presentes durante todo o mestrado, que sempre me mantiveram alegre e motivada. Obrigada por todo o apoio e compreensão!

À minha amiga querida, Agnes, que tem sido mais do que uma amiga, mas uma irmã. Obrigada pelo apoio incondicional e pelos conselhos mais sinceros.

Ao meu primo, Guilherme, que participou dos momentos de descontração e de desopilação, sempre me carregando para a academia, para os jogos do grêmio ou para o bar. Obrigada pela parceria sempre!

Ao maior presente que recebi durante o mestrado, Ana, que sempre me incentivou e me manteve focada nos meus objetivos, dividindo comigo alegrias e me consolando nos momentos de frustração. Obrigada pela parceria, pela compreensão e pela paciência! Te amo demais!

Aos meus amados afilhados, Thomás e Isabela, os quais me dão alegrias e forças pra seguir em frente.

À minha irmã e à minha mãe, Priscila e Rosalva, as quais seguem me ensinando todos os dias e sempre estão dispostas a me apoiar e me aconselhar em cada decisão. Obrigada pelos conselhos, pelos puxões de orelha e por todo amor que vocês me dão diariamente! Amo vocês!

E finalmente, aos meus avós, Carlos e Iná, que sempre estiveram presentes, me apoiando e me dando bons exemplos. Obrigada pelo incentivo, pelos exemplos de vontade, perseverança e trabalho duro! Cada vitória minha é dedicada a vocês!

ÍNDICE

1	Introdução	13
1.1	Glioblastoma	14
1.1.1	Aspectos clínicos	14
1.1.2	Tratamento	15
1.1.2.1	Remoção cirúrgica	15
1.1.2.2	Radioterapia	16
1.1.2.3	Quimioterapia	17
1.2	Sistema imunológico do Sistema nervoso central	17
1.2.1	Imunologia tumoral do Glioblastoma	18
1.2.1.1	Sistema imunológico tumoral	19
1.2.1.1.1	Células T	20
1.2.1.1.1.1	Células T CD8+	22
1.2.1.1.1.2	Células T CD4+	23
1.2.1.1.2	Células B	27
1.2.1.1.3	Células Natural Killer	29
1.2.1.2	Sistema imunológico pró-tumoral	32
1.2.1.2.1	Macrófagos	32
1.2.1.2.2	Microglia	34
1.2.1.2.3	Células Supressoras derivadas de Mieloides	37
1.2.1.2.4	Células T reguladoras	39
1.3	Mecanismos de exaustão da resposta imunológica antitumoral	42
1.3.1	Pontos de parada do sistema imunológico	43
1.3.2	Mudanças no metabolismo energético do sistema nervoso central	46
1.4	Imunoterapia e morte celular imunogênica	49
1.4.1	Inibidores de pontos de verificação imunológicos	50
1.4.2	Terapia de células adotivas	52
1.4.3	Vacinação de peptídeo	53
1.4.4	Terapia baseada em células dendríticas	54
2	Hipótese	56
3	Objetivos	57
4	Metodologia	58
4.1	Obtenção dos dados	58
4.2	Obtenção das meta-assinaturas	58
4.3	Análise de <i>Heat-map</i>	60

4.4	Análise de correlação	60
4.5	Análises de Kaplan-Meier	60
4.6	Análises de correlação tridimensional	61
4.7	Análise integrada de meta-assinaturas	62
5	Resultados	63
5.1	Análise de <i>Heat-map</i>	63
5.2	Correlação de Pearson	64
5.3	Análise de Kaplan-Meier individual.....	65
5.4	Análises de Kaplan-Meier de meta-assinaturas combinadas	67
5.5	Análise integrada de meta-assinaturas	72
5.6	Análises de Kaplan-Meier em gliomas de baixo grau.....	75
6	Discussão	78
7	Conclusões	93
8	Referências	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT - Terapia de células adotivas
APC – Célula apresentadora de antígeno
A β – Beta amiloide
BBB – Barreira Hematoencefálica
CAR- receptores de anticorpos quiméricos
CSF – Líquido cefalorradiano
CTL – Célula T citotóxica
DC – Célula dendrítica
EGF- Fator de crescimento epidérmico
EXH – Exaustão
GBM – Glioblastoma
GLUT1 - Transportador de glicose 1
GLUT3 - Transportador de glicose 3
GSC - Células-tronco de glioma
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
IL- Interleucina
KIR - *Inhibitory killer immunoglobulin-like receptors*
KM – Kaplan-Meier
LPS – Lipossacarídeo
MAC- Macrófago
MDSC - Células supressoras derivadas de mieloides
MHC- Complexo de histocompatibilidade
MMP – Metaloproteases de matriz
NK – Assassinas naturais
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORR- Taxa de resposta objetiva
OS – Sobrevida global
PBMC - Células mononucleares do sangue periférico
PFS - Sobrevida livre de progressão
shRNA - Short hairpin RNA
SNC – Sistema Nervoso Central

TAA - antígenos associados a tumores
TAM – Macrófagos associados a tumor
TCGA – The Cancer Genome Atlas
TCR- Receptor de célula T
TIL – Linfócitos infiltrantes de tumor
TLR- Receptores do tipo Toll Like
Treg – Célula T reguladora
VEGF- fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciação de células T CD4+.....	24
Figura 2. Efeitos do sistema imunológico em GBM de acordo com o microambiente tumoral.....	41
Figura 3. Exemplo de pontos de corte para a análise de Kaplan-Meier integrando duas assinaturas com correlação entre elas.....	61
Figura 4. Gráfico de correlação tridimensional.....	62
Figura 5. Análise de <i>Heat-map</i> ilustrando a distribuição da expressão das meta-assinaturas com base na meta-assinatura de exaustão.....	64
Figura 6. Análise de correlação entre as meta-assinaturas avaliadas.....	65
Figura 7. Análises de Kaplan-Meier das meta-assinaturas individuais.....	66
Figura 8. Análise de Kaplan-Meier combinando as meta-assinaturas de macrófagos (MAC) e exaustão (EXH).....	68
Figura 9. Análise de Kaplan-Meier combinada de macrófagos e análise de correlação tridimensional.....	69
Figura 10. Diferença na polarização de macrófagos em glioblastomas.....	70
Figura 11. Análise de Kaplan-Meier combinando as meta-assinaturas de linfócitos CD8+ (CD8) e exaustão (EXH).....	71
Figura 12. Análise de Kaplan-Meier combinada de CD8+ e gráfico de correlação tridimensional.....	72
Figura 13. Análise integrada das meta-assinaturas.....	74
Figura 14. Análises de Kaplan-Meier em glioma de grau 2.....	76
Figura 15. Análises de Kaplan-Meier em glioma de grau 3.....	77
Figura 16. Relação da expressão das diferentes meta-assinaturas e o desfecho clínico dos pacientes.....	89
Figura 17. Infiltração diferencial do sistema imunológico ao longo da progressão tumoral.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito das diferentes células do sistema imunológico no prognóstico de pacientes com diversos tipos de câncer.....	27
Tabela 2. Papel das células do sistema imunológico e inflamatórias na resposta imune anti-tumoral e pró-tumoral.	42
Tabela 3. Meta-assinaturas utilizadas para representar as diferentes células do sistema imunológico e exaustão.	59

Resumo

Introdução: A complexidade das populações de células do sistema imunológico infiltrando tumores humanos com seus efeitos sinérgicos ou antagônicos pode influenciar os tumores de forma diferente. Embora as células do sistema imunológico sejam encontradas dentro do sítio tumoral, a razão para incapacidade do sistema imunológico em eliminar o tumor foram pouco elucidadas. **Objetivo:** Avaliar a importância das diferentes populações de células no sistema imunológico presentes no microambiente tumoral de glioblastoma e seus efeitos sobre as demais células em relação ao prognóstico dos pacientes. **Metodologia:** Foram utilizados dados de transcriptoma e dados clínicos gerados pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e meta-assinaturas representando diferentes células do sistema imunológico previamente descritas. A relação entre as meta-assinaturas foi avaliada através de análises de mapa de calor e correlação de Pearson. As análises de sobrevida foram realizadas através de gráficos de Kaplan-Meier das meta-assinaturas individualmente, com dois e três elementos. **Resultados e Discussão:** Assinaturas transcricionais de diversas populações do sistema imunológico com papel imunossupressor foram encontradas infiltrando tumores de pacientes com glioblastoma, tais como macrófagos, células NK e NK T, MDSCs e Tregs e correlacionaram com um pior prognóstico dos pacientes. As meta-assinaturas T CD8+ e CD4+ não foram capazes de prever o prognóstico dos pacientes sozinhas. No entanto, na ausência de elementos de imunossupressão, os pacientes com alta expressão da meta-assinatura de células T CD8+ mostraram melhor sobrevida em relação aos demais. Observamos uma divisão das meta-assinaturas em 4 conjuntos distintos, sendo um deles formado por Macrófagos, MDSCs e Tregs demonstrando pior prognóstico e outro cluster contendo CD4 e CD8 conferindo um melhor prognóstico, ambos quando altamente expressos. Esses resultados não se repetiram para gliomas de grau II e III. **Conclusão:** Se considerarmos as assinaturas transcricionais dos diferentes aspectos da resposta imunológica de forma integrada, teremos um impacto preditivo sobre a sobrevivência com papel positivo para a meta-assinatura referente a linfócitos CD8 e negativos para as meta-assinaturas de macrófagos, MDSC, Tregs, NK e NK T em pacientes com glioblastoma. A compreensão acerca desses diversos fatores reguladores e estimuladores do sistema imunológico no paciente, bem como no microambiente tumoral, é essencial para delinear uma estratégia eficaz com o objetivo de aumentar a resposta imune antitumoral e gerar benefícios clínicos reais.

Abstract

Introduction: The complexity of immune cell populations infiltrating human tumors with their synergistic or antagonistic effects may influence tumors differently. Although immune cells are found within the tumor site, the reason for the incapacity of the immune system in eliminating the tumor has hardly been elucidated. **Objective:** To evaluate the importance of different immune cell populations present in the glioblastoma tumor microenvironment and its effects on the other immune cells. **Methodology:** Transcriptome and clinical data were generated by The Cancer Genome Atlas (TCGA) and meta-signatures representing different cells of the immune system previously described were used. The relationship between meta-signatures was evaluated through heat-map analysis and Pearson's correlation. Survival analysis were performed through Kaplan-Meier plots of meta-signatures individually, with two and with three elements. **Results and discussion:** Infiltrating immune cells with immunosuppressive role were found in patients with glioblastoma, such as macrophages, NK and NK T cells, MDSCs and Tregs, and were correlated with poorer prognosis of patients. The CD8 + and CD4 + T meta-signatures were not able to predict patients' prognosis alone. However, in the absence of immunosuppressive elements, patients with higher levels of CD8 + T-cell meta-signatures showed better survival than the opposite expression profile. We observed a division of meta-signatures into four clusters. The cluster consisting of macrophages, MDSCs and Tregs demonstrated the worst prognosis and the cluster containing CD4 and CD8 conferred the best prognosis, when both meta-signatures were highly expressed. These results were not reproduced for grade II and III gliomas. **Conclusion:** If we consider the transcriptional signatures of the different response immunological aspects in an integrated way, they will have a predictive impact on survival with positive role for CD8 and negative roles for macrophages, MDSC, Tregs, NK and NK T meta-signatures in glioblastoma patients. Understanding these regulatory factors and stimulators of the patients' immune system, as well as the tumor microenvironment, is essential to delineate an effective strategy to increase the anti-tumor immune response and generate real clinical benefits.

1 Introdução

Os gliomas representam mais de 70% dos tumores cerebrais primários. Sua incidência é maior entre adultos de 45 a 64 anos e mais comum em homens e em caucasianos, estimando-se um risco de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 para cada 100 mil mulheres no Brasil no ano de 2016 (FISHER et al., 2007; HESS et al., 2004; RICARD et al., 2012; INCA, 2016).

Historicamente, gliomas foram classificados pela semelhança morfológica em relação às células gliais, sugerindo que astrocitomas, por exemplo, tenham se originado de astrócitos ou de precursores astrocíticos. Assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os gliomas em astrocitomas (grau I a IV), oligodendrogliomas (grau II e III), e oligoastrocitomas (grau II e III), sendo os gliomas de origem astrocítica classificados em quatro graus de malignidade (LOUIS et al., 2007):

- Grau I: astrocitoma pilocítico, acometem principalmente crianças entre 5 e 15 anos e apresentam baixa capacidade invasiva;
- Grau II: astrocitoma de baixo grau, crescem de forma lenta, podendo ou não invadir o tecido cerebral normal adjacente;
- Grau III: astrocitoma anaplásico, são tumores recorrentes de neoplasias de baixo grau, apresentando uma taxa de crescimento maior e capacidade de invasão do tecido cerebral normal adjacente. Alta probabilidade de recorrência após o tratamento;
- Grau IV: glioblastoma multiforme, alto grau de malignidade e alta capacidade de invasão.

Aproximadamente 13.000 mortes por glioma ocorrem anualmente nos EUA, onde a sobrevivência mediana para o astrocitoma anaplásico e astrocitomas de baixo grau é de aproximadamente 3 e 5-7 anos, respectivamente (HESS et al., 2004). O glioblastoma é a forma mais agressiva e virtualmente incurável dos gliomas, possuindo uma mediana de sobrevivência de 12 meses, após o diagnóstico (OHGAKI & KLEIHUES, 2005). Estas estatísticas fazem com que os gliomas estejam entre as formas mais mortais de câncer. Apesar de décadas de pesquisa intensiva e uma variedade de quimioterapias, radioterapias e

abordagens cirúrgicas, o prognóstico para os pacientes com estes tumores não mudou significativamente (MAMELAK & JACOBY, 2007).

1.1 Glioblastoma

O glioblastoma é o subtipo mais frequente e grave do glioma. De fato, o glioblastoma é responsável por cerca de 50% dos gliomas difusos. Dentro deste tipo de tumor patológico, foram identificados vários grupos transcriptômicos: clássico, neural, proneural e mesenquimal, com uma vantagem prognóstica aparente para o grupo proneural. Outro estudo também classificou o glioblastoma de acordo com níveis de expressão global dos genes expressos em glioblastoma, classificando de G1 a G3, sendo G1 semelhante ao subtipo pró-neural e G3 semelhante ao subtipo mesenquimal (YAN et al., 2012). O glioblastoma afeta desproporcionalmente os homens (relação 3 homens a cada 2 mulheres) e geralmente ocorre em adultos com idade entre 45 e 64 anos. A taxa de sobrevivência baixa dos pacientes com esse tipo de malignidade está relacionada às, principalmente, altas taxas de recorrência, inevitável pelas terapias convencionais (LOUIS, 2006). A heterogeneidade celular e molecular, juntamente com o alto grau de invasividade dos tecidos normais, faz com que o tratamento desse tipo de tumor seja um desafio.

1.1.1 Aspectos clínicos

Os gliomas caracterizam-se por serem amplamente heterogêneos, tanto em relação a seu perfil genotípico e fenotípico, quanto a sua apresentação clínica (LOUIS, 2006; VITUCCI et al., 2011). Por esse motivo, surgiu a necessidade de criar um programa de estratificação para determinar, de forma mais precisa, o subtipo do glioma apresentado em cada paciente, com o objetivo de obter um melhor diagnóstico em relação a sua evolução, agressividade e tratamento apropriado. Assim, o sistema clínico padrão de classificação de gliomas leva em consideração o perfil histopatológico dos gliomas, o grau de malignidade e a localização do tumor no sistema nervoso central (SNC) (LOUIS et al., 2007). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, um sistema mais detalhado de

classificação foi desenvolvido, baseado no perfil de expressão de alguns genes específicos determinantes na resposta aos tratamentos disponíveis (APPIN & BRAT, 2014; HUSE et al., 2013).

Atualmente, com o surgimento de técnicas de sequenciamento de nova geração, capazes de identificar a expressão de milhares de genes simultaneamente, um novo sistema de classificação vem sendo desenvolvido baseado no padrão de expressão gênica de amostras de gliomas, auxiliando na estratificação destes tumores, favorecendo o diagnóstico e tratamento preciso dos pacientes (CECCARELLI et al., 2016; VERHAAK et al., 2010; YAN et al., 2012).

1.1.2 Tratamento

O padrão atual de atendimento para pacientes com diagnóstico recente de glioblastoma é a ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e, em seguida, quimioterapia, com o agente alquilante temozolomida.

1.1.2.1 Remoção cirúrgica

A remoção cirúrgica de tumores cerebrais tem sido um padrão do tratamento primário de glioma há décadas (BUCKNER, 2003; JEREMIC et al., 2004; JOHANNESSEN et al., 2003; LAWS et al., 2003). Os objetivos da cirurgia são quatro: i) aliviar o efeito de compressão intracraniana causado pelo tumor; ii) restaurar as vias normais do líquido cefalorraquidiano; iii) reduzir o volume tumoral para outras terapias posteriores; e iv) obter tecido para diagnóstico e caracterização patológica. Infelizmente, a excisão total do glioma raramente é possível. As células de glioma são altamente invasivas e são comumente observadas a quatro ou mais centímetros da massa tumoral primária (KELLY et al., 1987). A maioria dessas células são interdigitadas com parênquima cerebral normal e a ressecção dessas regiões pode resultar em déficits neurológicos inaceitáveis. Além disso, embora gliomas raramente sofram metástase para fora do SNC, eles frequentemente disseminam-se amplamente em ambos hemisférios do cérebro. Ferramentas para auxiliar os cirurgiões na diferenciação do tecido normal das células gliais na periferia dos tumores podem melhorar a extensão da

remoção microscópica. Estes métodos incluem o uso de fluorescência tumoral (GRIEB, 2003; STUMMER et al., 2000), imagem infravermelha (GORBACH et al., 2004), mapeamento fisiológico de estruturas corticais e outros métodos que melhoram a segurança de ressecção. A excisão total de gliomas de baixo grau, especialmente tumores pilocíticos é curativa em > 80% dos casos (JOHANNESSEN et al., 2003). Em contraste, a remoção total de todos os outros gliomas não está claramente correlacionada com uma taxa de cura mais elevada. A cirurgia citorrredutora, que remove pelo menos 85% do aumento do volume de glioma de alto grau, tem sido correlacionada com maior sobrevida e melhora da qualidade de vida dos pacientes (LAWS et al., 2003; SAWAYA, 1999), com este efeito especialmente evidente para > 98% de ressecção (BUCCI et al., 2004; SAWAYA, 1999). Apesar das suas limitações, a ressecção cirúrgica parece ser a terapia mais eficaz para o tratamento de gliomas, especialmente quando os tumores são recorrentes e altamente invasivos (SAWAYA, 1999).

1.1.2.2 Radioterapia

Os gliomas não são particularmente tumores radiosensíveis. As doses de radiação superiores a 50 Gy são eficazes no retardo da progressão do glioma, mas geralmente não produzem uma cura ou um controle em longo prazo da doença (FISCHBACH et al., 1991). As doses crescentes de radiação melhoraram a eficácia em tumores de grau mais elevado, embora a maioria dos estudos de escalonamento de dose não tenham demonstrado uma sobrevida melhorada. Infelizmente, o parênquima cerebral normal também é sensível aos efeitos de radiação. A tolerância para lesões cerebrais diminui bastante rapidamente acima de 70 Gy, limitando efetivamente as doses de radiação total entre 60 e 70 Gy. O uso de radiosensibilizadores não foi comprovado em relação à melhora significativa dos efeitos da radiação ou do resultado a longo prazo (SHORT, 2003). Além disso, a lesão cerebral causada pela radiação e pela morte celular induzida por radiação (necrose) é frequentemente tão prejudicial quanto o tumor primário. Apesar destas limitações, a radioterapia tem sido utilizada como tratamento padrão para gliomas (MAMELAK & JACOBY, 2007).

1.1.2.3 Quimioterapia

A quimioterapia sistêmica é pouco eficiente no tratamento de gliomas. Isto é parcialmente atribuível à má distribuição de fármacos no cérebro, devido à barreira hematoencefálica (*Blood Brain Barrier - BBB*). Muitos agentes, incluindo carmustina, lomustina, procarbazina e temozolomida, têm causado uma resposta contra gliomas de alto grau (GROSSMAN & BATARA, 2004; SHAPIRO & SHAPIRO, 1998). No entanto, estes agentes tendem a causar respostas bastante limitadas ou parciais, tanto num cenário inicial como num cenário recorrente. O aumento da sobrevida com o uso de quimioterapia é de, em média, 2 meses, quando comparada com a radiação isolada, com ~ 35% dos pacientes apresentando sobrevida superior a 18 meses (STUPP et al., 2005). Alternativas também têm sido estudadas quanto à posologia da temozolomida, a fim de aumentar a sobrevida dos pacientes diagnosticados com GBM. Entretanto, os aumentos de sobrevida global e/ou sobrevida livre de progressão ainda são muito discretos em relação à sobrevida média de 14 meses do programa posológico (GILBERT et al., 2013).

Apesar destes avanços, a recorrência do glioblastoma acontece em quase todos os pacientes e a sobrevida média dos pacientes aumenta sutilmente (STUPP et al., 2005). Assim, o impacto das pesquisas atuais acerca do tratamento enfatiza a necessidade de novas abordagens que induzam uma resposta imunológica contra o glioblastoma.

1.2 Sistema imunológico do sistema nervoso central

A suposição tradicional era de que o sistema nervoso central é um local privado de resposta imunológica sistêmica; Entretanto, este dogma histórico foi derrubado pela descoberta da existência de vasos linfáticos no SNC (KIDA et al., 1995; LOUVEAU et al., 2015; WELLER et al., 1992) e que as células imunológicas poderiam atravessar a barreira hematoencefálica (RANSOHOFF et al., 2003). Além disso, um número substancial de linfócitos T pode ser encontrado no líquido cefalorraquidiano (*Cerebrospinal fluid - CSF*) de indivíduos saudáveis, onde têm grande importância na vigilância imunológica (KIVISÄKK et al., 2003). O

fluxo de CSF conecta o SNC ao sistema nervoso linfático através de drenagens nos gânglios linfáticos cervical e nasal, fornecendo uma via adicional para a circulação de antígenos e células do sistema imunológico (KIDA et al., 1993). Em estados patológicos, a inflamação aumenta a permeabilidade da BBB, permitindo a entrada de leucócitos no parênquima do SNC, incluindo as células apresentadoras de antígeno (*Antigen presenting cells* -APCs). Essa entrada ocorre através de várias vias, incluindo o plexo coroide, barreiras meníngeas e vênulas pós-capilares (FISCHER & REICHMANN, 2001; RANSOHOFF et al., 2003). Assim, de acordo com estes achados, células do sistema imunológico infiltrantes podem ser encontradas no tecido tumoral derivado de cânceres cerebrais (BERGHOF et al., 2015; YANG et al., 2010).

1.2.1 Imunologia tumoral do Glioblastoma

A complexidade das populações de células do sistema imunológico infiltrando tumores humanos com seus efeitos sinérgicos ou opostos pode influenciar os tumores de forma diferente dependendo do seu tipo histológico e molecular, seu estágio, o microambiente do órgão em que crescem ou a natureza do tumor - primário ou metastático. Além disso, o efeito de cada componente pode variar na presença de outras populações de células do sistema imunológico em diferentes densidades. Portanto, devem-se considerar as interações entre três sistemas altamente complexos - as células tumorais, as células do sistema imunológico e as demais células que compõe microambiente tecidual.

As células do sistema imunológico infiltrantes no glioblastoma consistem principalmente em macrófagos e, em menor extensão, linfócitos, em particular células T CD4 + e CD8 + (ROSSI et al., 1987). Macrófagos e microglias parecem representar até 40% das células presentes em tumores de glioblastoma (GUTMANN et al., 2013; MORANTZ et al., 1979; ROSSI et al., 1987; SIMMONS et al., 2011). Embora as células do sistema imunológico sejam encontradas dentro do sítio de tumores de glioblastoma, indicando uma reação do hospedeiro contra o tumor, os mecanismos detalhados e a razão para a insuficiência imune para inibir o crescimento tumoral e eliminar o tumor foram pouco elucidadas.

Além da imunidade local comprometida, análises de sequenciamento de RNA em célula única derivada de tumores de glioblastoma mostraram que estes tumores contêm células individuais com diferentes transcriptomas e mutações (PATEL et al., 2014). Além disso, os subtipos moleculares de glioblastoma parecem ser infiltrados de forma diferente pelas células do sistema imunológico. Por exemplo, foram identificados tumores de glioblastoma com maior densidade de células T e que exibem um nível mais elevado de mediadores de imunossupressão em relação aos demais subtipos transcricionais (DOUCETTE et al., 2013). Esta heterogeneidade intratumoral, juntamente com a ativação de múltiplas vias oncogênicas no glioblastoma, sugere que também pode haver diversidade nos mecanismos imunossupressores entre subtipos de glioblastoma, bem como nas células individuais.

O papel do sistema imunológico está se tornando cada vez mais relevante no tratamento de diferentes tipos de câncer. Novos agentes estão sendo desenvolvidos utilizando como alvo os mediadores de imunossupressão induzidos pelo tumor, o que tem sido bem documentado inclusive em glioblastoma. No entanto, a complexidade do microambiente destes tipos tumorais, envolvendo componentes antitumorais e de suporte ao tumor, parece ser uma barreira para o desenvolvimento de imunoterapias eficazes e, posteriormente, à cura da doença.

1.2.1.1 Sistema imunológico tumoral

Um número crescente de evidências sugerem que há uma interação significativa entre o sistema imunológico e a patogênese do glioma, com implicações clínicas (DUNN et al., 2007). A remissão em longo prazo de tumores cerebrais malignos secundários com infecção pós-operatória gerou a hipótese de que uma resposta imunológica aumentada pode conferir alguma proteção contra tumores intracranianos (BOWLES JR & PERKINS, 1999). Vários relatos também sugeriram que históricos significativos de alergia diminuem o risco de pacientes desenvolverem glioma intracraniano durante a vida (BRENNER et al., 2002; WIEMELS et al., 2002). Em contraste, um sistema imunológico comprometido pode gerar um estado no qual os tumores intracranianos podem se desenvolver mais facilmente. Isto é sugerido pela correlação notável entre a imunossupressão

mediada pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency vírus* - HIV) e os tumores gliais intracranianos (GERVASONI et al., 1995; MOULIGNIER et al., 1994; NEAL et al., 1996).

Além disso, a imunossupressão iatrogênica de receptores associada a transplantes também tem sido implicada no desenvolvimento de glioma (DUNN et al., 2004; SCHIFF et al., 2001). Também foram identificados vários antígenos associados a tumores capazes de gerar uma resposta específica em uma variedade de cânceres humanos, incluindo glioma maligno (PRINS & LIAU, 2003; STRUSS et al., 2001). Estes achados sugerem que uma resposta imune dependente de células T pode melhorar o prognóstico de pacientes com glioma através de uma resposta imune mediada por antígeno. Os infiltrados citotóxicos de células T (linfócitos T CD8 +) encontrados no tecido do glioma podem representar uma ativação imune dependente do antígeno local contra o glioma. Assim, a quantidade de infiltrados de células T CD8 + na apresentação inicial e diagnóstico de GBM parece correlacionar positivamente com a sobrevida de pacientes com GBM (KMIECIK et al., 2013; YANG et al., 2010).

1.2.1.1.1 Células T

Durante o desenvolvimento das células T, as células-tronco linfáticas multipotentes da medula óssea sofrem uma importante fase de desenvolvimento no timo. O timo é o órgão onde, através do mecanismo de seleção positiva, a autorreatividade das células T é impedida. As células T que reconhecem as proteínas MHC do próprio corpo são selecionadas para outros processos. O segundo passo é conhecido como uma seleção negativa. As células T autorreativas e os linfócitos que mostram uma reatividade contra os próprios peptídeos do corpo são eliminados através de apoptose induzida (Murphy et al., 2009).

Devido a este mecanismo, o corpo cria um contingente de células T que pode identificar apenas peptídeos exógenos que são apresentados em associação com proteínas MHC, enquanto que os autoantígenos, sob circunstâncias fisiológicas, são reconhecidos como endógenos e são isentos de uma reação imune (MURPHY et al., 2009). Com a ajuda da análise de citometria

de fluxo, as células T em geral podem ser descritas como células CD3+ dentro da população de leucócitos CD45+. Outro aspecto característico das células T é a expressão de um receptor de células T (TCR), que mostra analogia com a região específica de antígeno variável da imunoglobulina. Uma subdivisão adicional de células CD45+ CD3+ pode ser feita com os marcadores de superfície CD4, CD8 e CD25. De acordo com isto, as células T localizadas no sistema imunológico humano podem ser subdivididas da seguinte forma:

CD45 + CD3 + CD4 +: Este subgrupo consiste de células T-helper (TH-cells), que podem reconhecer os peptídeos apresentados nas proteínas MHC-classe II e, após sua ativação através de APCs, podem sofrer várias outras diferenciações:

Células Th1: Como células efetoras, as células Th1 caracterizam-se pela produção de IL-2, interferon gama (IFN- γ) e Ffator de necrose tumoral beta (TNF- β). Elas induzem uma reação imunológica celular através da ativação de macrófagos e células T citotóxicas, bem como a síntese de imunoglobulinas opsonizantes (IgG e IgM).

Células Th2: as células Th2 caracterizam-se pela secreção de IL-4 e IL-5 e pela indução de uma reação imunológica humoral, incluindo a síntese de todos os tipos de imunoglobulinas, bem como a ativação de granulócitos, mastócitos e eosinófilos, ativação de células B e diferenciação de células plasmáticas.

Células Th17: As células T helper 17 (Th17) são um subconjunto de células T helper pró-inflamatórias definidas pela sua produção de interleucina 17 (IL-17). Produzem sinais que inibem a diferenciação de Tregs (WILKE et al., 2011). As células Th17 desempenham um papel importante na manutenção das barreiras mucosas e contribuem para a eliminação de patógenos nas superfícies mucosas, mas também têm sido descritas em doenças autoimunes e inflamatórias.

CD45+ CD3+ CD8+: Células T citotóxicas (CTL) que reconhecem os peptídeos apresentados nas proteínas MHC de classe I e, após serem ativadas, induzem a apoptose da célula apresentadora através da secreção de perforinas, granzimas e FasL.

CD45+ CD3+ CD4+ CD25+: Este subgrupo é denominado células T reguladoras (Treg). As Tregs, depois de serem ativadas através do seu TCR específico, podem iniciar uma supressão da resposta imunológica de todos os outros subtipos de células T. Seu papel é essencial para a manutenção da tolerância periférica, prevenção de doenças autoimunes e limitação de doenças inflamatórias crônicas. Como resultado negativo, a sua presença parece limitar a imunidade antitumoral. De acordo com a análise de citometria de fluxo de marcadores de superfície, Tregs expressam continuamente o fator de transcrição FoxP3, visto como um marcador específico para Treg (GRAUER et al., 2007). A ausência do marcador CD127 em células CD4+CD25 + define a característica desta subpopulação, uma vez que a correlação entre a ausência de CD127 e a presença de FoxP3 sobre Tregs é superior a 90% (LIU et al., 2006). O mecanismo de imunossupressão por Tregs não é totalmente compreendido, mas inclui a depleção de aminoácidos, secreção de citocinas (TGF- β , IL-10) e inibição direta célula-célula, levando a um ambiente imunossupressor local (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

1.2.1.1.1.1 Células T CD8+

As células T CD8+ citotóxicas podem reconhecer antígenos relacionados ao tumor quando estes expressam o complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I (LIAU et al., 2000; PRINS & LIAU, 2003; YANG et al., 2004). Como componente principal do sistema imunológico adaptativo, as células T citotóxicas representam um biomarcador candidato da resposta imunológica associada ao tumor. As células T, particularmente as células T CD8, podem estar localizadas nas margens invasivas e no núcleo tumoral. A infiltração intratumoral aumentada de células T CD8 foi correlacionada com melhor resultado clínico na maioria dos cânceres, tais como melanoma, cabeça e pescoço, mama, bexiga, urotelial, ovário, colorretal, próstata e pulmonar. Uma exceção foi encontrada no câncer renal, onde um estudo relatou uma correlação positiva para sobrevida, enquanto que outro estudo produziu o resultado oposto. (FELDMEYER et al., 2013)

Os mecanismos pelos quais a infiltração espontânea de células T ocorre dentro dos tumores não estão claros, mas alterações epigenéticas e/ou mutações

podem influenciar esses fenótipos. No câncer colorretal, foi demonstrado que o perfil celular e molecular baseado na infiltração de tumores por células T prediz a sobrevivência melhor do que o estadiamento cirúrgico ou avaliação histológica de outros fatores de risco, tais como invasividade (GALON et al., 2006).

Estudos iniciais de infiltrados de células T em glioma indicaram que havia um subconjunto de gliomas com células T infiltrantes, mas não houve correlação clínica nestes estudos (RIDLEY & CAVANAGH, 1971; TAKEUCHI & BARNARD, 1976). Entretanto, 28% a 60% dos gliomas demonstraram infiltração tumoral com linfócitos. Vários estudos desde então confirmaram os diferentes graus de infiltração linfocítica em gliomas humanos com diferentes taxas de infiltração (FARMER et al., 1989; HITCHCOCK & MORRIS, 1988; STEVENS et al., 1988; VON HANWEHR et al., 1984).

Yang et al. (2010) analisaram a infiltração proliferativa de células T CD8 + em neoplasias de glioblastoma recentemente diagnosticados a fim de demonstrar que o aumento da infiltração de células T CD8 + era um fator prognóstico associado com um aumento da sobrevida a longo prazo. Foi demonstrado que os pacientes que têm infiltrado de células T CD8 + intermediário ou extenso no momento do diagnóstico com glioma tem maior sobrevida em relação aos pacientes com infiltrados de células T CD8 + raros ou focais (YANG et al., 2010).

Outros estudos caracterizaram os infiltrados linfocíticos em gliomas como uma mistura de diferentes linfócitos, incluindo células CD4+ e CD8+. (SAWAMURA et al., 1989). Embora nesses artigos foram reportados graus variáveis de infiltração linfocítica em gliomas, eles confirmam que a presença de infiltração linfocítica possui correlação com o desfecho clínico. Estes estudos sugerem que a natureza infiltrativa de células T CD8+, bem como a sua capacidade efetora, pode ter um papel crítico no prognóstico de pacientes com glioblastoma devido a sua ação antitumoral, induzindo uma resposta imunológica contra as células tumorais.

1.2.1.1.1.2 Células T CD4+

O papel das células T CD4 + é controverso devido ao seu número de subtipos suas diferentes funções no sistema imunológico (GU-TRANTIEN &

WILLARD-GALLO, 2013). As células T auxiliares CD4 + têm um papel central na iniciação e manutenção de respostas imunológicas contra o câncer, o que afeta significativamente a função das células T CD8 + (HO & GLIMCHER, 2002). No entanto, as células T reguladoras CD4 + suprimem a imunidade anti-tumoral e promovem a progressão tumoral (GOBERT et al., 2009; ZAMARRON & CHEN, 2011). Essa plasticidade das células T CD4 é dependente de ativação por citocinas no microambiente, sendo polarizadas para linhagens auxiliares múltiplas (incluindo Th1, Th2, Th17) com base nos perfis de secreção de citocinas ou induzidas para função de células T reguladoras (Figura 1) (ZHU & EMERSON, 2002).

O estado de polarização de CD4 nem sempre foi definido em estudos de imunologia tumoral, mas ambas as células T polarizadas para Th1 e Th2 foram descritas com função antitumoral (MATTEES et al., 2003; NISHIMURA et al., 1999). Mais recentemente, as células Th17 também foram descritas com uma forte atividade antitumoral (MARTIN-OROZCO et al., 2009), embora a sua utilização para a terapia de tumores cerebrais possa ser arriscado em vista da forte associação deste subconjunto com neuroinflamação autoimune.

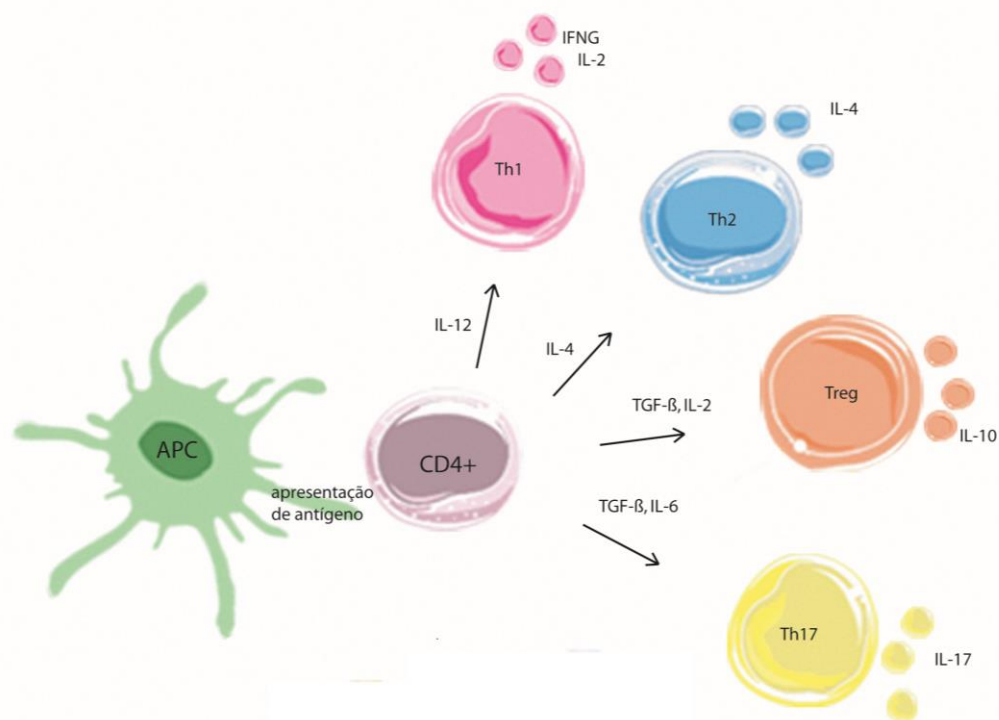


Figura 1. Diferenciação de células T CD4+. As células CD4+ podem reconhecer os peptídeos apresentados nas proteínas MHC-classe II e, após sua ativação através de células

apresentadoras de antígeno (APC), podem sofrer várias outras diferenciações e produzir diferentes citocinas.

Células T CD4 polarizadas por citocinas não só têm um perfil de secreção de citocinas diferente, mas também expressam diferentes receptores de quimiocinas e integrinas, que medeiam a migração seletiva para os tecidos (BROMLEY et al., 2008). A expressão de CCR5 e CXCR3 está particularmente associada a um fenótipo Th1, enquanto que CCR4 e CCR8 estão associados a um fenótipo Th2 (KIM et al., 2001; SYRBE et al., 1999). Para as integrinas, as células T CD4 Th1 apresentaram maior expressão de VLA-4 e VLA-6 (integrina $\alpha 6\beta 1$) do que as células Th2. Além disso, essas células Th1 apresentaram efeito *homing* e efeito terapêutico preferencial em um modelo de melanoma subcutâneo (SASAKI et al., 2009).

No entanto, a importância das células T CD4 + na atividade antitumoral tem resultados contraditórios e não foram amplamente estudadas em relação à gliomas. As células Th17 foram associadas à piora no prognóstico em estudos de pacientes com carcinoma colorretal (LIU et al., 2011; TOSOLINI et al., 2011), pulmonar (CHEN et al., 2010) e hepatocelular (ZHANG et al., 2009), enquanto foram associadas com melhor sobrevida em cânceres esofágicos (LV et al., 2011) e gástricos (CHEN et al., 2011). Estudos em modelos murinos relataram que a IL-17 (produzida pelas células TH17) favorece o crescimento tumoral em animais imunodeficientes pelo apoio à inflamação crônica, enquanto que favorece a rejeição tumoral em animais imunocompetentes, aumentando a resposta imunológica antitumoral (BENCHETRIT et al., 2002; TARTOUR et al., 1999; WILKE et al., 2011). As células Th2, através da ativação de células B ou da produção da citocina imunossupressora IL-10, parecem estar associadas a tumores agressivos. No entanto, células TH2 também estão associadas a um melhor prognóstico em linfoma de Hodgkin e no câncer de mama (SCHRECK et al., 2009; YOON et al., 2010), o que sugere um efeito protetor de anticorpos nestas doenças. Em contraste com outras populações de células T auxiliares, as células TH1 e as citocinas que produzem, tais como interferon- γ (IFN- γ), estão fortemente associadas a um melhor resultado clínico para todos os tipos de câncer. Assim, as células T citotóxicas, as células T de memória e as células TH1 podem ser associadas com uma sobrevivência prolongada; Enquanto que o efeito

diferencial de outras populações de células T auxiliares pode variar devido à sua plasticidade, sendo dependente do microambiente tumoral e do tipo tumoral (TABELA 1).

Han e colaboradores (2014) verificaram que os gliomas de alto grau apresentavam níveis mais elevados de CD4 + infiltrantes do que os gliomas de baixo grau, o que em combinação com níveis diminuídos de CD8 + nestes tumores, indicava uma diminuição da razão CD8/ CD4 em pacientes com glioma de alto grau (HAN et al., 2014). Waziri e colaboradores (2008) relataram que a maioria dos linfócitos CD4 + infiltrantes presentes no glioblastoma suprimem a resposta imunológica celular (WAZIRI et al., 2008). O aumento de CD4 e diminuição de CD8 em glioma de alto grau pode refletir a participação de linfócitos infiltrantes na progressão glioma. No entanto, mostrou-se que o número de CD8 sozinho não pode efetivamente prever o resultado do paciente em GBM. Por um lado, as células T auxiliares CD4+ desempenham papéis críticos no recrutamento, ativação e regulação da resposta imunológica adaptativa. Sem a ajuda adequada das células T CD4+, as células T CD8+ falham com frequência nas suas funções efetoras in vivo (BOS et al., 2012). Apesar desses resultados, a fração global de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) CD4+ não apresentou valor prognóstico significativo, o que poderia estar associado à complexidade de seus componentes e diferentes tipos de polarização.

Tabela 1. Efeito das diferentes células do sistema imunológico no prognóstico de pacientes com diversos tipos de câncer. Adaptado de Fridman et al., 2012

Localização do tumor	T CD8+	Th1	Th2	Th17	Treg
Pele (melanoma)	Bom				Sem efeito Ruim
Cabeça e pescoço	Bom			Nenhum	Bom
Mama	Bom	Bom Nenhum	Bom Nenhum		Nenhum Ruim
Ovário	Bom	Bom	Ruim		
Esôfago	Bom	Bom		Bom	
Colorretal	Bom	Bom		Ruim	Bom Nenhum
Rins	Bom Ruim	Bom			Ruim
Bexiga	Bom				Bom
Próstata	Bom				
Pulmão	Bom Nenhum	Bom		Ruim	Ruim
Pâncreas	Bom		Ruim		Ruim
Cervical		Bom			
Cerebral					Nenhum
Hepatocelular	Bom Ruim	Bom		Ruim	Ruim
Gástrico		Bom	Ruim	Bom	
Medular		Bom			
Urotelial	Bom				
Linfoma			Bom		Bom Nenhum Ruim

1.2.1.1.2 Células B

Considerando que o papel das células T na imunidade antitumoral de tumores cerebrais e periféricos tem sido extensivamente estudado, o envolvimento das células B na imunidade antitumoral ainda é mal compreendido.

As células B podem capturar e apresentar antígeno (CARRASCO & BATISTA, 2007; OKADA et al., 2005) diretamente às células T através de MHC I (HOFT et al., 2007; HON et al., 2005) e II (CLARK et al., 2004; RODRÍGUEZ-PINTO, 2005) após a regulação positiva de marcadores na sua superfície celular (EVANS et al., 2000).

A principal via de captação de antígeno por células B é através da ligação específica ao receptor de células B seguido por endocitose mediada por receptor. O antígeno é então processado e carregado em moléculas de MHC que são apresentadas na superfície das células B. Este processo de aquisição de antígeno pode ser repetido à medida que a célula B encontra e liga um antígeno adicional, concentrando assim o antígeno extracelular encontrado em baixa abundância e, subsequentemente, apresentando-os às células T (RODRÍGUEZ-PINTO, 2005). Embora as células T CD8 + citotóxicas estejam envolvidas na rejeição imunomediada dos tumores intracranianos (YANG et al., 2010), tem sido demonstrado que as células T CD8 + específicas do antígeno tumoral são tipicamente de vida curta (DUDLEY et al., 2001) as respostas imunológicas dependentes das células T requerem uma resposta auxiliar T CD4 + concomitante para aumentar a longevidade da resposta das células T CD8 + (KNUTSON et al., 2002).

Candolfi et al. (2011) demonstraram que as células B são recrutadas para o microambiente do tumor cerebral após o tratamento com Ad-TK + Ad-Flt3L e que elas podem detectar antígenos, transportá-los para os linfonodos drenantes e apresentá-los às células T, desempenhando um papel crítico como APCs na resposta imunológica contra tumores localizados dentro do cérebro. Utilizando camundongos KO deficientes em células B (Igh6 - / -) e anticorpos contra células B, verificou-se que essas células são necessárias para a regressão de GBM intracraniano em camundongos tratados com Ad-TK + Ad-Flt3L. Esses dados sugerem que as células B poderiam atuar como APCs, desempenhando um papel na expansão clonal de linfócitos T específicos de antígeno tumoral (CANDOLFI et al., 2011).

Em suporte a isto, verificou-se que as células B eram necessárias para a expansão clonal de células T específicas de antígenos tumorais. Um cenário alternativo mostra que as células B não estão diretamente envolvidas na

apresentação de antígenos tumorais para células T, mas podem estimular o contato de células T com células dendríticas através de sinais coestimuladores (CRAWFORD et al., 2006). As células B parecem colaborar com DCs na apresentação de antígenos extracelulares que desencadeiam a ativação de células T efetoras e a geração de células T de memória (CRAWFORD et al., 2006). Além disso, as células B parecem modular o perfil de citocinas liberadas por DCs ativadas (MOULIN et al., 2000). Inversamente, os DCs podem atuar na captura, retenção e transferência de antígenos não processados pelas células B (WYKES et al., 1998).

Assim, os linfócitos B parecem ter um papel durante a regressão do tumor cerebral e eles poderiam atuar como APCs, levando a uma imunidade antitumoral eficaz e memória imunológica contra tumores.

1.2.1.1.3 Células Natural Killer

As células assassinas naturais (*Natural Killer- NK*) são grandes linfócitos granulares da imunidade inata que estão envolvidos na imunossupressão tumoral. Estas células têm atividade citotóxica direta e também secretam citocinas pró-inflamatórias após ativação, como o IFN- γ (VIVIER et al., 2011). A ativação da atividade citolítica das células NK depende de um equilíbrio entre sinais inibitórios e ativadores, proporcionados pelas células hospedeiras (LANIER, 2008; VIVIER; NUNÈS; VÉLY, 2004).

Os receptores inibitórios incluem NKG2A (BORREGO et al., 1998) e *inhibitory killer immunoglobulin-like receptors* (KIRs) (PURDY & CAMPBELL, 2009; THIELENS et al., 2012) que reconhecem moléculas de MHC classe I, que geralmente estão subexpressas em células infectadas por vírus e células tumorais. Após ativação, as células NK induzem a apoptose das células alvo através da secreção de grânulos contendo perforinas e granzimas (TOPHAM & HEWITT, 2009) ou sinalizando via receptores de morte (ASHKENAZI, 2002).

As células NK desempenham um papel importante na imunidade antitumoral, uma vez que podem ser atribuídas a vigilância imunológica (WALDHAUER & STEINLE, 2008), a atividade antitumoral (SMYTH et al., 2002) e, portanto, possuindo significância prognóstica (HSIA et al., 2005; ISHIGAMI et al.,

2000) em vários tipos de cânceres. O potencial das células NK como células efectoras contra tumores cerebrais foi demonstrado *in vitro* (CASTRICONI et al., 2009; VILLEGAS et al., 2002) e *in vivo* (ALIZADEH et al., 2010; FRIESE et al., 2004; POLI et al., 2013).

No entanto, estudos observaram que na maioria dos casos de glioma as células NK estavam ausentes, enquanto os carcinomas metastáticos e craniofaringiomas eram mais frequentemente infiltrados pelas células NK. Foram detectadas células NK únicas em alguns meningiomas. Em todos os casos, as células NK constituíram uma fração menor em relação às outras células do sistema imunológico infiltrantes do tumor, levando à conclusão de que as células NK não desempenham um papel importante na imunidade antitumoral em tumores cerebrais (STEVENS et al., 1988). Resultados semelhantes foram obtidos para metástases cerebrais, com o uso do anticorpo IOT-10, que reconhece CD57, utilizado como marcador para células NK. Além disso, o grau de infiltração das células NK parecia variar dependendo da origem das metástases (VAQUERO et al., 1989)

Resultados contrastantes foram relatados por Yang e colaboradores (2011) em um trabalho mais recentemente publicado investigando infiltrados de células do sistema imunológico em glioblastomas e comparando-os com astrocitomas pilocíticos. Foi demonstrado que as células NK infiltraram frequentemente os glioblastomas, enquanto que essa infiltração foi insignificante nos astrocitomas pilocíticos. Portanto, os autores concluíram que as células NK podem desempenhar um papel importante na resposta imunológica antitumoral em pacientes com glioblastoma (YANG et al., 2011).

Em adição a isso, foi demonstrado que a presença de células NK correlaciona com melhor prognóstico em diversos tumores sólidos (HSIA et al., 2005; ISHIGAMI et al., 2000; KONDO et al., 2003; VILLEGAS et al., 2002). Um maior nível de infiltração de células CD57 positivas no tumor correlaciona-se com melhor sobrevida de pacientes com carcinoma escamoso esofágico (HSIA et al., 2005), câncer de pulmão escamoso (VILLEGAS et al., 2002) e carcinoma gástrico (ISHIGAMI et al., 2000). CD57 é expressa também em um subconjunto de células T (LOPEZ-VERGÈS et al., 2010), portanto, muito provavelmente, tanto a presença de células NK quanto de células T contribuem para melhores resultados

do paciente. Em outro estudo de Kondo e colaboradores (2003), uma alta atividade de células NK periféricas correlacionaram positivamente com maior sobrevivência de pacientes com câncer de cólon (KONDO et al., 2003). Também foi observado que as taxas cumulativas de 5 anos sem metástases eram maiores no grupo de pacientes com alta infiltração de células NK (90 vs. 60%). Estes dados sugerem que as células NK desempenham um papel importante no controle de metástases. Ainda, demonstrou-se que as células tumorais expressam ligantes que ativam receptores expressos em células NK (DE KRUIJF et al., 2012; ZHANG et al., 2012), tornando-os potencialmente suscetíveis a lise mediada por estas células.

Um ensaio clínico de fase I foi realizado, onde células NK autólogas foram utilizadas como células efectoras contra tumores cerebrais. Neste estudo, 9 pacientes com glioma maligno recorrente receberam injeção intracraniana ou intravenosa de células NK expandidas a partir de células mononucleares periféricas (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMC) dos pacientes. Em 4 dos 9 pacientes, a regressão tumoral foi registrada através de ressonância magnética (MRI). O benefício em termos de resultados de sobrevida não foi avaliado (ISHIKAWA et al., 2004). Uma combinação de terapia celular autóloga ou alogênica com células NK com outros tratamentos imunostimulantes poderia gerar melhores resultados em comparação com cada uma dessas estratégias aplicadas sozinhas.

Assim, as células NK parecem ter acesso limitado ao cérebro (POLI et al., 2013) e são a população de células do sistema imunológico menos abundante dentro do microambiente do tumor cerebral. O mecanismo de recrutamento de células NK para o microambiente tumoral merece atenção, uma vez que vários agentes terapêuticos experimentais demonstraram estimular respostas imunológicas antitumorais mediadas por células NK (ALIZADEH et al., 2010; FADUL et al., 2011; FRIESE et al., 2004; SEIDEL; SCHLEGEL; LANG, 2015) As células NK também podem influenciar a eficácia de outros tratamentos antitumorais (ALVAREZ-BRECKENRIDGE et al., 2012) e, portanto, sua tradução na clínica requer conhecimento prévio sobre o status imunológico dos pacientes.

1.2.1.2 Sistema imunológico pró-tumoral

O glioblastoma parece inibir a resposta imunológica antitumoral causando supressão imunológica sistêmica através de vários mecanismos hipotéticos. Uma porcentagem de pacientes foi descrita com infiltração de linfócitos no microambiente do tumor, incluindo células T reguladoras (Tregs). As células T reguladoras compreendem até 30% dos linfócitos infiltrantes de glioblastoma e podem suprimir as respostas das células T (JACOBS et al., 2009).

Os macrófagos e microglias associadas ao tumor também proporcionam um ambiente de suporte para o crescimento das células tumorais, inibem a expansão das células T CD8 + e CD4 + e apoiam a produção de Tregs (HUSSAIN et al., 2006). Outro tipo de célula que pode contribuir para o microambiente imunossupressor de glioblastomas são células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs). Estas células compreendem uma população heterogênea de células mieloides imaturas que mostraram ser significativamente aumentadas em pacientes com câncer e desempenham um papel importante na supressão de células T ativadas por glioblastoma, auxiliando na progressão tumoral (DUBINSKI et al., 2016).

Além da presença dessas células que auxiliam o crescimento tumoral, o principal fator limitante para respostas imunológicas efetivas parece ser a exaustão de células T (JIANG; LI; ZHU, 2015). Células T exaustas apresentam várias características, tais como perda significativa de funções efetoras, aumento de moléculas inibitórias no microambiente tumoral e um perfil metabólico alterado (WHERRY, 2011). Como sua atividade pode ser revertida modulando vias superexpressas em células exaustas (PAUKEN & WHERRY, 2015), uma abundância de evidências suporta a importância dos pontos de verificação imunológicos na exaustão de células T e na imunoterapia (GAO et al., 2013).

1.2.1.2.1 Macrófagos

Os macrófagos são células terminalmente diferenciadas da linhagem mielóide, com funções críticas no desenvolvimento e homeostase de tecidos (OKABE & MEDZHITOV, 2016). Estas células servem como uma ligação entre a

imunidade adaptativa e a inata, regulando respostas à inflamação e cicatrização de feridas (MOSSER & EDWARDS, 2008). Para facilitar estas diversas funções, os macrófagos empregam uma plasticidade considerável em resposta a uma gama de citocinas. Estas respostas enquadram-se num espectro de fenótipos que variam desde macrófagos pró-inflamatórios ativados classicamente (M1) a macrófagos anti-inflamatórios ativados alternativamente (M2) (XUE et al., 2014). Os macrófagos também possuem uma diversidade e plasticidade substanciais, com estudos recentes revelando importantes informações sobre as origens de desenvolvimento de macrófagos residentes em tecidos e descobrindo padrões de expressão gênica e de intensificação em tecidos específicos (GAUTIER et al., 2012; LAVIN et al., 2014; MASS et al., 2016; PERDIGUERO et al., 2015).

Embora o tecido local defina os perfis de transcrição de macrófagos e estados epigenéticos em homeostase (LAVIN et al., 2014), não é conhecido se um ambiente de tecido inflamatório pode promover diferenças entre populações de macrófagos de ontogénias distintas. Isto é particularmente relevante no câncer, em que os macrófagos associados a tumores (TAMs) são derivados de monócitos e também a partir de macrófagos residentes em tecidos (DU et al., 2008; PYONTECK et al., 2013; SOLGA et al., 2015).

A presença de macrófagos no cérebro ocorre apenas em condições de ruptura da barreira hematoencefálica através de irradiação ou manipulação química) num contexto não patológico (BRUTTGER et al., 2015; MILDNER et al., 2007). No entanto, os macrófagos associados ao glioblastoma são recrutados por uma variedade de sinais derivados de tumores, como o TGF- β (SICA et al., 2008), e presumivelmente adotam um fenótipo de suporte ao tumor capaz de mediar a supressão imunológica e promover a invasão (WU et al., 2010).

Os macrófagos classicamente ativados assumem o fenótipo M1, caracterizado pela expressão de STAT1, e são capazes de estimular respostas imunológicas antitumorais através da apresentação de antígenos a células do sistema imunológico adaptativo, produzindo citocinas pró-inflamatórias e a fagocitose de células tumorais (MARTINEZ et al., 2007). Em comparação, a via alternativamente ativada, M2, é caracterizada pela expressão dos receptores CD163, CD204, CD206 e STAT3 intracelular e caracteriza-se pela produção de citocinas imunossupressoras (POLLARD, 2004). A polarização M2 impede a

produção de citocinas necessárias para suportar células T CD8+, CD4 + Th1 e Th17 específicas de tumores e promove a função de células T CD4+ reguladoras de suporte tumoral.

Vários subtipos do macrófago M2 existem dependendo do programa inflamatório que é ativado e/ou requerido (MANTOVANI et al., 2004). O macrófago alternativamente ativado M2a é ativado pelas citocinas IL-4 e IL-13, e são especializados para realizar a resposta alérgica e a morte e encapsulação de parasitas. O macrófago M2b é ativado por ligação de TLRs e complexos imunológicos e pelo receptor de IL-1. Este subconjunto de macrófagos é o principal responsável pela regulação imunológica e ativação de Th2. O macrófago M2c, ativado pela citocina IL-10 e TGF- β , é o principal responsável pela deposição da matriz e remodelação de tecidos (MANTOVANI et al., 2004). Recentemente, foi identificado um quarto e distinto subtipo, denominado subconjunto M2d. Este subconjunto é ativado pela IL-6 e parece ter papel auxiliando na metástase e na progressão do tumor (DULUC et al., 2007). As células primárias responsáveis pela síntese dessas citocinas são eosinófilos, basófilos, células CD4 + Th2 e células tumorais (VOEHRINGER et al., 2004). Em geral, os macrófagos M2 fazem a modulação negativa da liberação de IL-1, IFN- γ , IL-12 e TNF- α . (D'ANDREA et al., 1993; DE WAAL MALEFYT et al., 1991)

As células-tronco tumorais de glioblastoma podem recrutar e polarizar microglia e macrófagos para um fenótipo M2, inibir a fagocitose e induzir a secreção de citocinas imunossupressoras, resultando na inibição da proliferação de células T (WU et al., 2010). Muitos estudos presumem a existência um elevado grau de acumulação de células polarizadas com M2 dentro do microambiente do glioblastoma (GABRUSIEWICZ et al., 2015; KOMOHARA et al., 2008; PROSNIAK et al., 2013) contribuindo para a imunossupressão e consequente progressão tumoral.

1.2.1.2.2 Microglia

Células microgliais são uma parcela abundante da população de células do SNC, compreendendo 5% a 20% da população total de células gliais, e são tão numerosas quanto neurônios (BENVENISTE, 1997; LAWSON et al., 1990;

LAWSON et al, 1992). Após um longo debate sobre o papel e a origem da microglia, elas foram estabelecidas como uma população celular funcionalmente distinta de células gliais de origem mielomonocítica (LING & WONG, 1993). Os precursores de microglia circulantes derivados de células hematopoiéticas mesodérmicas entram no cérebro em desenvolvimento durante os estágios perinatais e transformam-se em células de microglia. A microglia madura expressa uma variedade de marcadores específicos de macrófagos, incluindo receptores tipo Toll (TLR), (BSIBSI et al., 2002; OLSON; MILLER & 2004) a integrina CD11b, (AKIYAMA & MCGEER, 1990) e a glicoproteína de função desconhecida, F4/80. No entanto, essas células possuem níveis mais baixos de antígeno comum de leucócitos, CD45, quando comparados aos macrófagos (BECHER & ANTEL, 1996; DICK et al., 1995). Assim, a microglia está intimamente relacionada aos monócitos periféricos em relação às suas origens, atividade fagocitária e marcadores de superfície. Uma similaridade funcional crucial da microglia com macrófagos periféricos é a capacidade de gerar respostas imunológicas inatas e adaptativas significativas. As células de microglia ramificadas em repouso são ativadas por uma variedade de patologias do SNC, tais como infecção, lesão e doença neurodegenerativa, detectando lipopolissacarídeo (LPS), β -amilóide ($A\beta$), trombina, IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias (THAMEEM DHEEN et al., 2007).

Historicamente, o recrutamento de microglia em gliomas foi postulado como evidência da tentativa do CNS de afastar células neoplásicas em divisão (MORANTZ et al., 1979). No entanto, o paradoxo de continuar o crescimento agressivo de tumores apesar de altos níveis de infiltrados de microglia oferecia pouco apoio à atividade antitumoral da microglia. As microglias são localizadas difusamente em todo o tumor, e não apenas em áreas de necrose e, além disso, não é observada a fagocitose de células de glioma ou seus detritos através da micróglia (HAO et al., 2002).

Evidências recentes indicam que a microglia/macrófagos infiltrando gliomas pode promover o crescimento tumoral facilitando a imunossupressão do microambiente tumoral (BADIE & SCHATNER, 2001). As microglias são uma fonte celular de metaloproteases de matriz (MMP), enzimas de degradação da matriz extracelular. A sua liberação para o ambiente do tumor pode ajudar a

aumentar a propagação dos tumores, degradando a matriz extracelular de células normais e auxiliando na proliferação e migração de células tumorais (RAO, 2003). As microglias também liberam fatores de proliferação tumoral, incluindo fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LAFUENTE et al., 1999; TSAI et al., 1995). Esses achados sugerem que a microglia tem um papel integrador na progressão do tumor ao auxiliar a migração (MMP-9), angiogênese (VEGF) e proliferação (EGF) de células de glioma. Em adição a isto, as células de glioma secretam fatores imunomoduladores chave que suprimem a atividade imunológica de tipo 1, tais como IL-10, IL-4, IL-6, fator de crescimento transformante (TGF- β) e prostaglandina E2. As citocinas IL-10, IL-4 e IL-6 parecem induzir uma morfologia arredondada M2, que é típica da microglia ativada, enquanto que a citocina TGF- β inibe a proliferação de células microgliais e a expressão de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* (WU et al., 2010). Devido ao efeito dominante que as células de glioma e os seus fatores segregados têm nas células circundantes, é provável que a microglia recrutada por glioma adote preferencialmente um fenótipo M2.

Assim, a microglia associada à gliomas malignos parece incapaz de induzir uma resposta eficaz de células T antitumorais. No entanto, se a imunossupressão da microglia induzida por glioma puder ser superada, a imunidade do SNC contra tumores poderia ser significativamente aumentada. Carpentier e colaboradores (2000) demonstraram sobrevivência em longo prazo de animais com glioma utilizando uma única injeção intratumoral de oligodesoxinucleótido CpG, uma sequência imunoestimuladora que sinaliza através de TLR9 a indução da produção de IFN- α , IFN- β , IL-12, e TNF- α (CARPENTIER et al., 2000; CARPENTIER et al., 2003). No entanto, os animais com macrófagos/microglia deletados foram incapazes de rejeitar o tumor após o tratamento com CpG, mostrando que a microglia/macrófagos são componentes críticos de uma resposta antitumoral (AUF et al., 2001).

Portanto, a modulação das interações microglia-glioma pode fornecer estratégias para manipulação do microambiente do glioma, objetivando a geração de uma resposta imunológica antitumoral específica e duradoura.

1.2.1.2.3 Células Supressoras derivadas de Mieloides

As células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) são uma população heterogênea de células mielóides que estão significativamente expandidas em pacientes com câncer e estão associadas à progressão tumoral e a uma baixa sobrevida global (NAGARAJ & GABRILOVICH, 2010). As MDSCs também desempenham um papel em outras condições patológicas, tais como inflamação, infecção aguda e crônica, trauma e algumas doenças autoimunes (BRONTE et al., 2001; GABRILOVICH & NAGARAJ, 2009; UGEL et al., 2009). Elas expressam o marcador mielóide comum CD33, mas não têm a expressão do marcador mielóide maduro HLADR (ALMAND et al., 2001). As principais subpopulações de MDSCs em seres humanos incluem neutrofílico (CD15 + CD33 + HLADR2), monocítico (CD14 + CD33 + HLADR2) e linhagem negativa (CD152 CD142CD33 + HLADR2) (TALMADGE, 2007).

Dados recentes de vários grupos demonstram que essas células são responsáveis pela supressão imunológica tumoral tanto em camundongos como em seres humanos (KO et al., 2009; OZAO-CHOY et al., 2009). As MDSCs podem suprimir a função das células T por vários mecanismos, incluindo a produção de arginase, que diminui o nível de L-arginina, aminoácido essencial para a função normal das células T. Os níveis reduzidos de arginina parecem reduzir a expressão da cadeia do receptor de células T, promovendo a disfunção das mesmas (RODRÍGUEZ & OCHOA, 2008). Estas células também secretam óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS), que também são capazes de induzir a supressão de células T (NAGARAJ; GABRILOVICH, 2007).

Em humanos, as MDSCs foram encontradas em pacientes com tumores sólidos e linfáticos, bem como em trauma e sepse. Verificou-se que a quantidade de MDSC isolados em pacientes com tumores se correlaciona positivamente com a progressão do tumor e com a metástase. Um número significativo de fenótipos diferentes foi documentado em tumores de diferentes origens (PERANZONI et al., 2010; SOLITO et al., 2014).

No sangue de pacientes com glioblastoma recém-diagnosticado, foram identificadas três populações de células mieloides: o subconjunto monocítico predominante de MDSCs (CD33 + CD11b + CD14highCD15-), uma população

menor de MDSCs neutrofílicos expressando CD33 + CD11b + CD14^{low}CD15⁺, e monocíticos (CD11b + CD14^{low}) (PARKER; BEURY; OSTRAND-ROSENBERG, 2015; RAYCHAUDHURI et al., 2011). Dentre os subtipos de glioblastoma, o subtipo clássico apresentou uma percentagem marcadamente mais elevada de MDSC do que de macrófagos, enquanto que o subtipo mesenquimal foi principalmente infiltrado com micróglia (GABRUSIEWICZ et al., 2016).

Altos níveis de MDSCs monocíticos foram encontrados em pacientes com glioblastoma e essas células parecem representar uma subpopulação principal de MDSCs no sangue desses pacientes (GIELEN et al., 2015). Além disso, tem sido demonstrado que os pacientes com câncer avançado apresentam níveis elevados de neutrófilos no sangue (SCHMIDT et al., 2005), o que também foi observado em pacientes com glioblastoma. Também foi encontrada uma relação entre o número de neutrófilos infiltrantes no tumor está e o grau de glioma (FOSSATI et al., 1999) e é um fator prognóstico negativo para a sobrevida dos pacientes (MCNAMARA et al., 2014).

O aumento da imunidade antitumoral pode ser possível com remoção de MDSCs ou forçando a sua diferenciação. De fato, a remoção de células supressoras mieloides produtoras de arginase ou o bloqueio da atividade da arginase melhoraram a função das células T em modelos de camundongos portadores de tumores e em pacientes com carcinoma de células renais (RCC) (OZAO-CHOY et al., 2009), sendo as MDSCs um possível alvo terapêutico para pacientes com câncer. Em glioblastoma, a remoção de MDSCs das células mononucleares do sangue periférico com pérolas revestidas com anti-CD33/CD15 restaurou significativamente a função das células T. Também foram observados aumentos significativos na atividade da arginase e nos níveis de G-CSF em amostras de plasma obtidas de doentes com glioblastoma. O aumento dos níveis plasmáticos de arginase e G-CSF parece ter relação com a função supressora e expansão das MDSC, respectivamente, em doentes com glioma (RAYCHAUDHURI et al., 2011).

1.2.1.2.4 Células T reguladoras

As células T reguladoras, que normalmente representam apenas 5-10% de todas as células T CD4+ circulantes, são classicamente definidas como células que possuem a capacidade de suprimir a proliferação de qualquer célula T efetora secretora de citocinas, através da regulação negativa de IL-2 e/ou produção de interferon-gama (IFN- γ). As células T reguladoras expressam constitutivamente o fator de transcrição nuclear, FoxP3, bem como o receptor alfa de interleucina-2 residente na membrana celular (IL-2R α ,CD25), antígeno-linfócito T citotóxico-4 (CTLA-4), receptor de TNF induzido por glicocorticoide (GITR), e receptor membro da superfamília de TNF, OX40 (CD134) (WAINWRIGHT et al., 2014).

Em condições fisiológicas normais, as Tregs atuam mantendo a tolerância a antígenos hospedeiros e estranhos, resultando na inibição de autoimunidade e contribuindo uma resposta de células T efetoras produtivas. Em contrapartida, a desregulação de Tregs, quer sob a forma de perda ou ganho de função, pode gerar diferentes efeitos. A diminuição na quantidade de Tregs contribui para um estado patológico autoimune. Por outro lado, o seu acúmulo contribui para um estado patológico carcinogênico (BENNETT et al., 2001).

Tumores recrutam Tregs FoxP3+ e este acúmulo tende a ser progressivo, dependendo da classificação do tumor (EL ANDALOUSSI & LESNIAK, 2007; SAVAGE et al., 2013). Para a maioria dos cânceres, o acúmulo de Tregs está associado com uma resposta imune antitumoral ineficiente (ONIZUKA et al., 1999; SHIMIZU; YAMAZAKI; SAKAGUCHI, 1999; TURK et al., 2004). Nestes estudos, a eliminação de Tregs CD25+ resulta na rejeição de tumores mediada por células T CD8+. Existem evidências que suportam a hipótese de que os tumores convertem CD4+FoxP3- em CD4+FoxP3+ (iTreg - Treg induzida) por sinais tumorais, enquanto outros sugerem que nTregs (Tregs naturais) são recrutados e/ou expandidos pelo tumor. No entanto, a razão entre nTreg e iTreg num tumor específico pode depender da localização anatômica, grau de tumor e origem celular (CURIEL et al., 2004; HINDLEY et al., 2011; LIU et al., 2007; NISHIKAWA et al., 2003; VALZASINA et al., 2006).

Estudos identificaram um aumento progressivo no número de Tregs CD25+ FoxP3+ em astrocitomas de grau II, III e IV (GBM) da OMS,

respectivamente, na circulação periférica ou no tumor de gliomas ressecados humanos (EL ANDALOUSSI; LESNIAK, 2007; FECCI et al., 2006; HEIMBERGER et al., 2008). Observações subseqüentes verificaram que a população de Tregs naturais derivadas do timo representavam a população predominante de células T CD4+ FoxP3+ em tumores cerebrais (WAINWRIGHT et al., 2011).

No microambiente de glioma, as células T efetoras antitumorais podem ser criticamente suprimidas e/ou sobrecarregadas por Tregs. Através da análise de tecido de glioma humano obtido de biópsias, foram identificadas células T CD8+ CD25-, indicando que estas células efetoras estão inativadas e não proliferam. (HUSSAIN et al., 2006). As células T CD4+ eram mais numerosas do que as células T CD8+ dentro dos gliomas e a maioria das células T CD4+ eram Tregs, evidenciado por coloração intracelular positiva para Foxp3. Em outro estudo, as células T CD4+/CD25+/Foxp3+ foram encontradas apenas em gliomas, mas não no tecido cerebral de controle (EL ANDALOUSSI & LESNIAK, 2006). A presença de Tregs no microambiente de glioma é consequência da liberação de CCL2 por gliomas, que induz a migração de Tregs (JORDAN et al., 2008). Finalmente, em modelos murinos de glioma, observou-se um acúmulo dependente do tempo de Tregs em tumores cerebrais (GRAUER et al., 2007). Estes dados indicam que Tregs podem não apenas inibir a ativação sistêmica inicial do sistema imunológico tumoral, mas também prevenir as respostas das células T efetoras no microambiente do tumor.

Uma vez que a presença de Tregs Foxp3+ se correlaciona com o comportamento maligno geral dos tumores astrocíticos, a presença de Tregs no microambiente tumoral pode atuar como indicador prognóstico. Um estudo em modelos murinos de tumores cerebrais malignos tratados com anticorpo anti-CD25 resultou numa diminuição de Tregs infiltrantes no cérebro, enquanto que as células efetoras CD4+ e CD8+ aumentaram e puderam exercer a sua atividade citotóxica nas células tumorais (MAES et al., 2013). Numa perspectiva clínica, Sampson e colaboradores (2012) demonstraram em um estudo piloto que o tratamento com daclizumab, um mAb terapêutico anti-CD25 humanizado, esgota Tregs e se correlaciona com imunidade aumentada em pacientes com glioblastoma (SAMPSON et al., 2012). Assim, imunomodulação de Tregs em

glioblastoma pode ser um meio de aumentar a imunogenicidade de GBM, reduzindo a progressão tumoral e melhorando o prognóstico dos pacientes.

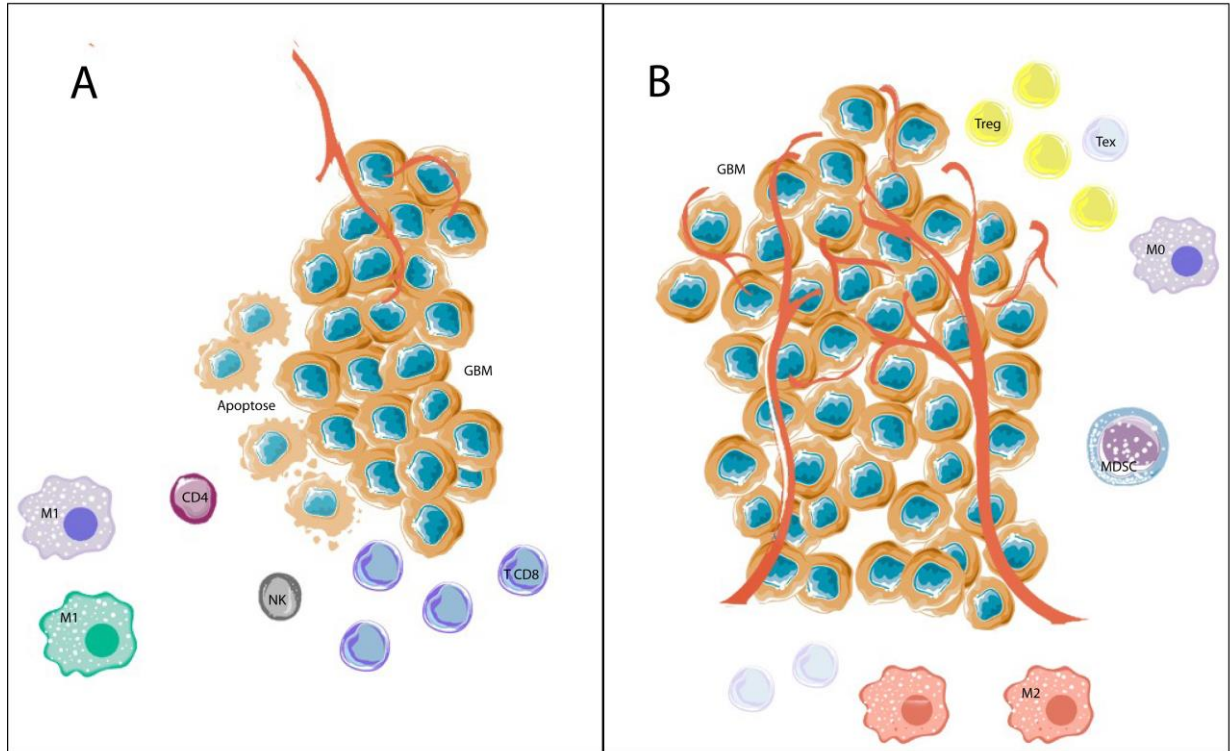


Figura 2. Efeitos do sistema imunológico em GBM de acordo com o microambiente tumoral.

A) A proliferação e invasão do tumor GBM é afetado negativamente quando as células T reconhecem antígenos associados ao tumor, resultando no reconhecimento das células tumorais e suas conseqüentes apoptoses, reduzindo a massa tumoral. B) Mobilização de células T regulatórias e células supressoras derivadas de mieloides no tumor, polarizando os macrófagos associados a tumor e resultando em um ambiente pró tumorigênico, que resulta no aumento da progressão tumoral, angiogênese e invasão, bem como a exaustão das células T citotóxicas do microambiente tumoral. *Adaptado de Ha et al., 2014.*

Tabela 2. Papel das células do sistema imunológico e inflamatórias na resposta imunológica anti-tumoral e pró-tumoral. Adaptado de Grivennikov et al., 2010

Tipo Celular	Papel anti-tumoral	Papel Pró-tumoral
Macrófagos, MDSC	Apresentação de antígeno; Produção de citocinas (IL-12 e IFN)	Imunossupressão; Produção de citocinas, quimiocinas, proteases, fatores de crescimento e fatores de angiogênese
Células B	Produção de anticorpos tumor-específicos*	Produção de citocinas e anticorpos; ativação de mastócitos; imunossupressão
Células T CD8+	Lise de células tumorais; produção de citocinas citotóxicas	Produção de citocinas*
Células T CD4+ Th1	Ajuda os linfócitos T citotóxicos (CTLs) na rejeição do tumor; produção de citocinas	Produção de citocinas
Células T CD4+ Th2		Induz polarização de macrófagos; Produção de citocinas; Ativação de células B
Células T CD4+ Th17	Ativação de CTLs	Produção de citocinas
Células T CD4+ Tregs	Supressão da inflamação (citocinas e outras moléculas supressoras)	Imunossupressão; Produção de citocinas
Células Natural Killer	Citotoxicidade direta contra as células tumorais; produção de citocinas citotóxicas	
Células T Natural Killer	Citotoxicidade direta contra as células tumorais; produção de citocinas citotóxicas	

*mecanismo hipotético

1.3 Mecanismos de exaustão da resposta imunológica antitumoral

Como foi descrito anteriormente, durante a tumorigênese, as células T podem ter acesso ao local dos glioblastomas; Contudo, a falta de rejeição do tumor sugere que as células T infiltradas são funcionalmente deficientes, inativadas ou eliminadas. Historicamente, Brooks e colaboradores (1972) relataram pela primeira vez que os pacientes com tumores intracranianos primários com imunidade deprimida mediada por células (BROOKS et al., 1972); De fato, uma redução dramática no número de células T CD4+ e CD8+ dentro do tumor e no sistema periférico parece ser comum em pacientes com glioblastoma (KMIECIK et al., 2013; RAYCHAUDHURI et al., 2015) e a população de células T parece estar mais propensa a exaustão. Um estudo relatou que a sinalização mediada por TCR é defeituosa em células T obtidas de pacientes com tumores

cerebrais primários (MORFORD et al., 1997). A maioria das células T quando estimuladas são incapazes de entrar na fase G1 do ciclo celular ou sofrer expansão clonal subsequente (ELLIOTT et al., 1984). Além disso, as células T apresentam defeitos em suas funções efetoras, como uma baixa efetividade citotóxica contra células tumorais e uma resposta discreta a mitógenos (BROOKS; ROSZMAN; ROGERS, 1976).

A recuperação de linfócitos T esgotados precocemente pode proporcionar benefícios clínicos a pacientes com câncer, incluindo o glioblastoma. Terapias em células dendríticas pulsadas com lisado tumoral levaram a uma expansão significativa e a uma elevada função citotóxica das células T CD8 + em pacientes com glioblastoma (JOHN et al., 2004). A vacina peptídica isolada ou combinada com o adjuvante ácido poliinosínico-policitidílico (poli-ICLC) reprogramou células T exaustas em pacientes com glioma e aumentou o número de células T efetoras na circulação (OKADA et al., 2015). Assim, existe um interesse considerável em evitar ou inverter a exaustão de células T. Para isso, é necessário um melhor entendimento dos mecanismos de exaustão de células T e dos fatores envolvidos nesse processo.

A amplitude e a qualidade de respostas de células T é regulada por um equilíbrio entre sinais coestimuladores e inibitórios. Em muitos cânceres, as células tumorais tendem a superexpressar moléculas inibitórias que, em última instância, atenuam as respostas das células T. Numerosos pontos de controle imunológica tem sido descritos, incluindo CTLA-4 e PD-1, que são amplamente estudados e tem importante papel na exaustão de células T.

1.3.1 Pontos de parada do sistema imunológico

O CTLA-4 regula primariamente a amplitude dos estágios iniciais da ativação das células T (BRUNET et al., 1987). Esta molécula neutraliza a atividade do receptor coestimulador das células T, CD28 (MCCOY & LE GROS, 1999). CD28 e CTLA-4 partilham ligantes idênticos: CD80 (também conhecido como B7.1) e CD86 (também conhecido como B7.2).

Há evidências crescentes que indicam que as fosfatases de proteínas, tais como SHP2 (também conhecidas como PTPN11) e PP2A desempenham papéis

chave na liberação destes sinais inibitórios (RUDD & SCHNEIDER, 2003). A PP2A desempenha um papel proeminente na inibição mediada por CTLA-4 da fosforilação de Akt (PARRY et al., 2005). Além disso, o CTLA-4 também contribui para as funções supressoras de Tregs (WING et al., 2008). Portanto, o bloqueio de CTLA-4 pode atenuar as suas funções inibitórias em células T e inibir as propriedades supressoras de Tregs que por sua vez podem inverter a exaustão de células T.

Existem resultados conflitantes para a terapia de bloqueio de CTLA-4 no glioblastoma. Os anticorpos de bloqueio contra CTLA-4 inverteram a exaustão de células T e prolongaram a sobrevivência de murinos portadores de tumor injetados com anticorpo anti-CTLA-4 (VOM BERG et al., 2013). No entanto, outro estudo em modelo murino de glioblastoma relatou que, em comparação com outros inibidores de controle imunológico, o bloqueio CTLA-4 tem o menor efeito nas respostas antitumorais e na sobrevivência (WAINWRIGHT et al., 2014). A eficácia da terapia de bloqueio de CTLA-4 pode ser aumentada por outras estratégias, tais como a vacinação com células de glioma que expressam GM-CSF ou com a administração de IL-12 (AGARWALLA et al., 2012; VOM BERG et al., 2013). O bloqueio combinado de CTLA-4 e PD-1 aumenta a taxa de sobrevivência de camundongos com tumor cerebral (WAINWRIGHT et al., 2014), e a combinação de bloqueio de CTLA com outros inibidores de ponto de controle parece aumentar a eficácia terapêutica.

O PD-1 desempenha um papel importante na inibição das respostas das células T. PD-1 expressa em células T pode interagir com dois ligantes diferentes: PD-L1 (também conhecido como B7-H1 e CD274) e PD-L2 (também conhecido como B7-DC e CD273) (KEIR et al., 2008). Em contraste com a CTLA-4, que afeta a ativação das células T, PD-1 regula as funções das células T efetoras (WEI et al., 2013). Além disso, o PD-1 recruta SHP-2 e inibe a fosforilação de Akt, e assim previne a ativação de células T mediada por CD28 e pela via PI3K / Akt (KEIR et al., 2008; PATSOUKIS et al., 2015). Assim, esta via desempenha um papel crucial na coordenação de reprogramação imunológica e metabólica, a fim de promover a diferenciação efetiva de células T em resposta ao antígeno.

Diferentes tipos de células tumorais, incluindo o glioblastoma, demonstraram utilizar a via PD-1:PD-L para escapar da resposta imunológica

adaptativa. A expressão de PD-L1 em pacientes com glioblastoma e linhagens celulares GBM é frequente (80% dos tumores de glioblastoma expressam PD-L1) (BERGHOFF et al., 2015; NDUOM et al., 2015; WINTTERLE et al., 2003), mas está provavelmente limitada a uma subpopulação minoritária de células tumorais dentro do tecido de glioblastoma e outras malignidades. Além disso, as células de glioma aumentam a expressão de PD-L1 em monócitos através de um mecanismo dependente de IL-10 a fim de produzir um fenótipo mais imunossupressor; Estes monócitos induzem a apoptose das células T pela interação PD-L1 / PD-1 (BLOCH et al., 2013).

O aumento da expressão de PD-L1 em pacientes com glioblastoma parece ser semelhante ou até maior do que em outros tipos de câncer, como melanoma e câncer de pulmão (NDUOM et al., 2015; VELCHETI et al., 2014; WEBER et al., 2013). Também é importante ressaltar que o crescimento das formas mais malignas de glioma é favorecido pela seleção de células tumorais com um alto nível de expressão de PD-L1 (YAO et al., 2009). O conteúdo de PD-1 e seu ligante também está correlacionado com mau prognóstico e menor sobrevida em pacientes com glioblastoma (NDUOM et al., 2015).

Estudos *in vitro* mostram que, na presença de um anticorpo neutralizante para PD-L1, os níveis de IFN- γ e IL-2 produzidos pelas células T CD4 + e CD8 + são significativamente aumentados, assim como o nível do marcador de ativação de células T CD69 (WINTTERLE et al., 2003). O bloqueio de PD-1 em modelos murinos de glioblastoma produz efeitos antitumorais e benefícios de sobrevivência ainda maiores do que o bloqueio de CTLA-4 (WAINWRIGHT et al., 2014; ZENG et al., 2013). A eficácia do bloqueio PD-1 é elevada quando combinada com a inibição de outras moléculas de verificação imunológica ou com radioterapia (ZENG et al., 2013). O benefício clínico de bloquear pontos de verificação do sistema imunológico parece estar correlacionado com uma maior carga mutacional do tumor, um número elevado de células T intratumorais e altos níveis de PD-1.

1.3.2 Mudanças no metabolismo energético do sistema nervoso central

Existem evidências substanciais de que no microambiente do tumor cerebral os níveis de glicose são muito menores do que no soro (FLAVAHAN et al., 2013), e que há competição por nutrientes entre células neurais, imunológicas e tumorais. Em comparação com outros órgãos, o cérebro é o que mais necessita de energia; Aproximadamente 25% da glicose consumida pelo corpo humano é dedicada a funções cerebrais, embora o cérebro represente apenas cerca de 2% da massa corporal total (MERGENTHALER et al., 2013).

No SNC, os neurônios têm a maior demanda de energia e a disponibilidade de glicose é fortemente regulada (HOWARTH et al., 2012). Além da manutenção e função celular neuronal, a glicose é crucial para a geração de neurotransmissores (SIBSON et al., 1998). Neurônios e células cancerosas estão entre os tipos celulares que dependem quase exclusivamente do metabolismo da glicose para a sobrevivência e a produção de energia (VAUGHN & DESHMUKH, 2008). Como os neurônios têm uma vulnerabilidade inerente a estresses e pouca capacidade de auto-reparo, a interrupção do metabolismo normal da glicose pode ocasionar várias doenças cerebrais (MERGENTHALER et al., 2013). Entre as células neurais, os astrócitos também dependem do metabolismo glicolítico e exibem uma taxa glicolítica elevada; A glicose é absorvida pelos astrócitos e convertida em lactato, que é então utilizado pelos neurônios. Além disso, oligodendrócitos também metabolizam a glicose, com uma taxa de consumo de glicose comparável à dos astrócitos (AMARAL et al., 2016).

A glicose entra no cérebro do sangue atravessando o BBB através do transportador de glicose 1 (GLUT1) (MORGELLO et al., 1995). GLUT1 também medeia a captação de glicose a partir de fluido extracelular para astrócitos, oligodendrócitos e neurônios. Além disso, os neurônios expressam GLUT3, que tem cinco vezes mais afinidade e taxa de transporte de glicose do que GLUT1 (VANNUCCI et al., 1997). A expressão de GLUT3 nos neurônios é superexpressa quando a concentração de glicose é baixa no microambiente, permitindo que os neurônios compitam mais eficientemente pela glicose (FLAVAHAN et al., 2013; VANNUCCI et al., 1997). A via de sinalização PI3K / Akt / mTOR é a via na qual

as células neurais usam para suprir as suas demandas energéticas através da glicólise (Agostini et al., 2016).

A maioria das células tumorais tem uma maior captação de glicose e obtém energia através da glicólise, um fenômeno conhecido como o efeito Warburg (WARBURG, 1956). Conseqüentemente, as células de glioma expressam níveis elevados de GLUT1 (e a sua captação de glicose excede a de células normais no cérebro (SPENCE et al., 2002). A via de Akt / mTOR parece ser um fator crucial para a modulação do consumo de glicose e a glicólise em células de glioblastoma (MASUI et al., 2013).

No glioblastoma humano, Akt é altamente ativado, e isso promove a captação de glicose e glicólise; O bloqueio da ativação de Akt inibe o crescimento celular sob estresse de baixa glicose (HOU et al., 2015). Este elevado nível de glicólise em células de glioma parece ser facilitado por mutações nos genes que codificam supressores de tumor, tais como PTEN, que normalmente antagoniza a via PI3K / Akt (BECKNER et al., 2005). Entre as células transformadas no glioblastoma, apenas células tronco tumorais parecem expressar níveis elevados de GLUT3, o que lhes permite superar outras células no microambiente tumoral na competição por glicose (FLAVAHAN et al., 2013).

As células T também requerem aumento da captação de glicose e glicólise para suportar as elevadas demandas energéticas e biossintéticas de proliferação, bem como executar suas funções efetoras (HO et al., 2015). A proliferação de células T é inibida na ausência de glicose, mesmo na presença de outros nutrientes, tais como ácidos graxos e glutamina (JACOBS et al., 2008). Como os linfócitos em repouso não têm grandes reservas internas de glicogênio, eles são altamente dependentes da importação de glicose extracelular via GLUT1 para atender às crescentes necessidades metabólicas (MACINTYRE et al., 2014). Se o GLUT1 não for suficientemente expresso nas células T, ou se um nível apropriado de glicose no microambiente tumoral não estiver presente, consumo de glicose diminui para um nível abaixo do necessário para suportar as demandas energéticas celulares, levando à exaustão dessas células (SISKA et al., 2016).

Apoiando esta noção, as células T exaustas precocemente exibem um perfil metabólico distinto, com expressão reduzida de genes envolvidos na glicólise, em comparação com as células T naïve e efetoras, apresentando

defeitos na glicólise (BENGSCHE et al., 2016). Com base nestas evidências, parece que este perfil metabólico alterado pode ser um fator adicional que contribui para a exaustão de células T.

A glicólise de células T também é manipulada por pontos de controle imunológicos. A expressão de PD-1, PDL1, e CTLA-4 em células T perturbam a ativação ideal de PI3K / Akt / mTOR e prejudica a glicólise de linfócitos (FRANCISCO et al., 2009; PARRY et al., 2005). Conforme mencionado anteriormente, a ligação de PD-1 em células T suprime caminhos a jusante tal como Akt / mTOR e anula a expressão de GLUT1, diminuindo a captação de glicose (PATSOUKIS et al., 2015). CTLA-4 inibe a expressão de GLUT1 mais fortemente em relação à inibição induzida por PD-1 (PATSOUKIS et al., 2015), 2015). Além disso, CTLA-4 bloqueia a ativação de Akt e os efeitos metabólicos coestimulatórios de CD28 (FRAUWIRTH et al., 2002). Consequentemente, as células T que recebem sinais CTLA-4 e PD-1 não podem consumir adequadamente glicose através da glicólise; Portanto, o bloqueio desses pontos de controle imunológico permite a glicólise de células T e a produção de IFN- γ (CHANG et al., 2015).

A consequência metabólica de PD-1 e PD-L em células tumorais é oposta à das células T. A expressão de PD-L1 promove a glicólise em células tumorais através da ativação da via Akt / mTOR, e há uma correlação entre o bloqueio PD-L1 em células tumorais e aumento dos níveis de glicose no ambiente tumoral (CHANG et al., 2015). A expressão de PD-L1 aumenta a taxa de glicólise em células tumorais independentemente da ligação com PD-1, e o knockout PD-L1 diminui consideravelmente a glicólise dessas células através da inibição da atividade de Akt / mTOR (CHANG et al., 2015). Assim, o PD-L1 não apenas fornece sinais inibitórios para as células T através de PD-1, mas também aumenta a glicólise tumoral e diminuindo a disponibilidade de glicose para as células T dentro do tumor.

Em contrapartida, a expressão de PD-L1 em neurônios pode induzir apoptose em células de glioblastoma (LIU et al., 2013). Embora os mecanismos desse evento não sejam claros, PD-L1 pode permitir que as células neurais esgotem a glicose disponível no microambiente, inibindo o crescimento de células tumorais. Como a sinalização de Akt / mTOR tem um papel crucial na regulação

do metabolismo da glicose em células neurais (AGOSTINI et al., 2016), a PD-L1 pode induzir captação de glicose através dessa via.

As células T parcialmente exaustas poderiam ser recuperadas através de melhorias na captação de glicose ou reforçando a expressão de reguladores da glicólise (BENGSCHE et al., 2016); Isto, combinado com bloqueio de reguladores imunológicos, poderia aumentar a eficácia da terapia antitumoral. Para isso, os efeitos divergentes de PD-1/PD-L1 na via de sinalização PI3K / Akt / mTOR em células tumorais, células T e células neurais no glioblastoma merecem ser explorados.

A delimitação das vias metabólicas diferencialmente utilizadas pelas células glioblastoma, neural e T poderia revelar alvos terapêuticos no glioblastoma.

1.4 Imunoterapia e morte celular imunogênica

Como foi descrito anteriormente, o sistema imunológico desempenha um papel vital na formação e estabelecimento de tumores, tendo funções protetoras do hospedeiro e promotoras de tumores. Este processo imunológico é descrito como "imuno-edição do câncer" ou os "três E's" (DUNN et al., 2004). "Eliminação", quando as células transformadas são destruídas com sucesso por um sistema imunológico competente. No entanto, as células tumorais podem sobreviver à destruição imunológica e podem entrar numa fase subsequente chamada "Equilíbrio"; em que a imuno-edição ocorre por meio de mutação de antígeno associada a células, ocorrendo regulação negativa, supressão e/ou sobrevivência seletiva de certas subpopulações negativas ou positivas para antígeno, envolvendo a regulação negativa de MHC-II e aumento da expressão de CTLA-4, PD-1, IL-10 e TGF- β , além do recrutamento de células T reguladoras a fim de suprimir a resposta imunológica (FECCHI et al., 2006; JACOBS et al., 2009). A última fase, definida como "Escape" apresenta o principal desafio para a imunoterapia. 'Escape' ocorre quando os tumores imunologicamente editados crescem e apresentam em um ambiente clínico, estabelecendo um microambiente tumoral imunossupressor, onde a atividade de linfócitos infiltrantes no tumor é suprimida (DUNN et al., 2004).

A Imunoterapia é um tratamento atraente de gliomas porque permite a especificidade do tumor, minimizando os danos colaterais para o tecido cerebral normal. Abordagens imunoterapêuticas podem ser categorizadas como ativas ou passivas, podendo ser resumidas em várias estratégias diferentes, incluindo as estratégias de inibição de pontos de verificação imunológica, terapia de células adotivas, terapias baseadas em células dendríticas e vacinação de peptídeos. A imunoterapia passiva envolve a transferência direta de células do sistema imunológico efetoras em pacientes para induzir um efeito antitumoral; Tais células efetoras incluem células NK e células ativadas com linfocinas (*lymphokine-activated killer* - LAK), mas também podem envolver o uso de anticorpos ou toxinas direcionadas. A imunoterapia ativa visa promover a ativação de uma resposta imunológica do tipo Th1 através de vacinas de tumor, estimulantes imunológicos não específicos ou vacinas celulares, como células dendríticas ou vacinas de células tumorais (Tivnan et al., 2017).

1.4.1 Inibidores de pontos de verificação imunológicos

Inibidores de ponto de verificação têm como alvo moléculas que atuam como pontos de verificação da resposta imunológica, aumentando as respostas imunológicas anti-câncer pré-existentes. CTLA-4 e PD-1, com os seus ligantes correspondentes (CD80 / CD86, PD-L1 e PD-L2) são as proteínas de controle imunológico mais estudadas no câncer (SANGRO et al., 2013).

Diversos estudos clínicos e pré-clínicos têm sido feitos tendo como alvos os pontos de verificação imunológicos em diversos tipos de câncer. O Ipilimumab, um anticorpo humanizado CTLA-4, foi o primeiro inibidor de controle imunológico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Extensas pesquisas clínicas com o ipilimumab têm sido realizadas no tratamento do melanoma metastático, em que há uma taxa de cura de aproximadamente 2% (HODI et al., 2010). Estudos pré-clínicos de glioma tratados com anticorpo monoclonal (mAb) CTLA-4 (clone 9H10) demonstraram um desenvolvimento de imunidade antitumoral robusta sem afetar a função de Tregs (FECCI et al., 2007). No entanto, a

administração de ipilimumab para GBM foi limitada a um pequeno número de pacientes com GBM recorrente na clínica.

Mais recentemente, a inibição da via PD-1 / PDL1 gerou um interesse significativo. PD-L1 é superexpresso em GBM através dos seguintes mecanismos: (i) sinalização oncogênica como resultado da perda PTEN, (PARSA et al., 2007) (ii) sinalização parácrina, (BLOCH et al., 2013) e/ou (iii) "resistência imunológica adaptativa", onde a secreção de IFN- γ no microambiente induz a expressão de PD-L1 em células vizinhas (TAUBE et al., 2012). Enquanto os ensaios clínicos que estudam o bloqueio PD-1 e PD-L1 estão no estágio de recrutamento de pacientes com GBM, a eficácia desta abordagem tem sido caracterizada em pacientes com melanoma, proporcionando uma taxa de resposta objetiva (ORR) de aproximadamente 15-30% como monoterapia com respostas eficientes restritas a <6% dos doentes (BRAHMER et al., 2012; TOPALIAN et al., 2012). Uma vez que o tratamento tendo como alvo PD-1 / PD-L1 não induz a infiltração de células T em tumores, mas sim previne a exaustão de células T, pacientes associados com as melhores respostas possuem maiores níveis de células T infiltrantes no tumor antes do tratamento (TUMEH et al., 2014). Além disso, estudos iniciais descreveram que quanto maior o número de mutações presentes no genoma do tumor, maior a resposta do paciente à imunoterapia anti-PD-1 (CHAMPIAT et al., 2014).

Os resultados mais promissores relacionados com a inibição de ponto de verificação imunológicos foram conseguidos através do bloqueio combinatório CTLA-4 / PD-L1, (CURRAN et al., 2010; LARKIN et al., 2015; POSTOW et al., 2015). Para melanoma avançado não tratado, o bloqueio duplo de CTLA-4 e PD-1 proporcionou uma ORR melhorada (58%) em comparação com monoterapia CTLA-4 (19%) e monoterapia PD-1 (44%) (LARKIN et al., 2015). Em GBM, modelos pré-clínicos demonstraram altas taxas de sobrevivência quando tratadas com bloqueio simultâneo de PD-L1 e CTLA-4, em comparação com as suas respectivas monoterapias (WAINWRIGHT et al., 2014).

Além de PD-1 e CTLA-4, a modulação terapêutica de outras vias de inibição e estímulo imunológico estão em estudos pré-clínicos. Os receptores de LAG-3 ou TIM-3 em combinação com o bloqueio PD-1 proporcionam um controle pré-clínico

impressionante em modelos de tumores periféricos (SAKUIISHI et al., 2010; WOO et al., 2012).

1.4.2 Terapia de células adotivas

A terapia de células adotivas (ACT) é uma imunoterapia personalizada onde os linfócitos antitumorais autólogos ou as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) são expandidos *ex vivo*, selecionados através do reconhecimento eficiente de antígenos associados a tumores (TAAs) e injetadas novamente no indivíduo. As células T reativas ao tumor são isoladas de (i) sangue periférico, (ii) tecido ressecado cirurgicamente ou (iii) gerado por transdução das células T autólogas do paciente com vetores que codificam receptores de células T (TCR) ou receptores de anticorpos quiméricos (CAR). TAAs específicos podem ser indetectáveis ou pouco expressos em tecidos saudáveis, portanto podem servir como alvo potencial para imunoterapia. A ACT pode explorar células hospedeiras que exibem reatividade antitumoral tais como NK, LAKs e células T, cuja expansão e ativação favorecem um efeito antitumoral (DHODAPKAR et al., 2004; SAWAMURA et al., 1989).

A capacidade da terapia adotiva de células T em eliminar uma grande carga tumoral foi demonstrada com a reinfusão de linfócitos infiltrantes de tumores específicos ao melanoma (ROSENBERG et al., 2011). Em pacientes GBM, a terapia de células T adotiva tem sido usada para direcionar os antígenos de citomegalovírus humanos (CMV) expressos por células tumorais (COBBS et al., 2002; NAIR et al., 2014; SCHUESSLER et al., 2014). Um estudo recente que tratou 11 pacientes GBM recorrentes com infusões de células T específicas transferidas por adoção autóloga levou a uma mediana de sobrevida de > 57 semanas, com quatro pacientes permanecendo livre de progressão ao longo do período de estudo (SCHUESSLER et al., 2014). A sobrevida livre de progressão (PFS) mais longa foi associada à diminuição da expressão de receptores de ponto de verificação imunológica em células T, sugerindo que a manutenção da função efetora de células T adotivas transferidas é necessária para uma resposta clínica durável (SCHUESSLER et al., 2014).

1.4.3 Vacinação de peptídeo

A vacinação de peptídeo compreende uma geração de vacinas baseada em sequências peptídicas representando um alvo específico de antígeno tumoral (SWARTZ et al., 2015). Vacinações de peptídeos oferecem a vantagem de ter alta especificidade e fácil geração de antígeno. Suas limitações incluem a imunogenicidade do peptídeo, que pode ser contornada através da conjugação com uma proteína carreadora, como um toxóide tetânico, por exemplo (BRÖKER, 2016). A vacinação pode requerer adjuvantes, pois geralmente antígenos solúveis são pobres na geração de resposta imunológica. Apesar da identificação de diversos alvos em GBM, incluindo mutações em EGFR, PDGFR, PTEN e IDH1, poucos deles tem sido avaliados quanto a produção de vacinas.

Um dos alvos avaliados inclui Rindopepimut (Rintega®, CDX-110), uma vacina baseada em EGFRvIII, desenhada para eliminar tumores EGFRvIII-positivos em pacientes com GBM, mostrando benefícios em pacientes recorrentes em um estudo clínico de fase II (GATSON et al., 2015). Os resultados do estudo de fase II utilizando Rindopepimut/GM-CSF em pacientes GBM indicou um aumento na sobrevida desses pacientes (ZUSSMAN & ENGH, 2015). Outros testes usando vacinas baseadas em peptídeo em pacientes GBM têm sido realizados utilizando como alvo mutações em IDH1.

Encontrar um antígeno específico homogêneo em GBM é um desafio central para o desenvolvimento de vacinas peptídicas para glioblastoma. Novas técnicas podem permitir a identificação de novos alvos específicos a fim de aumentar a resposta imunológica endógena através da vacinação peptídica no microambiente do glioblastoma. Zhou e colaboradores (2014) desenvolveram uma técnica de escaneamento in vivo utilizando um pool de short hairpin RNA (shRNA) que foram desenhadas para encontrar reguladores negativos de células T. Estes shRNA de direcionamento foram então altamente enriquecidos em tumores, liberando a proliferação de linfócitos T após o reconhecimento de antígenos tumorais (ZHOU et al., 2014). Essa técnica parece ser promissora na identificação de novos alvos para vacinação baseada em peptídeos.

1.4.4 Terapia baseada em células dendríticas

Células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígeno (APCs) envolvidas na iniciação da imunidade adaptativa. DCs reconhecem antígenos tumorais, transportam-os para os linfonodos, apresentando via MHC Classe I ou II para linfócitos T CD8+ e CD4+, induzindo uma resposta imunológica específica contra o tumor. O desafio principal *in vivo* é encontrar os mecanismos ótimos através do qual as DCs são ativadas, levando em consideração que vacinas efetivas devem ativar DCs com sucesso e desenvolver respostas Th1 e CTL eficientes (BRISENO et al., 2016). As respostas Th1, em adição com as CTL, tem um importante papel na imunogenicidade antitumoral. Assim, é essencial que a imunoterapia ative eficientemente as DCs e providencie os sinais requeridos para uma resposta imunológica celular duradoura (ZITVOGEL & KROEMER, 2014).

Nesse contexto, DCs podem ser carregadas com o antígeno na presença de fatores estimuladores de DCs, como receptores do tipo Toll Like (TLR) para induzir a maturação das DCs (ZITVOGEL et al., 1998).

Uma abordagem interessante para direcionamento de múltiplos epítomos, simultaneamente, é a utilização de DC autóloga pulsada com lisado tumoral. Esta abordagem, identificada como DCVax®-L, está atualmente num ensaio clínico fase III para pacientes com GBM recentemente diagnosticado (PHUPHANICH et al., 2013). Essa estratégia, quando utilizada concomitantemente com as terapias usuais, aumentou a resposta nos pacientes, bem como a sobrevida. Os achados de 6 estudos clínicos mostraram que a imunoterapia baseada em DC aumenta em 2 anos as taxas de sobrevida comparado com os protocolos clínicos padrão (WANG et al., 2014). Notavelmente, esses estudos tem uma coorte pequena, requerindo um recrutamento maior para conclusões definitivas. Recentemente, Mitchell e colaboradores (2015) mostraram que o pré-condicionamento da vacinação com DC com toxóide tetânico (Sanofi Aventis; Decavac; 1 Lf, 100 µl) resultaram num aumento significativo de homing no linfonodo e na eficácia de células dendríticas sensibilizadas com antígenos tumorais em modelos murinos. Esta melhoria foi observada em ambas as taxas de progressão livre e sobrevivência global (OS) (MITCHELL et al., 2015).

Em conclusão, o GBM é um tumor altamente imunossupressor, pouco eficiente a terapias tradicionais e de difícil tratamento com base em sua localização anatômica. Os esforços imunoterapêuticos para tumores cerebrais concentraram-se predominantemente na vacinação terapêutica que parece atingir uma resposta imunológica promissora e respostas clínicas eficazes. A imunoterapia com SNC tem grande potencial no tratamento de glioblastoma e outros cânceres do SNC. Estudos futuros devem se concentrar em fornecer aos pacientes opções terapêuticas em constante evolução, reconhecendo também que as neoplasias malignas do SNC possuem fenótipos imunossupressores únicos que precisam ser especificamente direcionados.

2 Hipótese

A complexidade das populações de células do sistema imunológico infiltrando tumores pode influenciar os tumores de forma diferente. Grande quantidade dessas células é encontrada dentro do sítio tumoral de glioblastoma e a razão para incapacidade do sistema imunológico em eliminar o tumor foram pouco elucidadas. A suposição é de que outras células que compõe o microambiente tumoral, bem como o próprio tumor, estariam influenciando na atividade de células efetoras do sistema imunológico com ação antitumoral, como as células T CD8+.

3 Objetivos

3.1 Geral

Avaliar a importância de meta-assinaturas correspondentes a diferentes células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral de glioblastoma e seus efeitos sobre as demais meta-assinaturas avaliadas através da análise do impacto de suas respectivas meta-assinaturas na sobrevida geral de pacientes com glioblastoma utilizando dados clínicos e de expressão gênica obtidos por análise de RNA-Seq.

3.2 Específicos

3.2.1 Avaliar o impacto individual de meta-assinaturas correspondentes à macrófagos, células T CD8+, células T CD4+, células Th1, células Th2, células Th17, Células T reguladoras, células supressoras derivadas de mieloides, células T NK, células NK e relacionada à exaustão na sobrevida dos pacientes;

3.2.2 Avaliar a correlação entre as diferentes meta-assinaturas avaliadas;

3.2.3 Avaliar o impacto de meta-assinaturas combinadas duas a duas;

3.2.4 Avaliar o impacto de meta-assinaturas combinadas utilizando 3 componentes na análise;

3.2.5 Dividir as meta-assinaturas em clusters e atribuir as piores e melhores combinações em relação aos prognósticos dos pacientes avaliados.

3.2.6 Avaliar as meta-assinaturas em gliomas grau II e III.

4 Metodologia

4.1 Obtenção dos dados

Os dados transcriptômicos de RNA-seq provenientes do The Cancer Genome Atlas (TCGA) foram obtidos através da plataforma UCSC Cancer Genome Browser (www.genome-cancer.ucsc.edu, acesso em 18 de novembro de 2016). Foram utilizados os dados de Glioblastoma nomeados “GBM gene expression (AffyU133a)” e os dados de Glioma de baixo grau nomeados “LGG gene expression (pancan normalized)”. Os dados de expressão gênica de tumores que não continham informações clínicas dos pacientes foram excluídos. No conjunto de dados de GBM foram avaliados 524 pacientes com dados de expressão gênica e sobrevida. Já no conjunto de dados de LGG, foram avaliados 450 pacientes, também com dados de expressão gênica e sobrevida, sendo 225 pacientes apresentando glioma de grau 2 e 225 pacientes apresentando glioma de grau 3.

4.2 Obtenção das meta-assinaturas

As meta-assinaturas que representam as diferentes células do sistema imunológico foram descritas previamente por Charoentong et al. (2017). A meta-assinatura de exaustão, foi descrita por Tirosh et al., (2016). Os genes correspondentes a cada tipo celular descrito estão contidos na tabela 3. As meta-assinaturas foram obtidas através da média da expressão dos genes correspondentes a cada tipo celular. Além das meta-assinaturas descritas na tabela 3, utilizamos os marcadores Arginase 1 (ARG1), Fator de crescimento vascular endotelial A (VEGFA), Fator de transformação do crescimento beta (TGFB) e Interleucina 10 (IL10) para identificar macrófagos do tipo M2 e os marcadores Sintase de óxido nítrico 2 (NOS2) e Interleucina 12 A (IL12A) para identificar macrófagos do tipo M2.

Tabela 3. Meta-assinaturas utilizadas para representar as diferentes células do sistema imunológico e exaustão.

Meta-assinatura	Genes	Referência
Exaustão	CXCL13; TNFRSF1B; RGS2; TIGIT; CD27; TNFRSF9; SLA; RNF19A; INPP5F; XCL2; HLADMA; FAM3C; UQCRC1; WARS; EIF3L; KCNK5; TMBIM6; CD200; ZC3H7A; SH2D1A; ATP1B3; MYO7A; THADA; PARK7; EGR2; FDFT1; CRTAM; IFI16	Tirosh et al., 2016
Treg	CCL3L1; CD72; CLEC5A; FOXP3; ITGA4; L1CAM; LIPA; LRP1; LRRC42; MARCO; MMP12; MNDA; MRC1; MS4A6A; PELO; PLEK; PRSS23; PTGIR; ST8SIA4; STAB1	Charoentong et al., 2017
TH1	CD70; TBX21; ADAM8; AHCYL2; ALCAM; B3GALNT1; BBS12; BST1; CD151; CD47; CD48; CD52; CD53; CD59; CD6; CD68; CD7; CD96; CFHR3; CHRM3; CLEC7A; COL23A1; COL4A4; COL5A3; DAB1; DLEU7; DOC2B; EMP1; F12; FURIN; GAB3; GATM; GFPT2; GPR25; GREM2; HAVCR1; HSD11B1; HUNK; IGF2; RCSD1; RYR1; SAV1; SELE; SELP; SH3KBP1; SIT1; SLC35B3; SIGLEC10; SKAP1; THUMPD2; ZEB2; ENC1; FAM134B; FBXO30; FCGR2C; STAC; LTC4S; MAN1B1; MDH1; MMD; RGS16; IL12A; P2RX5; CD97; ITGB4; ICAM3; METRNL; TNFRSF1A; IRF1; HTR2B; CALD1; MOCOS; TRAF3IP2; TLR8; TRAF1; DUSP14	Charoentong et al., 2017
TH17	IL17A; IL17RA; C2CD4A; C2CD4B; CA2; CCDC65; CEACAM3; IL17C; IL17F; IL17RC; IL17RE; IL23A; ILDR1; LONRF3; SH2D6; TNIP2; ABCA1; ABCB1; ADAMTS12; ANK1; ANKRD22; B3GALT2; CAMTA1; CCR9; CD40; GPR44; IFT80	Charoentong et al., 2017
TH2	ASB2; CSRP2; DAPK1; DLC1; DNAJC12; DUSP6; GNAI1; LAMP3; NRP2; OSBPL1A; PDE4B; PHLDA1; PLA2G4A; RAB27B; RBMS3; RNF125; TMPRSS3; GATA3; BIRC5; CDC25C; CDC7; CENPF; CXCR6; DHFR; EVI5; GSTA4; HELLS; IL26; LAIR2	Charoentong et al., 2017
Macrófago	AIF1; CCL1; CCL14; CCL23; CCL26; CD300LB; CNR1; CNR2; EIF1; EIF4A1; FPR1; FPR2; FRAT2; GPR27; GPR77; RNASE2; MS4A2; BASP1; IGSF6; HK3; VNN1; FES; NPL; FZD2; FAM198B; HNMT; SLC15A3; CD4; TXNDC3; FRMD4A; CRYBB1; HRH1; WNT5B	Charoentong et al., 2017
MDSC	CCR2; CD14; CD2; CD86; CXCR4; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FERMT3; GPSM3; IL18BP; IL4R; ITGAL; ITGAM; PARVG; PSAP; PTGER2; PTGES2; S100A8; S100A9	Charoentong et al., 2017
NK	AKT3; AXL; BST2; CDH2; CRTAM; CSF2RA; CTSZ; CXCL1; CYTH1; DAXX; DGKH; DLL4; DPYD; ERBB3; F11R; FAM27A; FAM49A; FASLG; FCGR1A; FN1; FSTL1; FUCA1; GBP3; GLS2; GRB2; LST1; BCL2; CDC5L; FGF18; FUT5; FZR1; GAGE2; IGFBP5; KANK2; LDB3	Charoentong et al., 2017
Célula T NK	BTN2A2; CD101; CD109; CNPY3; CNPY4; CREB1; CRTC2; CRTC3; CSF2; KLRC1; FUT4; ICAM2; IL32; LAMP2; LILRB5; KLRG1; HSPA4; HSPB6; ISM2; ITIH2; KDM4C; KIR2DS4; KIRREL3; SDCBP; NFATC2IP; MICB; KIR2DL1; KIR2DL3; KIR3DL1; KIR3DL2; NCR1; FOXL1; TSLP; SLC7A7; SPP1; TREM2; UBASH3A; YBX2; CCDC88A; CLEC1A; THBD; PDPN; VCAM1; EMR1	Charoentong et al., 2017
Células CD4	AIM2; BIRC3; BRIP1; CCL20; CCL4; CCL5; CCNB1; CCR7; DUSP2; ESCO2; ETS1; EXO1; EXOC6; IARS; ITK; KIF11; KNTC1; NUF2; PRC1; PSAT1; RGS1; RTKN2; SAMSN1; SELL; TRAT1	Charoentong et al., 2017
Células CD8	ADRM1; AHSA1; C1GALT1C1; CCT6B; CD37; CD3D; CD3E; CD3G; CD69; CD8A; CETN3; CSE1L; GEMIN6; GNLY; GPT2; GZMA; GZMH; GZMK; IL2RB; LCK; MPZL1; NKG7; PIK3IP1; PTRH2; TIMM13; ZAP70	Charoentong et al., 2017

4.3 Análise de *Heat-map*

A análise de *heat-map* foi feita utilizando o pacote “pheatmap” do software R (www.r-project.org). As meta-assinaturas foram normalizadas, individualmente, obtendo todos os valores entre 0 a 1. O *heat-map* foi organizado através da expressão da meta-assinatura de exaustão e clusterizado pela semelhança de expressão entre as diferentes meta-assinaturas, mas não pelos pacientes.

4.4 Análise de correlação

Foram avaliadas as correlações entre as meta-assinaturas avaliadas utilizando o pacote *stats* do software R. Foi realizada uma análise de correlação de Pearson e os resultados foram plotados em forma de *heat-map*.

4.5 Análises de Kaplan-Meier

As análises de Kaplan-Meier foram feitas individualmente para cada meta-assinatura. Cada meta-assinatura individual foi dividida na mediana, e os pacientes com expressão da meta-assinatura acima da mediana foram considerados como pacientes com alta expressão da meta-assinatura e os pacientes com expressão da meta-assinatura abaixo da mediana foram considerados pacientes com baixa expressão da meta-assinatura. Assim, foram avaliadas diferenças entre os grupos de pacientes de cada meta-assinatura. Definindo os grupos com alta expressão (High - H), apresentando expressão da meta-assinatura acima da mediana; e baixa expressão (Low - L), apresentando expressão da meta-assinatura abaixo da mediana.

As análises de Kaplan-Meier utilizando as duas meta-assinaturas foram realizadas de modo que os pacientes foram divididos em 4 grupos: os pacientes que tinham as duas meta-assinaturas com expressão acima da mediana (High/High – HH) comparados com os pacientes que tinham as duas meta-assinaturas com expressão abaixo da mediana (Low/Low – LL) e os pacientes que tinham uma meta-assinatura A acima da mediana e uma meta-assinatura B abaixo da mediana (High/Low – HL) comparados com os pacientes que tinham

uma meta-assinatura A abaixo da mediana e os pacientes com uma meta-assinatura B acima da mediana (Low/High – LH).

Para meta-assinaturas que apresentaram correlação, os pontos de corte foram traçados paralelamente a linha de correlação, e o segundo ponto de corte, perpendicularmente a essa linha, dividindo os grupos de pacientes em alta e baixa expressão – *High* e *Low*, conforme o eixo de inclinação da correlação, de acordo com a figura 3.

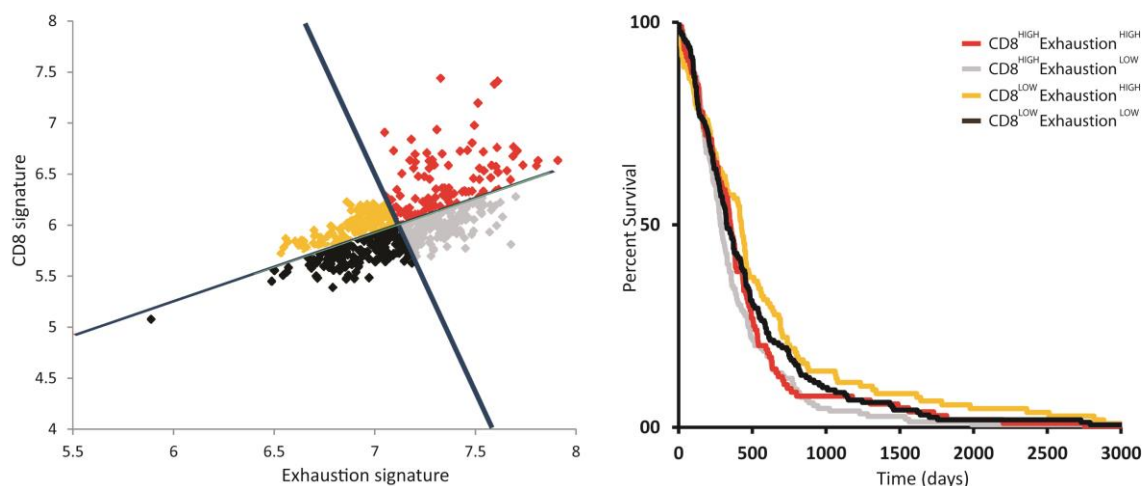


Figura 3. Exemplo de pontos de corte para a análise de Kaplan-Meier integrando duas assinaturas com correlação entre elas. Um ponto de corte é traçado paralelamente a reta de correlação e um segundo ponto de corte é traçado perpendicularmente a esta reta, dividindo os pacientes em 4 grupos distintos.

Da mesma forma, foram comparadas três diferentes meta-assinaturas em uma análise de Kaplan-Meier, utilizando a mesma classificação das análises de Kaplan-Meier entre duas meta-assinaturas, sendo o eixo normal ou inclinado, conforme o índice de correlação entre as meta-assinaturas, e adicionando uma terceira meta-assinatura utilizando a mediana como ponto de corte entre pacientes com alta e baixa expressão do gene avaliado. Foram obtidos 8 grupos distintos, de meta-assinaturas A B e C, sendo eles: $A^H B^H C^H$, $A^H B^H C^L$, $A^H B^L C^H$, $A^H B^L C^L$, $A^L B^L C^L$, $A^L B^H C^L$, $A^L B^L C^H$ e $A^L B^H C^H$, sendo alta expressão (H – High expression.) e baixa expressão (L-Low expression).

4.6 Análises de correlação tridimensional

Para ilustrar o grau de correlação entre os três componentes analisados nos gráficos de Kaplan-Meier utilizando 3 meta-assinaturas diferentes, plotamos a

correlação dos 3 elementos da análise, tendo um primeiro elemento no eixo X, um segundo elemento no eixo Y e um terceiro elemento Z é demonstrado através de cores na correlação resultante de X e Y, como mostra a figura 4.

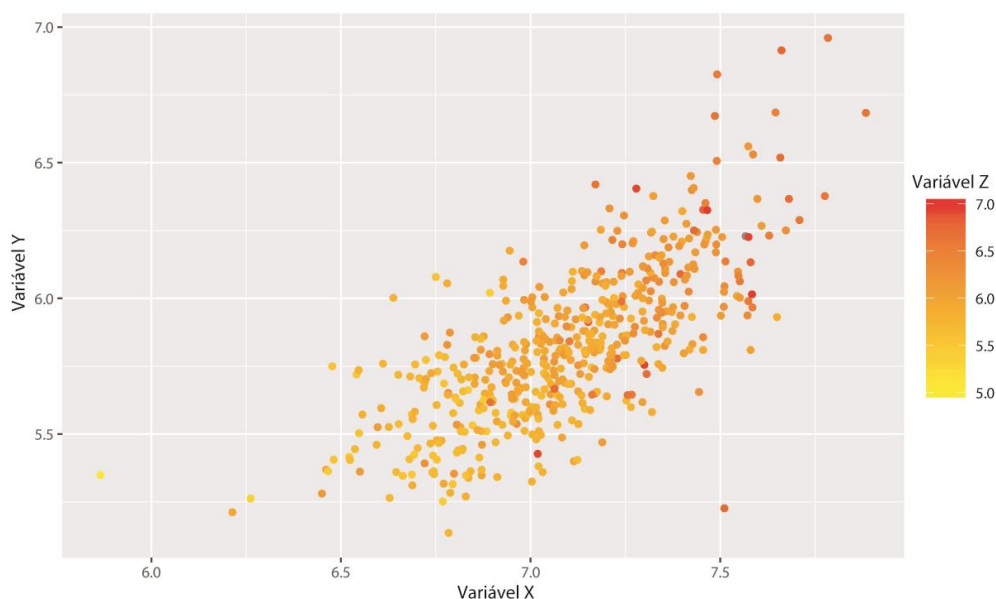


Figura 4. Gráfico de correlação tridimensional. O gráfico mostra a correlação entre as variáveis X, Y e Z. A correlação entre as variáveis X e Y está demonstrada através da distribuição de seus respectivos pontos no gráfico e a integração da variável Z se dá através das cores de cada ponto, conforme a barra de valores à esquerda do gráfico.

4.7 Análise integrada de meta-assinaturas

Com o objetivo de integrar todas as meta-assinaturas analisadas, dividimos as meta-assinaturas de acordo com as separações observadas no *heat-map*. Obtivemos a média de cada um dos clusters e avaliamos a sobrevida dos pacientes com base nos valores correspondentes a cada cluster em cada paciente. Assim, avaliamos os clusters 2 a 2, de acordo com os resultados obtidos previamente das meta-assinaturas presentes em cada cluster quanto ao prognóstico dos pacientes, e utilizando outro cluster como terceiro componente.

5 Resultados

5.1 Análise de *Heat-map*

Com o objetivo de identificar quais meta-assinaturas aumentavam em conjunto com a meta-assinatura de exaustão e de separar as diferentes meta-assinaturas em grupos, realizamos uma análise de *heat-map* utilizando a meta-assinatura de exaustão como guia da análise. Assim, observamos as meta-assinaturas com características imunossupressoras que variam em conjunto com a meta-assinatura de exaustão ou as meta-assinaturas com características antitumorais que, mesmo altamente expressas, poderiam estar sendo afetadas pela expressão do programa de exaustão. Grande parte das meta-assinaturas correlacionaram com a meta-assinatura guia do *heat-map*, a meta-assinatura de exaustão. Também pode-se perceber uma divisão em clusters. As meta-assinaturas de NK, NK T, Th1 e exaustão fazem parte do mesmo cluster. Da mesma forma MDSC, Macrófagos, Tregs, CD8 e CD4 formaram um cluster e TH17 e TH2 um pequeno cluster distinto (Figura 5). Esses clusters podem indicar que a expressão dessas meta-assinaturas variam em conjunto. Assim, foi proposto uma análise de correlação entre estas meta-assinaturas.

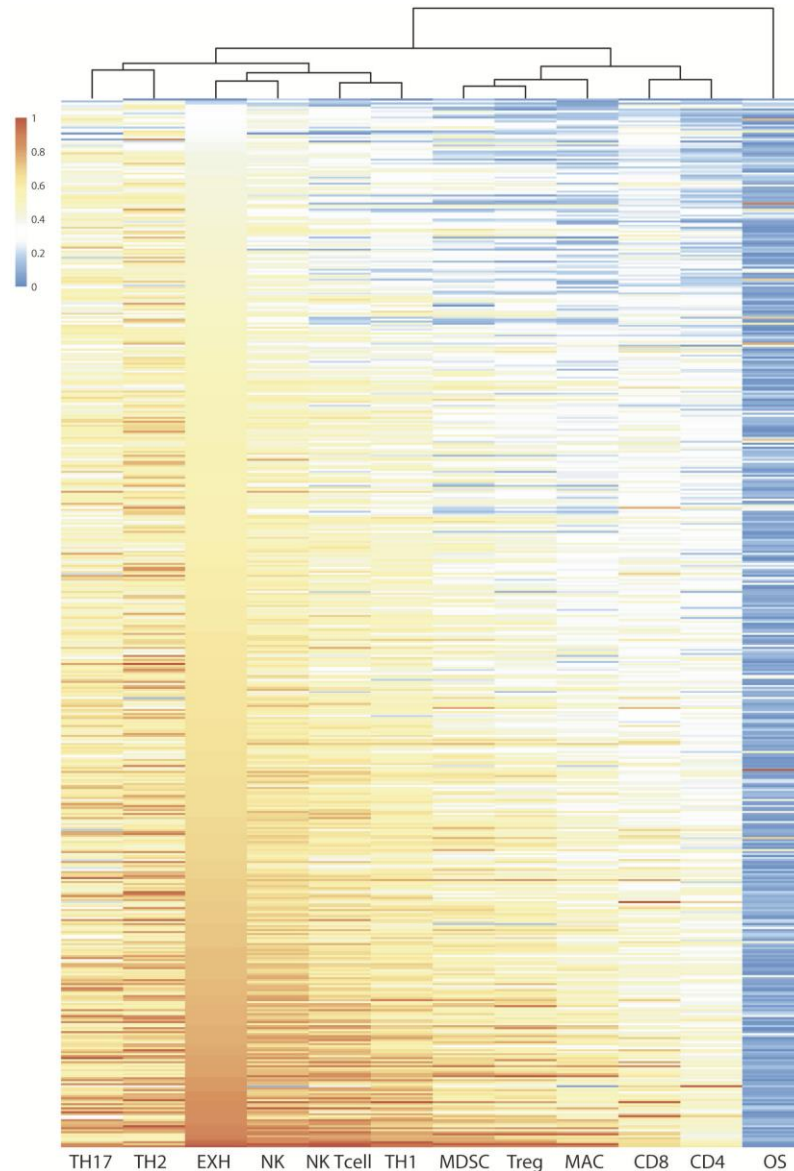


Figura 5. Análise de *Heat-map* ilustrando a distribuição da expressão das meta-assinaturas com base na meta-assinatura de exaustão. As meta-assinaturas estão dispostas nas colunas e os pacientes nas linhas. As cores quentes se referem a altos níveis de expressão das meta-assinaturas no paciente e as cores frias a baixos níveis de expressão das meta-assinaturas no paciente.

5.2 Correlação de Pearson

Para quantificar a que nível as meta-assinaturas observadas no *heat-map* variavam em conjunto, uma análise de correlação de Pearson entre estas meta-assinaturas foi realizada. As meta-assinaturas de exaustão (Exh), Células Th1 (TH1), Células T NK (NK Tcell) e Células NK (NK), apresentaram um índice de correlação > 0.8 , assim como as meta-assinaturas MDSC, Tregs e Macrófagos.

Já as meta-assinaturas CD4 e CD8 apresentaram uma correlação >0.71 entre elas. Por outro lado, as meta-assinaturas correspondentes às células Th17 e Th2 não apresentaram correlações significativas as assinaturas avaliadas (Figura 6).

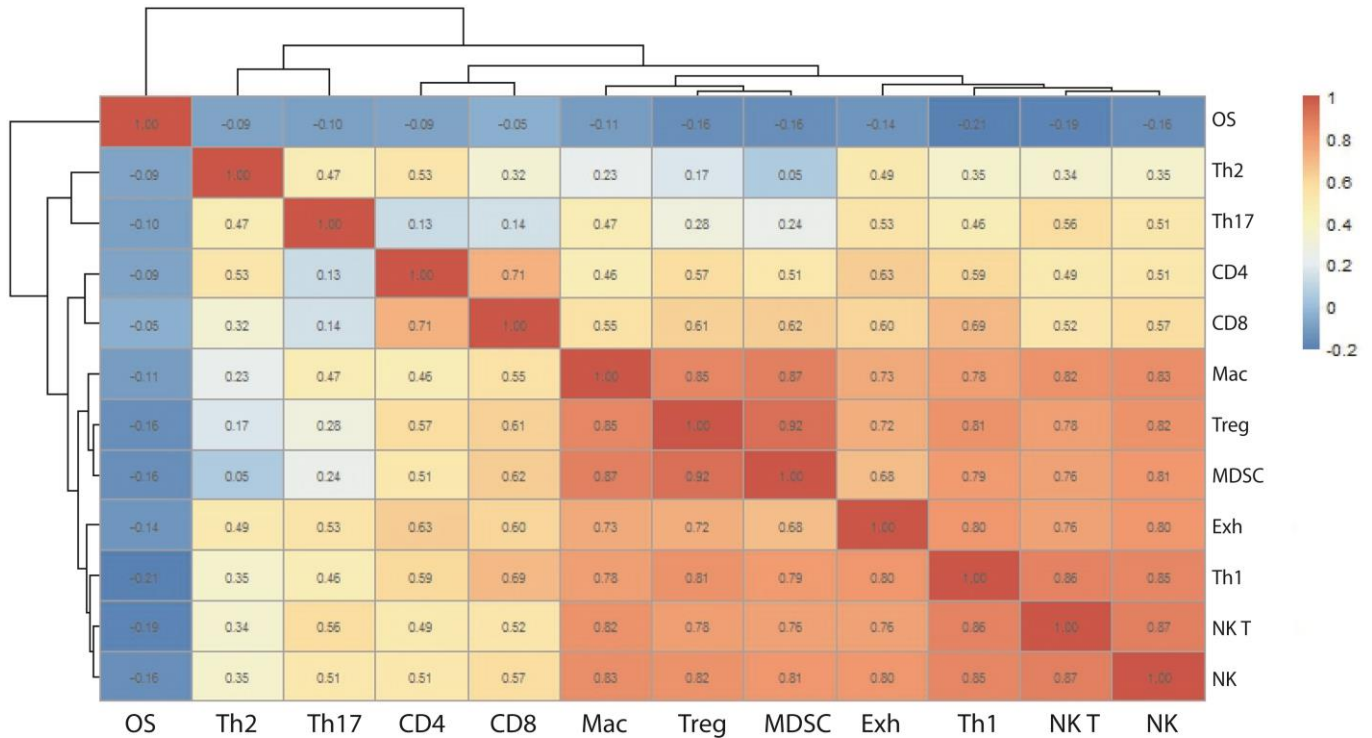


Figura 6. Análise de correlação entre as meta-assinaturas avaliadas. A análise de correlação está apresentada em forma de *heat-map*, onde as cores quentes se referem à maiores correlações e as cores frias a correlações mais baixas.

5.3 Análise de Kaplan-Meier individual

A seguir, propusemos avaliar o impacto de cada meta-assinaturas na sobrevida dos pacientes. As maiores diferenças foram encontradas em Th1, MDSC e NK T, com valores de $p < 0,001$, onde os pacientes que possuíam baixa expressão das meta-assinaturas sobreviveram mais em relação aos que apresentavam alta expressão das meta-assinaturas. As meta-assinaturas de exaustão, Tregs, NK e Macrófagos também demonstraram diferenças na sobrevida dos pacientes ($p < 0,05$) e da mesma forma que as demais, os pacientes que obtiveram menor expressão dessas meta-assinaturas, sobreviveram mais em relação aos outros. As meta-assinaturas de Th17, Th2, CD8 e CD4 não demonstraram diferença na sobrevida dos pacientes quando avaliados individualmente, com valores abaixo e acima da mediana (Figura 7).

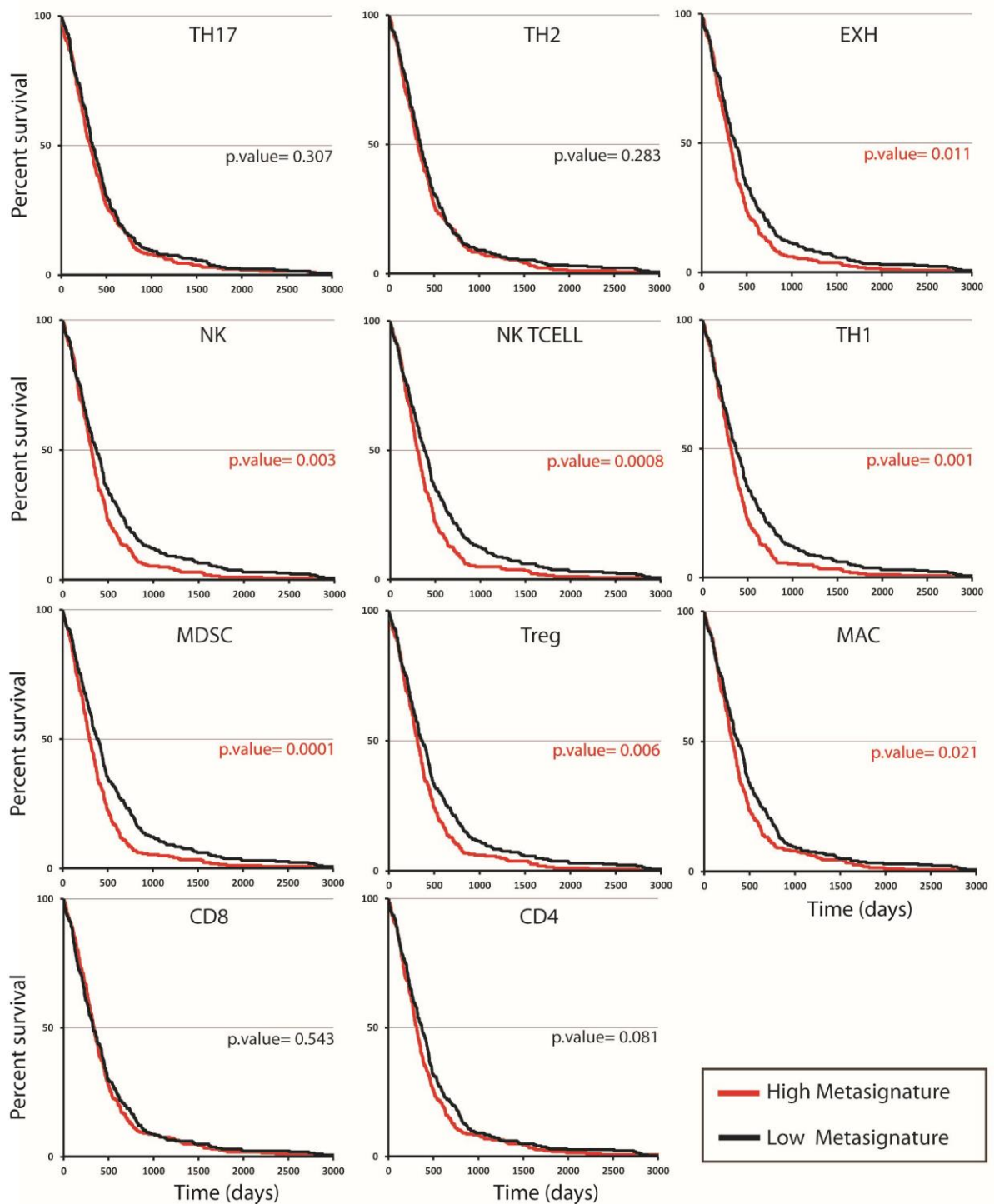


Figura 7. Análises de Kaplan-Meier das meta-assinaturas individuais. Cada meta-assinatura foi dividida na mediana, considerando os pacientes com expressão acima da mediana possuindo alta expressão da meta-assinatura (High Metasignature – vermelho) e os pacientes que apresentaram expressão abaixo da mediana como baixa expressão da meta-assinatura (Low Metasignature – preto). Em vermelho também estão destacados os valores de $p < 0.05$.

5.4 Análises de Kaplan-Meier de meta-assinaturas combinadas

Surpreendentemente, não foram observadas diferenças significativas na sobrevida dos pacientes analisando individualmente as meta-assinaturas que supostamente teriam atividade antitumoral, como a meta-assinatura referente à CD8. Esses dados podem indicar que outras meta-assinaturas poderiam estar influenciando a função dessas células, bloqueando o seu potencial efeito antitumoral. Além disso, os macrófagos possuem uma diversidade e plasticidade substanciais e são altamente influenciados pelo microambiente em que se localizam, podendo ter papel pró-tumoral ou antitumoral. Assim, propusemos avaliar as meta-assinaturas de CD8 e Macrófagos em conjunto com a meta-assinatura de exaustão a fim de avaliar se a expressão do programa de exaustão estaria interferindo no efeito dessas meta-assinaturas no prognóstico dos pacientes.

Dessa forma, foi observado que, quando há alta expressão da meta-assinatura de macrófagos, e baixa expressão da meta-assinatura relacionada com a exaustão, os pacientes apresentam melhor sobrevida em relação ao inverso (alta expressão da meta-assinatura exaustão e baixa expressão da meta-assinatura de macrófagos). Por outro lado, quando há uma alta expressão de ambas meta-assinaturas – de macrófagos e de exaustão – os pacientes apresentam uma sobrevida pior em relação aos pacientes que apresentaram baixa expressão de ambas meta-assinaturas (Figura 8).

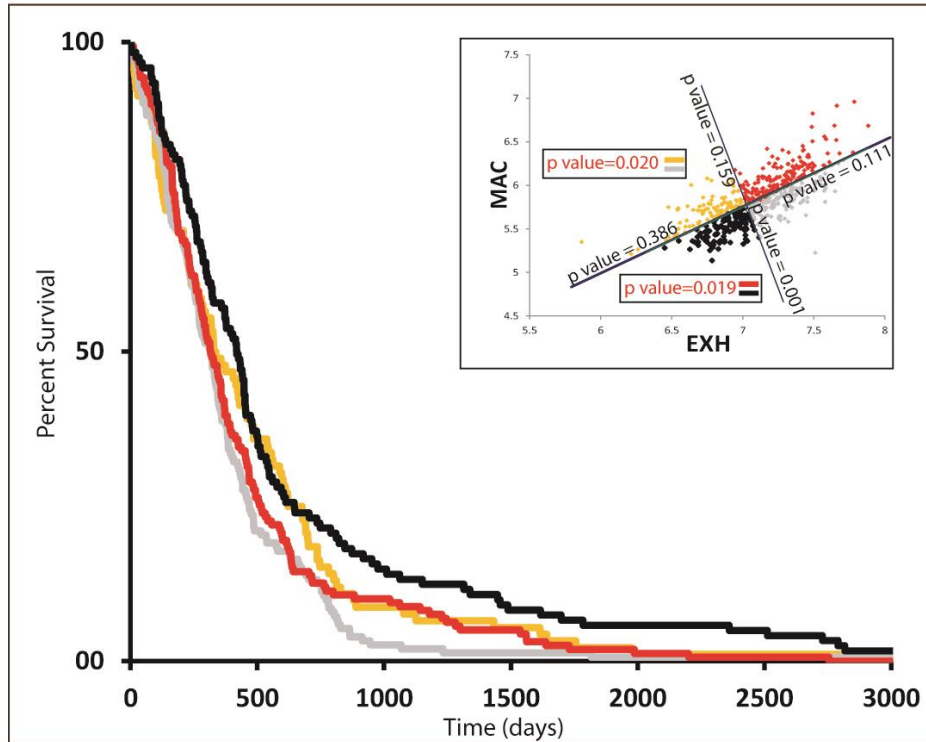


Figura 8. Análise de Kaplan-Meier combinando as meta-assinaturas de macrófagos (MAC) e exaustão (EXH). Os pontos de corte foram determinados com base na reta de correlação entre as duas meta-assinaturas, dividindo os pacientes em 4 grupos: um grupo com ambas as assinaturas altas (linha vermelha), um grupo com a assinatura de exaustão alta e de macrófagos baixa (linha cinza), um grupo com ambas as assinaturas baixas (linha preta) e um grupo com a assinatura de exaustão baixa e a assinatura de macrófagos alta (linha amarela). A diferença entre cada um dos grupos foi avaliada e os valores de p estão expostos no gráfico de correlação.

A seguir, adicionamos a esta análise às demais meta-assinaturas como terceiro componente. Assim, observamos as maiores diferenças em pacientes com a assinatura de macrófagos alta, de exaustão baixa e de células NK ou células T NK ou MDSC altas em relação aos pacientes com o terceiro componente pouco expresso, obtendo o valor de $p < 0.05$ em todos os casos (Figura 9). No entanto, os valores de p foram menores do que quando avaliamos cada componente individualmente e não encontramos diferença no terceiro componente quando avaliamos os casos em que a assinatura de macrófagos apresentava baixa expressão e a de exaustão alta expressão. Esses resultados sugerem que os macrófagos poderiam ter papel duplo no microambiente tumoral, provavelmente devido à polarização M1 ou M2 que estas células podem sofrer.

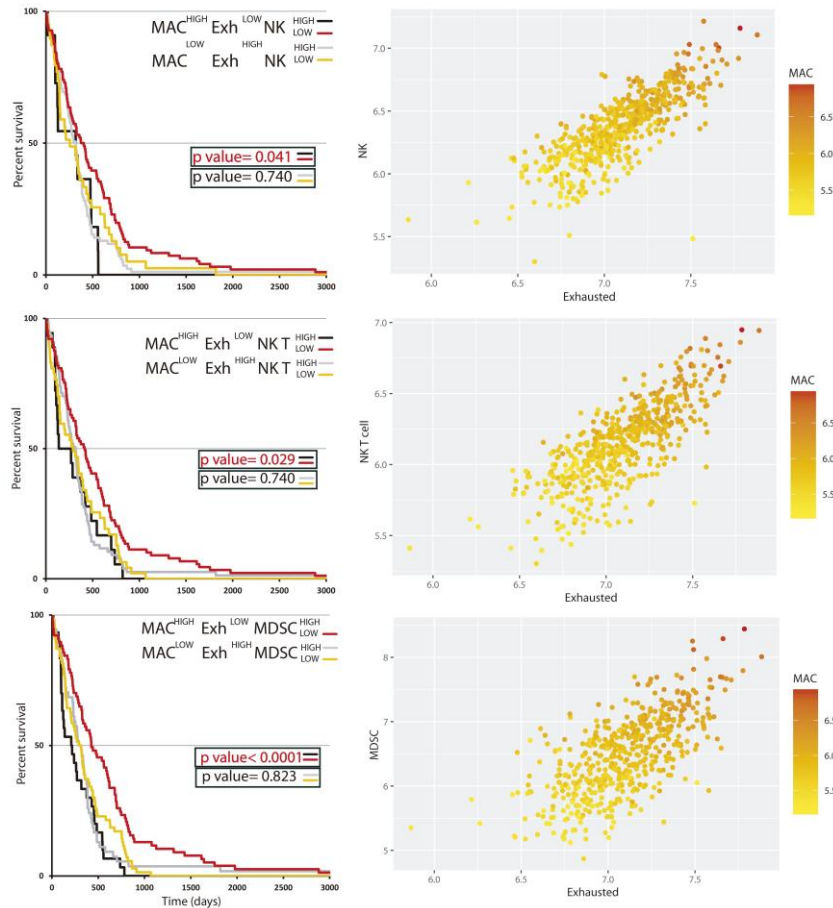


Figura 9. Análise de Kaplan-Meier combinada de macrófagos e análise de correlação tridimensional. Os gráficos de Kaplan-Meier combinando as meta-assinaturas de macrófagos e exaustão com um terceiro componente estão à esquerda e os resultados significativos estão descritos em vermelho. À direita, a análise de correlação com a assinatura de exaustão no eixo X, o terceiro elemento no eixo Y, e a distribuição da expressão da meta-assinatura de macrófagos está disposta no gráfico através de cores, numa escala de 5 (amarelo) a 7 (vermelho).

Assim, adicionamos marcadores de polarização M1 e M2 como terceiro componente. Não observamos diferença nos pacientes em relação à presença de macrófagos M1. No entanto, os pacientes que demonstravam alta expressão de marcadores M2 apresentaram pior sobrevida em relação aos pacientes que apresentavam baixa expressão destes marcadores na presença e na ausência da meta-assinatura de exaustão, indicando que os macrófagos M2 podem contribuir para a progressão tumoral em glioblastoma (Figura 10).

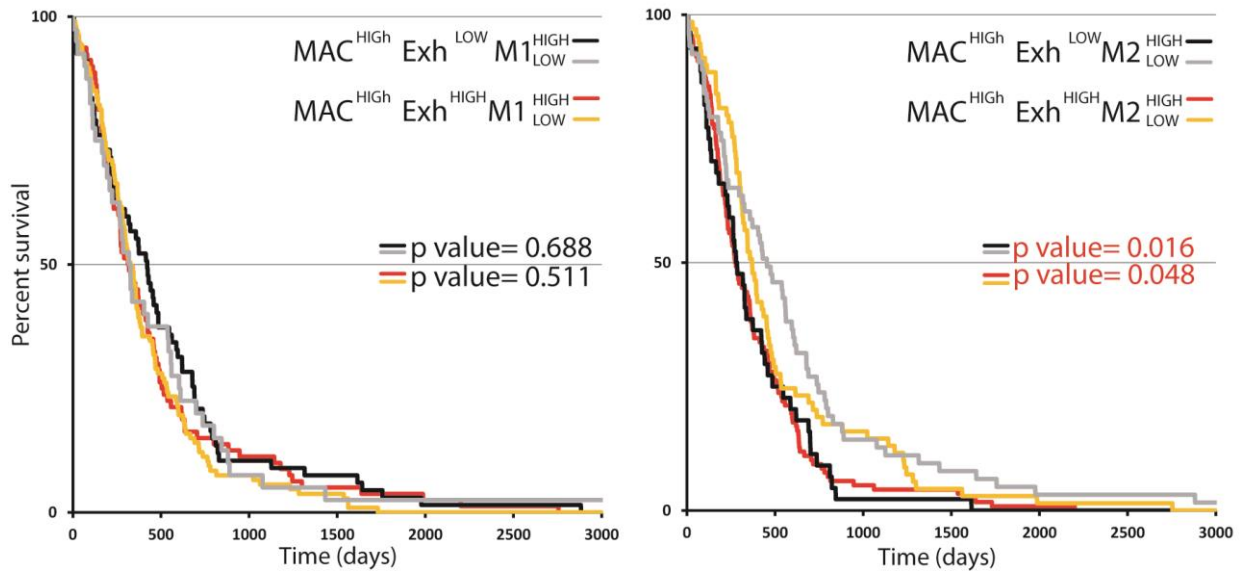


Figura 10. Diferença na polarização de macrófagos em glioblastomas. Não há diferença quando há presença ou ausência de macrófagos M1, no entanto, quando há alta expressão de genes relacionados ao fenótipo M2 há uma piora na sobrevida dos pacientes.

Avaliamos também a assinatura CD8+ em conjunto com a assinatura de exaustão e observamos que quando há alta expressão da meta-assinatura relacionada à presença de células CD8+ e baixa assinatura de exaustão, os pacientes apresentam uma melhora na sobrevida em relação aos pacientes com alta expressão de exaustão e baixa expressão de CD8+ e em relação aos pacientes que apresentam ambas assinaturas altas ($p < 0.05$) (Figura 11).

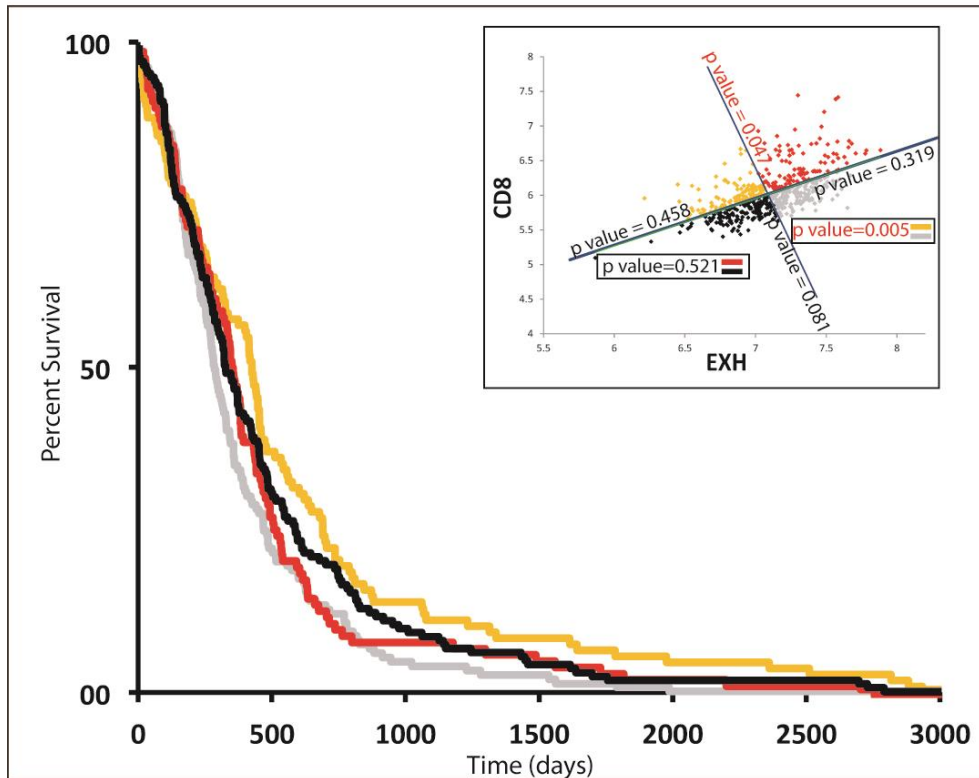


Figura 11. Análise de Kaplan-Meier combinando as meta-assinaturas de linfócitos CD8+ (CD8) e exaustão (EXH). Os pontos de corte foram determinados com base na reta de correlação entre as duas meta-assinaturas, dividindo os pacientes em 4 grupos: um grupo com ambas as assinaturas altas (linha vermelha), um grupo com a assinatura de exaustão alta e de CD8 baixa (linha cinza), um grupo com ambas as assinaturas baixas (linha preta) e um grupo com a assinatura de exaustão baixa e a assinatura de CD8 alta (linha amarela). A diferença entre cada um dos grupos foi avaliada e os valores de p estão expostos no gráfico de correlação.

Adicionando um terceiro componente à análise, encontramos diferença em praticamente todas as assinaturas nos pacientes com alta expressão de CD8 e baixa expressão de exaustão, sendo que a alta expressão das meta-assinaturas de MDSC, Th1, Células NK, Células NK, Células T NK, Treg e macrófagos como terceiro componente da análise apresentaram pior prognóstico em relação aos pacientes que apresentaram baixa expressão destas meta-assinaturas ($p < 0.05$). Em contraste, a alta expressão de Th2 como terceiro componente da análise apresentou melhor sobrevida em relação aos pacientes com baixa expressão desta meta-assinatura como terceiro componente da análise (Figura 12).

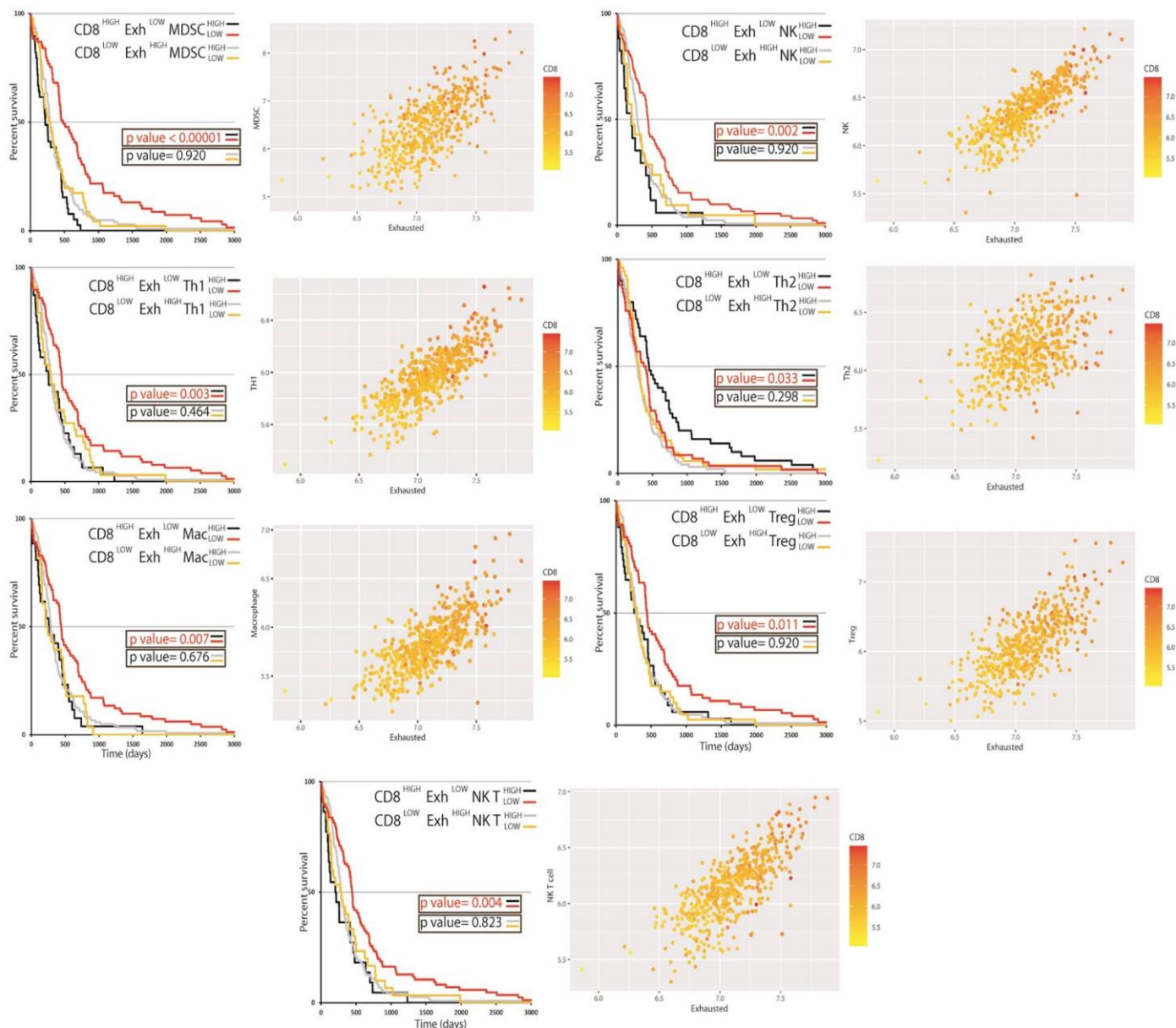


Figura 12. Análise de Kaplan-Meier combinada de CD8+ e gráfico de correlação tridimensional. Os gráficos de Kaplan-Meier combinando as meta-assinaturas de células CD8+ e exaustão com um terceiro componente estão à esquerda e os resultados significativos estão descritos em vermelho. À direita, a análise de correlação com a assinatura de exaustão no eixo X, o terceiro elemento no eixo Y, e a distribuição da expressão da meta-assinatura de CD8 está disposta no gráfico através de cores, numa escala de 5 (amarelo) a 7.5 (vermelho).

5.5 Análise integrada de meta-assinaturas

Com o objetivo de integrar todas as meta-assinaturas analisadas, dividimos as meta-assinaturas de acordo com as separações observadas no *heat-map*. Obtivemos a média de cada um dos *clusters* e avaliamos a sobrevivência dos pacientes com base nos valores correspondentes a cada *cluster* em cada paciente. Assim, avaliamos os *clusters* 2 a 2, de acordo com os resultados obtidos

previamente das meta-assinaturas presentes em cada *cluster* quanto ao prognóstico dos pacientes, e utilizando outro cluster como terceiro componente.

De acordo com as separações observadas na figura 13A, obtivemos 4 clusters distintos: Cluster 1, contendo as meta-assinaturas de exaustão, células NK, NK T e Th1; Cluster 2, contendo as meta-assinaturas de MDSC, células Treg e macrófagos; Cluster 3, contendo as meta-assinaturas correspondentes a células T CD8 e CD4; Cluster 4, contendo as meta-assinaturas correspondentes à células Th17 e Th2 (Figura 13A). Assim, conforme os resultados obtidos anteriormente, definimos os clusters 1 e 2 como imunossupressores e os clusters 3 e 4 como anti-tumorais. Avaliamos então a sobrevida global combinando os clusters 1 e 2 e os clusters 3 e 4. Observamos que os pacientes que possuíam alta expressão dos clusters 1 e 2, tinham uma sobrevida pior em relação aos pacientes com baixa expressão destes clusters ($p=0.005$). Por outro lado, na análise envolvendo os clusters 3 e 4, observamos que os pacientes que apresentavam alta expressão do cluster 3 (correspondente a CD8 e CD4) e baixa expressão do cluster 4 tinham uma sobrevida aumentada em relação aos que apresentavam alta expressão do cluster 4 e baixa expressão do cluster 3. (Figura 13B)

Por fim, analisamos os clusters de dois componentes, adicionando os outros clusters como terceiro componente. Adicionando o cluster 3 à análise dos clusters 1 e 2, observamos uma diferença significativa entre os pacientes que apresentavam alta expressão do cluster 3 e baixa expressão dos clusters 1 e 2, em relação aos pacientes que apresentavam alta expressão dos clusters 1 e 2 e baixa expressão do cluster 3 ($p=0.003$). Substituindo o cluster 3 pelo cluster 4 na análise, obtivemos um resultado semelhante nos mesmos grupos avaliados, com valor de $p = 0.018$. De forma semelhante, quando adicionamos o cluster 1 à análise de sobrevida entre os clusters 3 e 4, observamos que os pacientes que apresentavam alta expressão dos clusters 3 e 4 e baixa expressão do cluster 1 sobreviveram mais em relação aos pacientes que apresentavam alta expressão do cluster 1 e baixa expressão dos clusters 3 e 4 ($p=0.020$). Obtivemos resultados semelhantes ao substituir o cluster 1 pelo cluster 2, obtendo uma diferença ainda maior, com um valor de $p=0.014$. Adicionalmente, observamos uma melhor sobrevida nos pacientes que apresentaram os clusters 3, 4 e 2 pouco expressos

em relação aos que apresentavam baixa expressão dos clusters 3 e 4 e alta expressão do cluster 2 ($p=0.042$) (Figura 13 C).

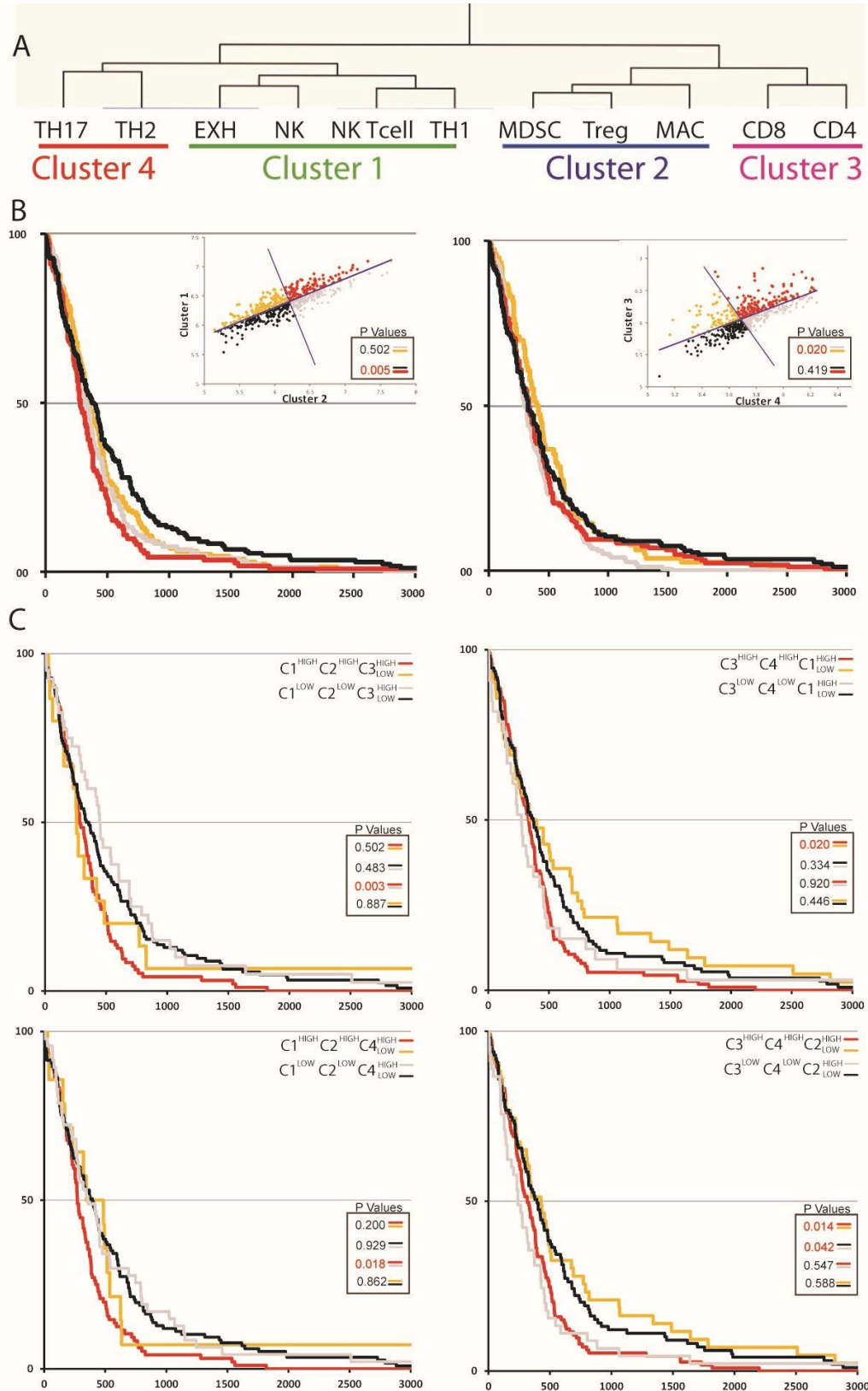


Figura 13. Análise integrada das meta-assinaturas. Em A, observamos a divisão das meta-assinaturas em 4 clusters distintos, conforme observado anteriormente na análise de *heat-map*.

Em B, podemos observar os gráficos de Kaplan-Meier integrando os clusters 1 e 2 e os clusters 3 e 4. Em C, podemos observar os gráficos da figura B, integrando um terceiro componente à análise. Os números em vermelho se referem a valores de $p < 0.05$.

5.6 Análises de Kaplan-Meier em gliomas de baixo grau

Avaliamos as meta-assinaturas em pacientes com glioma de grau 2 e 3 a fim de avaliar se a quantidade de infiltrados imunológicos podiam ser relacionados com a agressividade do tumor. De fato, não encontramos diferença em nenhuma das meta-assinaturas quando avaliadas individualmente, exceto a meta-assinatura de CD4 em glioma de grau 2, que teve efeito protetor nos pacientes com alta expressão dessa meta-assinatura. Nas análises combinadas, observamos que os pacientes com a meta-assinatura de CD4 alta e a meta-assinatura de CD8 baixa sobreviveram mais que os pacientes com a meta-assinatura de CD8 alta e de CD4 baixa em glioma de grau 2 (Figura 14). Já em pacientes com glioma de grau 3, observamos que a combinação das meta-assinaturas de CD8 e CD4 altas conferiam melhor prognóstico em relação às duas meta-assinaturas baixas. No entanto, as meta-assinaturas de macrófagos e exaustão não mostraram diferença em nenhuma das análises (Figura 15).

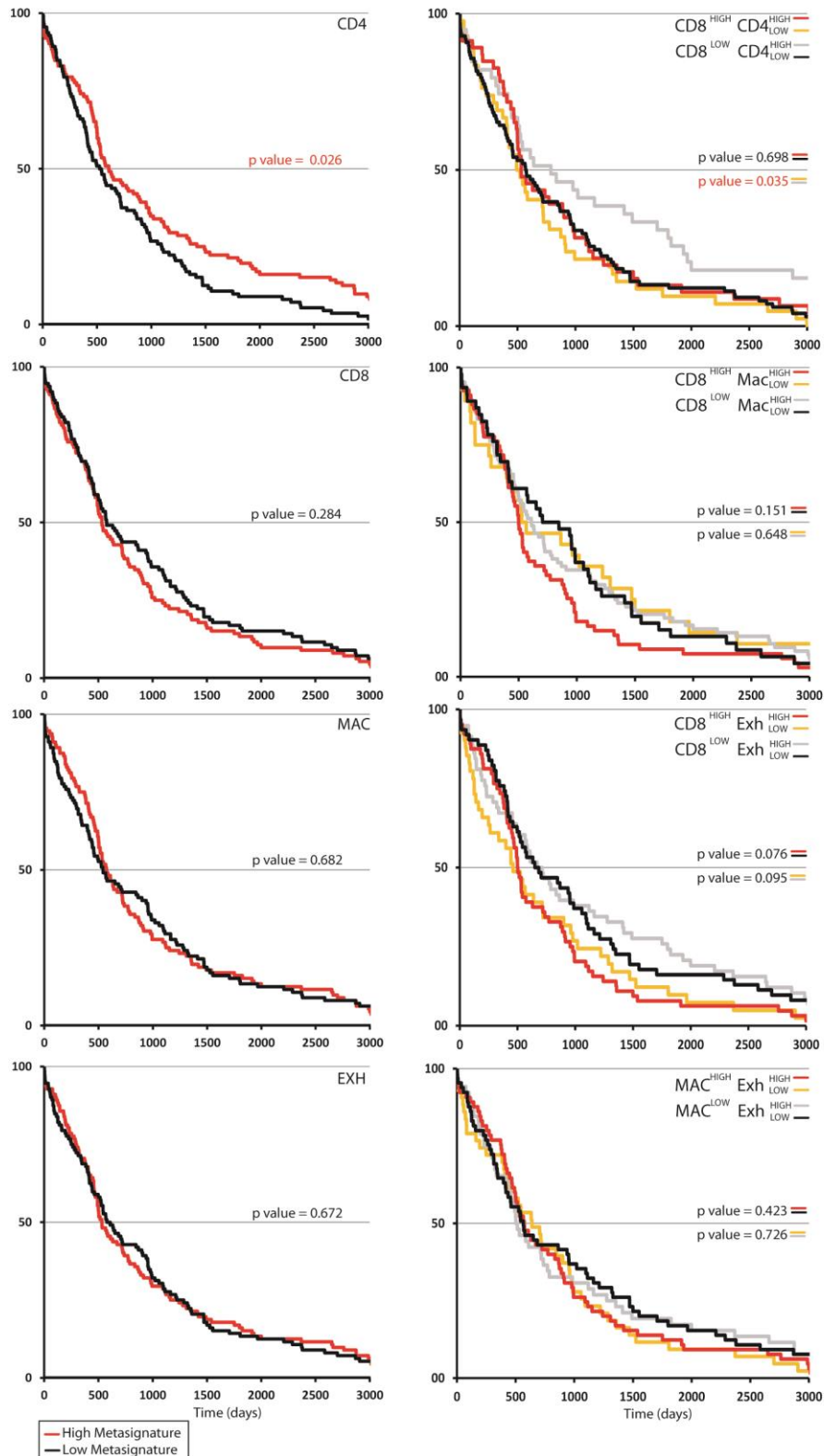


Figura 14. Análises de Kaplan-Meier em glioma de grau 2. À esquerda, os gráficos referentes a diferença da expressão das meta-assinaturas individualmente e à direita a combinação de duas meta-assinaturas distintas em pacientes com glioma de grau 2. Os resultados significativos ($p < 0.05$) estão destacados em vermelho.

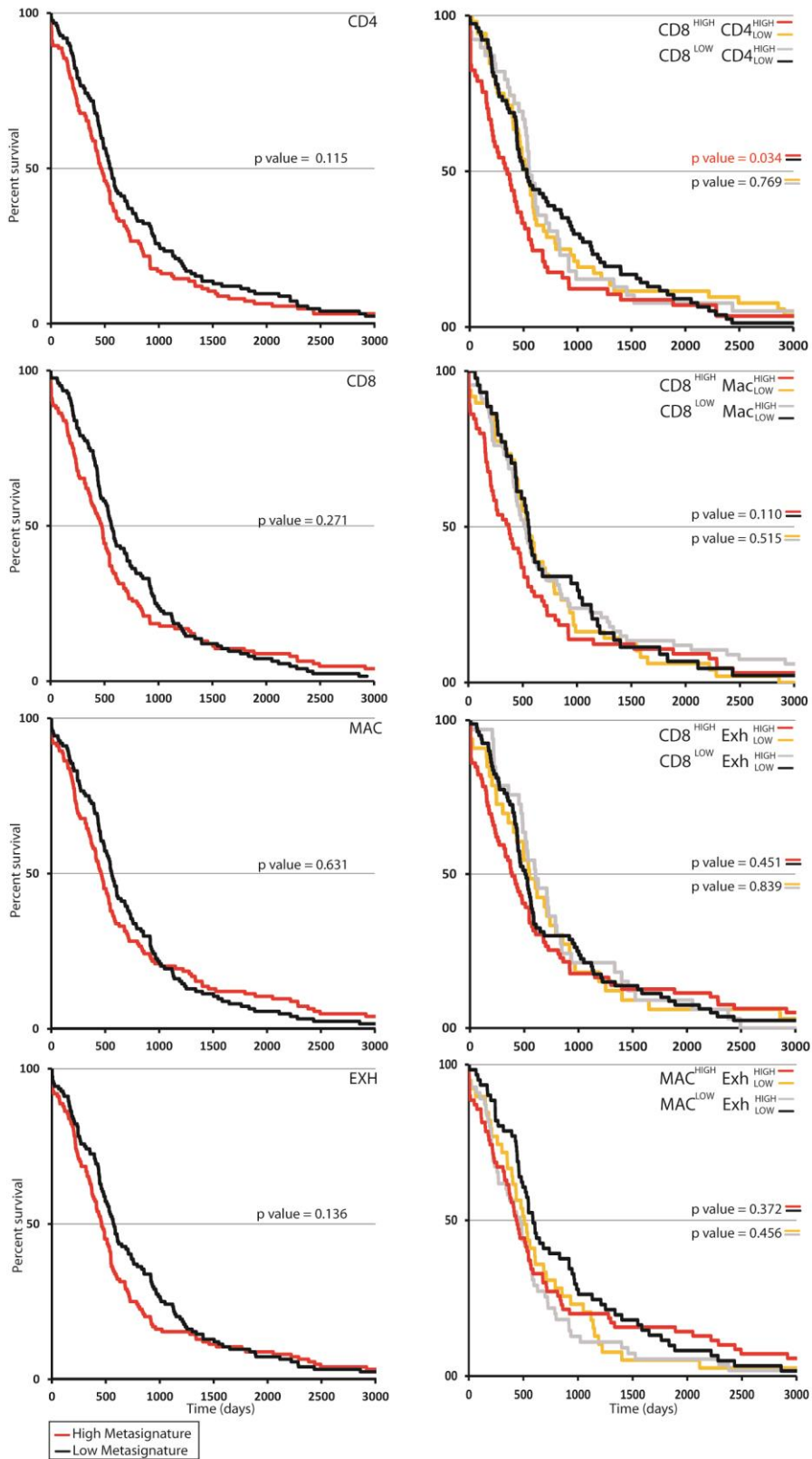


Figura 15. Análises de Kaplan-Meier em glioma de grau 3. À esquerda, os gráficos referentes a diferença da expressão das meta-assinaturas individualmente e à direita a combinação de duas meta-assinaturas distintas em pacientes com glioma de grau 3. Os resultados significativos ($p < 0.05$) estão destacados em vermelho.

6 Discussão

Os padrões de expressão do genoma de tumores são uma representação da biologia dos tumores e a diversidade na expressão destes padrões reflete a diversidade do microambiente tumoral entre os pacientes. Assim, relacionar os padrões de expressão gênica com os resultados clínicos é uma questão-chave na compreensão dessa diversidade e seus efeitos no desfecho da doença.

Nesse sentido, a identificação de elementos que ativam ou inibem a resposta imunológica efetiva contra tumores pode encontrar grande utilidade na terapia de tumores. A identificação de células que bloqueiam a resposta imunológica antitumoral através da exaustão de células T e da secreção de moléculas de suporte ao tumor é essencial na identificação de novos biomarcadores para o tratamento de tumores por imunoterapia. Dessa forma, exploramos a correlação de diferentes parâmetros relacionados à composição de infiltrados do sistema imunológico e suas funções biológicas a partir dos seus valores prognósticos. Os dados apresentados no presente trabalho constituem uma importante abordagem de caracterização do microambiente imunológico de glioblastomas em nível transcricional e sua relação com o prognóstico de pacientes com essa patologia.

Observamos através da análise de *heat-map* e posteriormente através da análise de correlação de Pearson, uma forte associação entre as meta-assinaturas do programa de exaustão e das células Th1, células T NK e células NK. Essas correlações sugerem que, na presença desses componentes, o microambiente do tumor é mais agressivo e as células de defesa, apesar de presentes, podem estar sendo bloqueadas por esses marcadores de exaustão. Células T exaustas apresentam várias características, como a perda significativa de suas funções efetoras, regulação positiva de moléculas inibitórias e alterações em seu perfil metabólico (WHERRY, 2011). Assim, além da perda de suas funções efetoras, essas células podem estar contribuindo para um ambiente imunossupressivo, conferindo um ambiente propício ao crescimento do tumor e, conseqüentemente, um pior prognóstico para os pacientes com estas características.

Também observamos fortes correlações entre as meta-assinaturas referentes às células MDSC, Macrófagos e Tregs. Apesar da possibilidade de haver diversidade nos mecanismos imunossupressores entre subtipos de glioblastoma, bem como nas células individuais, essas populações de células imunossupressoras apresentaram uma forte correlação entre elas, indicando que a sua ocorrência possa ocorrer de forma concomitantemente, gerando imunossupressão por diferentes mecanismos. As MDSCs podem suprimir a função das células T através da produção de arginase, que diminui o nível de L-arginina, aminoácido essencial para a função normal das células T. Os níveis reduzidos de arginina parecem reduzir a expressão da cadeia do receptor de células T, promovendo a disfunção das mesmas (RODRÍGUEZ & OCHOA, 2008). Estas células também secretam óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS), que também são capazes de induzir a supressão de células T (NAGARAJ; GABRILOVICH, 2007). Já as células T reguladoras podem suprimir a proliferação de qualquer célula T efetora secretora de citocinas, através da regulação negativa de IL-2 e/ou produção de interferon-gama (IFN- γ). (WAINWRIGHT et al., 2014). Os macrófagos, quando polarizados para um fenótipo M2, adquirem a capacidade de inibição da fagocitose e indução da secreção de citocinas imunossupressoras, resultando na inibição da proliferação de células T (WU et al., 2010). Além disso, o número de macrófagos infiltrados está estreitamente correlacionado com a densidade vascular e a vascularização tumoral é frequentemente um fator limitante na metástase e outros comportamentos clinicamente malignos de tumores. Observou-se um aumento aparente na densidade vascular glioblastomas, em comparação com gliomas de grau II ou III, e a infiltração de macrófagos foi observada mais frequentemente em glioblastomas de grau IV do que em gliomas de grau II ou III. Assim, a infiltração de macrófagos pode estar intimamente associada à neovascularização e também malignidade em gliomas humanos (NISHIE et al., 1999). Portanto, essas populações de células parecem, em conjunto, contribuir para um microambiente tumoral imunossupressor e de suporte ao tumor.

As meta-assinaturas de células TCD8+ e CD4+ também apresentaram correlação significativa entre elas. Como componente principal do Sistema imunológico adaptativo, as células T citotóxicas representam um biomarcador

candidato da resposta imunológica associada ao tumor. Já a importância das células T CD4 + na atividade antitumoral tem resultados contraditórios e não foram amplamente estudadas em relação à gliomas. No entanto, mostrou-se que células CD8+ sozinhas não são capazes de prever o resultado do paciente em GBM. Por um lado, as células T auxiliares CD4+ desempenham papéis críticos no recrutamento, ativação e regulação da resposta imunológica adaptativa. Sem a ajuda adequada das células T CD4+, as células T CD8+ falham com frequência nas suas funções efetoras *in vivo* (BOS et al., 2012). Sawamura et al. (1989) caracterizaram os infiltrados linfocíticos em gliomas como uma mistura de diferentes linfócitos, incluindo células CD4+ e CD8 + (SAWAMURA et al., 1989), justificando a correlação entre esses tipos celulares. Embora esses resultados apresentem presença e graus variáveis de infiltração linfocítica, há evidências que ambas as células CD8+ e CD4+ possuem importância no desfecho clínico dos pacientes em longo prazo.

Nas análises de sobrevida, observamos que pacientes apresentando alta expressão das meta-assinaturas referentes a MDSC, Treg, Macrófagos, Células Nk, Células T Nk, Th1 e Exaustão demonstraram um pior prognóstico em relação aos pacientes com baixa expressão destas meta-assinaturas. Como já discutido anteriormente, a presença de células MDSC, Tregs, Macrófagos e do programa de exaustão contribuem para um microambiente tumoral mais agressivo e altamente imunossupressivo. Já as células NK, células T NK e células Th1, por terem forte correlação com o programa de exaustão podem estar sendo bloqueadas por esses marcadores de exaustão e compondo um microambiente mais agressivo, conferindo pior prognóstico para os pacientes.

A exaustão de células NK tem sido observada em vários tumores humanos e modelos animais de tumor. Foi demonstrado que a ativação contínua de células NK resulta em diferenciação *in situ* seguida de um estado de anergia, a expressão elevada de receptores inibitórios incluindo Tim-3, e a regulação negativa de receptores de ativação e dos fatores de transcrição, EOMES e T -bet (DA SILVA et al., 2014; GILL et al., 2012; MAMESSIER et al., 2011). Tim-3 foi inicialmente identificada como uma molécula expressa em Th1, mas não nas células Th2 e desempenha um papel importante na indução de tolerância imunológica (RODRIGUEZ-MANZANET et al., 2009). Este efeito supressor de Tim-3 é

mediado pela interação com o ligante galectina-9, seguido pela promoção da apoptose de células Th1 (ZHU et al., 2005). Além disso, modelos de camundongos demonstraram que a disfunção das células NK devido à fosforilação ineficiente nas vias de sinalização de ativação surge apenas em tumores com deficiência de MHC, mas não em tumores que mantêm a expressão do MHC (ARDOLINO et al., 2014). No entanto, a exposição contínua de células NK na presença de tumores parece reduzir a atividade citotóxica (GILL et al., 2012) e o excesso de proliferação também contribui para a disfunção das células NK, uma vez que mesmo a proliferação homeostática pode induzir um estado exausto na ausência de tumor. A exaustão das células NK é também altamente específica, uma vez que os defeitos das células NK são muito mais graves nas células NK associadas ao tumor do que nas células NK periféricas do mesmo indivíduo ou animal (ARDOLINO et al., 2014; GILL et al., 2012; MAMESSIER et al., 2011). A relevância clínica da diminuição da função das células NK também é evidente na progressão da doença. Em câncer de mama, células NK com função reduzida e alta expressão de receptores inibitórios estão associadas a tumores mais agressivos e invasivos (MAMESSIER et al., 2011).

Em adição a isto, um estudo de Costello et al. (2002) demonstrou que células tumorais derivadas de pacientes com leucemia mieloide aguda (Acute Myeloid Leukemia - AML) são geralmente pouco suscetíveis à lise mediada por células NK autólogas e que este defeito está provavelmente ligado a um número insuficiente de interações de receptores de citotoxicidade natural (NCRs) e seus respectivos ligantes. Na maioria dos pacientes analisados, este defeito está ligado a baixa expressão de NCRs, isto é, receptores cruciais no reconhecimento de células-alvo para induzir a citotoxicidade mediada por NK; nos demais pacientes a baixa toxicidade mediada por NK contra as células tumorais parece ser resultado de um mecanismo de escape do tumor baseado em uma baixa ou nula expressão de ligantes de superfície nas células tumorais (COSTELLO et al., 2002).

Combinando as meta-assinaturas de macrófago e exaustão, identificamos que ambas assinaturas com alta expressão conferiam um pior prognóstico para os pacientes em relação às duas meta-assinaturas apresentando baixa expressão. No entanto, quando observamos alta expressão da assinatura de macrófagos e baixa expressão da assinatura de exaustão, os pacientes demonstraram melhor

prognóstico em relação aos pacientes com alta expressão da assinatura de exaustão e baixa expressão de macrófagos.

Quando analisamos as assinaturas de macrófagos e exaustão adicionando outra meta-assinatura como terceiro elemento à análise de Kaplan-Meier, percebemos que houve diferenças significativas quando adicionamos as MDSCs, células T NK e NK, sendo que, os pacientes com alta expressão da assinatura de macrófagos e baixa expressão de exaustão e do terceiro elemento adicionado, sendo ele MDSC, NK T ou NK, havia melhora no prognóstico dos pacientes em relação aos que apresentavam alta expressão do terceiro elemento adicionado. No entanto, os valores de p destas análises foram menores em relação às assinaturas avaliadas individualmente, o que sugere que os macrófagos poderiam ter papel duplo no microambiente tumoral, provavelmente devido à polarização M1 ou M2 que estas células podem sofrer.

Komohara et al. (2008) observaram através de análises histológicas que populações altamente proliferativas de glioblastoma induzem à polarização M2 de macrófagos infiltrantes associados ao tumor, mas isso não ocorreu em populações pouco proliferativas. Essas observações indicam que as células de glioma possuem o potencial de educar os macrófagos associados ao tumor (TAMs) e gerar um microambiente propício para a progressão de gliomas (KOMOHARA et al., 2008). Além disso, células tronco tumorais de glioblastoma podem recrutar e polarizar microglia e macrófagos para um fenótipo M2, inibir a fagocitose e induzir a secreção de citocinas imunossupressoras, resultando na inibição da proliferação de células T e favorecendo o crescimento tumoral (WU et al., 2010).

Assim, surgiu a hipótese de que grande parte dos macrófagos são polarizados para M2 e que essas células poderiam contribuir para uma piora no prognóstico dos pacientes. Na ausência do programa de exaustão e de outros mecanismos imunossupressores, os macrófagos M1 presentes poderiam conferir uma melhora na sobrevivência dos pacientes. Assim, testamos a polarização diferencial de macrófagos como terceiro elemento na análise de KM de macrófagos e exaustão. Somente encontramos relação com o prognóstico em macrófagos polarizados para M2, sendo que a alta expressão de marcadores relacionados com este fenótipo, conferiu um pior prognóstico para os pacientes,

tanto na presença quanto na ausência do programa de exaustão, confirmando os estudos anteriores que relacionam a polarização M2 de macrófagos com a progressão tumoral.

Surpreendentemente, não encontramos relação das meta-assinaturas de CD8, CD4, Th2 e Th17 com a sobrevida dos pacientes quando avaliados individualmente, indicando que os mecanismos efetores dessas células possam estar sendo afetados pela presença de outros componentes no microambiente do tumor. No entanto, nós identificamos que pacientes que apresentam alta expressão da meta-assinatura de células T CD8+ possuem melhor sobrevida que os pacientes que apresentam baixa expressão desta somente na ausência da meta-assinatura de exaustão. No entanto, na presença de células imunossupressoras e de marcadores de exaustão, ou quando avaliadas individualmente, essas células não parecem ter relação com a melhora no prognóstico dos pacientes. Adicionando a meta-assinatura de Th2 na análise de CD8/Exaustão como terceiro elemento, ainda observamos diferença entre os pacientes que apresentavam altos níveis de CD8, baixos níveis de exaustão e altos níveis de Th2 em relação aos que apresentavam baixos índices dessa meta-assinatura ($p < 0.05$).

Estudos iniciais de infiltrados de células T em glioma indicaram que havia um subconjunto de gliomas com células T infiltrantes, mas não identificaram correlação clínica nestes estudos, entretanto, 28% a 60% dos gliomas demonstraram infiltração tumoral com linfócitos. (RIDLEY & CAVANAGH, 1971; TAKEUCHI & BARNARD, 1976). Mais tarde, foi demonstrado que os pacientes que têm maior quantidade de infiltrado de células T CD8 + no momento do diagnóstico de glioma têm maior probabilidade de apresentar melhor sobrevida em longo prazo em relação aos pacientes com infiltrados de células T CD8 + raros ou focais (YANG et al., 2010).

Um estudo realizado em pacientes com linfoma Hodgkin clássico relatou que o microambiente tumoral é dominado por células Th2 e Tregs e mostraram que um grande número de células Th2 estão associadas com uma sobrevida significativamente superior ($p < 0.021$) e com sobrevida livre de eventos ($p < 0.012$). Além disso, altos índices de Tregs sobre as células Th2 resultaram numa diminuição significativa da sobrevida livre de doença ($p < 0.025$). Estas

observações sugerem que Treg pode exercer efeitos inibitórios sobre as respostas imunológicas antitumorais mediadas por células Th2 e que as células Th2 possuem papel importante na geração de resposta imunológica antitumoral (SCHRECK et al., 2009).

Um dos principais impedimentos para o desenvolvimento de imunoterapias eficazes é a complexidade do microambiente de GBM já descritos neste trabalho. Os macrófagos e as MDSCs associados ao tumor mostraram ser significativamente aumentados em pacientes com glioblastoma e proporcionam um ambiente de suporte para o crescimento das células tumorais, inibindo a expansão das células T CD8 + e CD4 + e apoiando a produção de Tregs (HUSSAIN et al., 2006); DUBINSKI et al., 2016). Adicionalmente, as células T reguladoras podem inativar células T efetoras circundantes através da regulação negativa de IL-2 e/ou produção de interferon-gama (IFN- γ). (WAINWRIGHT et al., 2011). Para a maioria dos cânceres, o acúmulo de Tregs está associado com uma resposta imunológica antitumoral ineficiente e a sua eliminação resulta na rejeição de tumores mediada por células T CD8+. (ONIZUKA et al., 1999; SHIMIZU; YAMAZAKI; SAKAGUCHI, 1999; TURK et al., 2004). Juntas, esses 3 tipos celulares – Macrófagos, MDSC e Tregs – formaram o *cluster 2*.

Foi demonstrado que o bloqueio da sinalização CSF1/CSF1R em tumores pancreáticos esgota macrófagos associados ao tumor e reprograma os macrófagos restantes para apoiar a imunidade anti-tumoral. Esse bloqueio sozinho moderou modestamente as respostas antitumorais, promoveu o aumento de infiltração de CTL e retardou a progressão do tumor. Contudo, o efeito terapêutico foi limitado pela indução de moléculas de bloqueio de respostas de células T, como PDL1 nas células tumorais e CTLA4 em células T. A adição de bloqueadores para estas moléculas melhorou a resposta da terapia e levou à regressão tumoral. Estes dados sugerem que a sinalização de CSF1 / CSF1R pode ser um alvo terapêutico eficaz para reprogramar o microambiente imunossupressor e aumentar a eficácia da imunoterapia (ZHU et al., 2014).

Além da presença dessas células que auxiliam o crescimento tumoral, o principal fator limitante para respostas imunológicas efetivas parece ser a exaustão de células T (JIANG; LI; ZHU, 2015). Células T exaustas apresentam várias características, tais como perda significativa de funções efetoras, aumento

de moléculas inibitórias no microambiente tumoral e um perfil metabólico alterado (WHERRY, 2011). Além disso, a exaustão de células NK tem sido observada em vários tumores humanos e modelos animais de tumor e essas células, quando exaustas, possuem alta expressão de receptores inibitórios e parecem contribuir para a progressão tumoral (ARDOLINO et al., 2014; GILL et al., 2012; MAMESSIER et al., 2011). Como a atividade de células T pode ser revertida modulando vias superexpressas em células exaustas (PAUKEN & WHERRY, 2015), uma abundância de evidências suporta a importância dos pontos de verificação imunológicos na exaustão de células T e na imunoterapia (GAO et al., 2013).

Assim, as meta-assinaturas de exaustão, de células NK e NK T, e células Th1, formam o *cluster* 1. Sendo assim, foram gerados dois clusters que parecem formar um programa de imunossupressão e progressão tumoral dentre os pacientes com glioblastoma. De fato, observamos que os pacientes possuem alta expressão destes dois clusters possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que possuem a expressão de ambos os clusters diminuída (Figura 13B).

Já os *clusters* 3 e 4 foram formados pelas meta-assinaturas referentes às células CD8 e CD4, e Th2 e Th17, respectivamente. A infiltração tumoral com linfócitos parece ocorrer em cerca de 28% a 60% dos gliomas. Vários estudos desde então confirmaram os diferentes graus de infiltração linfocítica em gliomas humanos com diferentes taxas de infiltração (FARMER et al., 1989; HITCHCOCK & MORRIS, 1988; STEVENS et al., 1988; VON HANWEHR et al., 1984). Os infiltrados linfocíticos foram caracterizados como uma mistura de diferentes linfócitos, incluindo células CD4+ e CD8+ (SAWAMURA et al., 1989). Foi demonstrado que os pacientes que têm infiltrado de células T CD8+ intermediário ou extenso no momento do diagnóstico com glioma estão mais propensos a ter maior sobrevida em longo prazo em relação aos pacientes com infiltrados de células T CD8+ raros ou focais (YANG et al., 2010). As células T auxiliares CD4+ desempenham papéis críticos no recrutamento, ativação e regulação da resposta imunológica adaptativa. Sem a ajuda adequada das células T CD4+, as células T CD8+ falham com frequência nas suas funções efetoras *in vivo* (BOS et al., 2012).

O papel das células CD4 polarizadas por citocinas é contraditório. As células Th17 foram associadas à piora no prognóstico em estudos de pacientes com carcinoma colorretal (LIU et al., 2011; TOSOLINI et al., 2011), pulmonar (CHEN et al., 2010) e hepatocelular (ZHANG et al., 2009), enquanto foram descritas como preditoras de melhor sobrevida em cânceres esofágicos (LV et al., 2011) e gástricos (CHEN et al., 2011). Estudos em modelos murinos relataram que a IL-17 (produzida pelas células TH17) favorece o crescimento tumoral em animais imunodeficientes pelo apoio à inflamação crônica, enquanto que favorece a rejeição tumoral em animais imunocompetentes, aumentando a resposta imunológica antitumoral (BENCHETRIT et al., 2002; TARTOUR et al., 1999; WILKE et al., 2011). As células Th2, através da ativação de células B ou da produção da citocina imunossupressora IL-10, parecem estar associadas a tumores agressivos. No entanto, células TH2 também estão associadas a um melhor prognóstico em linfoma de Hodgkin e no câncer de mama (SCHRECK et al., 2009; YOON et al., 2010), o que sugere um efeito protetor de anticorpos nestas doenças. Portanto, o efeito diferencial de outras populações de células T auxiliares pode variar devido à sua plasticidade, sendo dependente do microambiente tumoral e do tipo tumoral, como visto anteriormente na tabela 1.

Inicialmente, identificamos que a alta expressão do cluster 3 e baixa expressão do *cluster 4* conferia melhor sobrevida aos pacientes em relação a alta expressão do *cluster 4* e baixa expressão do cluster 3, sugerindo que o cluster 3 possui maior importância na predição do prognóstico dos pacientes. No entanto, nas análises combinadas utilizando o cluster 1 e 2 como principais e os clusters 3 ou 4 como terceiro elemento, identificamos os pacientes possuíam melhor sobrevida tendo baixa expressão dos clusters 1 e 2 e alta expressão dos clusters 3 ($p=0.003$) ou 4 ($p=0.018$). Assim, podemos atribuir que, enquanto os clusters 1 e 2 possuem papel pró-tumoral, os clusters 3 e 4 parecem ter papel anti-tumoral.

Nesse sentido, quando utilizamos os clusters 3 e 4 na análise combinada adicionando os *clusters 1* ou 2 como terceiro elemento, identificamos que ambos os *clusters 1* e 2 conferiam um pior prognóstico quando altamente expressos em relação aos pacientes com baixa expressão desses *clusters*, em condições em que os *clusters 3* e 4 eram altamente expressos, corroborando com o papel imunossupressor dos *clusters 1* e 2. Por outro lado, somente o *cluster 2* mostrou

diferença quanto a sua expressão quando os *clusters* 3 e 4 mostravam baixa expressão, sendo que, nessas condições, a pior sobrevida foi observada quando o *cluster* 2 apresentava alta expressão em relação aos pacientes que possuíam baixa expressão do mesmo, sugerindo que além das características de imunossupressão, esse cluster poderia ter função de suporte ao tumor.

Os glioblastomas contêm uma subpopulação de células com propriedades semelhantes a células tronco capazes de reconstituir o tumor. Estas células-tronco de glioma (GSCs) residem no nicho perivascular, onde podem ser altamente resistentes à radiação e quimioterapia (BAO et al., 2006; BLEAU et al., 2009; HAMBARDZUMYAN; SQUARTRO; HOLLAND, 2006). A importância dos GSCs para a atração de monócitos também é destacada por uma correlação positiva entre a densidade de GSCs e TAMs, indicando que GSCs podem recrutar TAMs mais eficientemente do que suas regiões neoplásicas mais diferenciadas (YI et al., 2011). Um estudo recente mostrou que os GSCs liberam a periostina, que se acumula na região perivascular. A periostina atua como um quimio-atrativo para as TAMs, que é mediada pela sinalização através do receptor α da integrina. TAM também influencia as propriedades de GSCs, onde a liberação de TGF- β induzi a expressão de MMP-9 e aumenta a invasividade das GSCs (YE et al., 2012). Da mesma forma, as GSCs inibem a atividade de fagocitose de TAMs e induzem a secreção de interleucina-10 (IL10) e TGF- β . (WU et al., 2010)

Nesse sentido, há muitos estudos que objetivam correlacionar o grau de malignidade e invasividade do tumor com a quantidade de infiltrados imunológicos. Foi identificado um aumento progressivo no número de Tregs CD25+ FoxP3+ em astrocitomas de grau II, III e IV (GBM) da OMS, respectivamente, na circulação periférica ou no tumor de gliomas ressecados humanos (EL ANDALOUSSI; LESNIAK, 2007; FECCI et al., 2006; HEIMBERGER et al., 2008). Além disso, o número de células CD68 +, um importante marcador de macrófagos, aumenta com o aumento do grau de malignidade (KOMOHARA et al., 2008) e a sobrevivência sem recorrência de pacientes com astrocitoma pilocítico está inversamente relacionada com a percentagem de células CD68 + no tumor (DORWARD et al., 2010). Por outro lado, a infiltração proliferativa de linfócitos T CD8 + em neoplasias de glioma recentemente diagnosticadas é um fator prognóstico associado com a melhora da sobrevida a longo prazo (YANG et al.,

2010). Considerando nossos resultados e os resultados descritos nestes estudos, decidimos avaliar o efeito das meta-assinaturas utilizadas neste trabalho na sobrevida de pacientes com glioma de grau 2 e 3, a fim de identificar se a quantidade de infiltrados imunológicos podiam ser relacionados com a agressividade do tumor. De fato, não encontramos nenhuma diferença na sobrevida dos pacientes com expressão diferencial de macrófagos ou do programa de exaustão. Os resultados envolvendo as meta-assinaturas de CD4 e CD8 corroboram com os estudos que descrevem uma melhor sobrevida de pacientes que possuem altos níveis de infiltração de linfócitos T CD8 em gliomas recém diagnosticados, o que sugere que essas células poderiam ter um efeito anti-tumoral nesses tumores.

A constatação de que diferentes componentes do infiltrado imunológico podem ser classificados em subgrupos distintos com resultados clínicos diferentes possui grande relevância clínica. Além disso, esse estudo prepara um cenário para estudos nos quais as características de imunologia integrada aqui propostas sejam consideradas como um mecanismo de triagem para pacientes com mais chance de responder à imunoterapia com bloqueadores de pontos de parada do sistema imunológico.

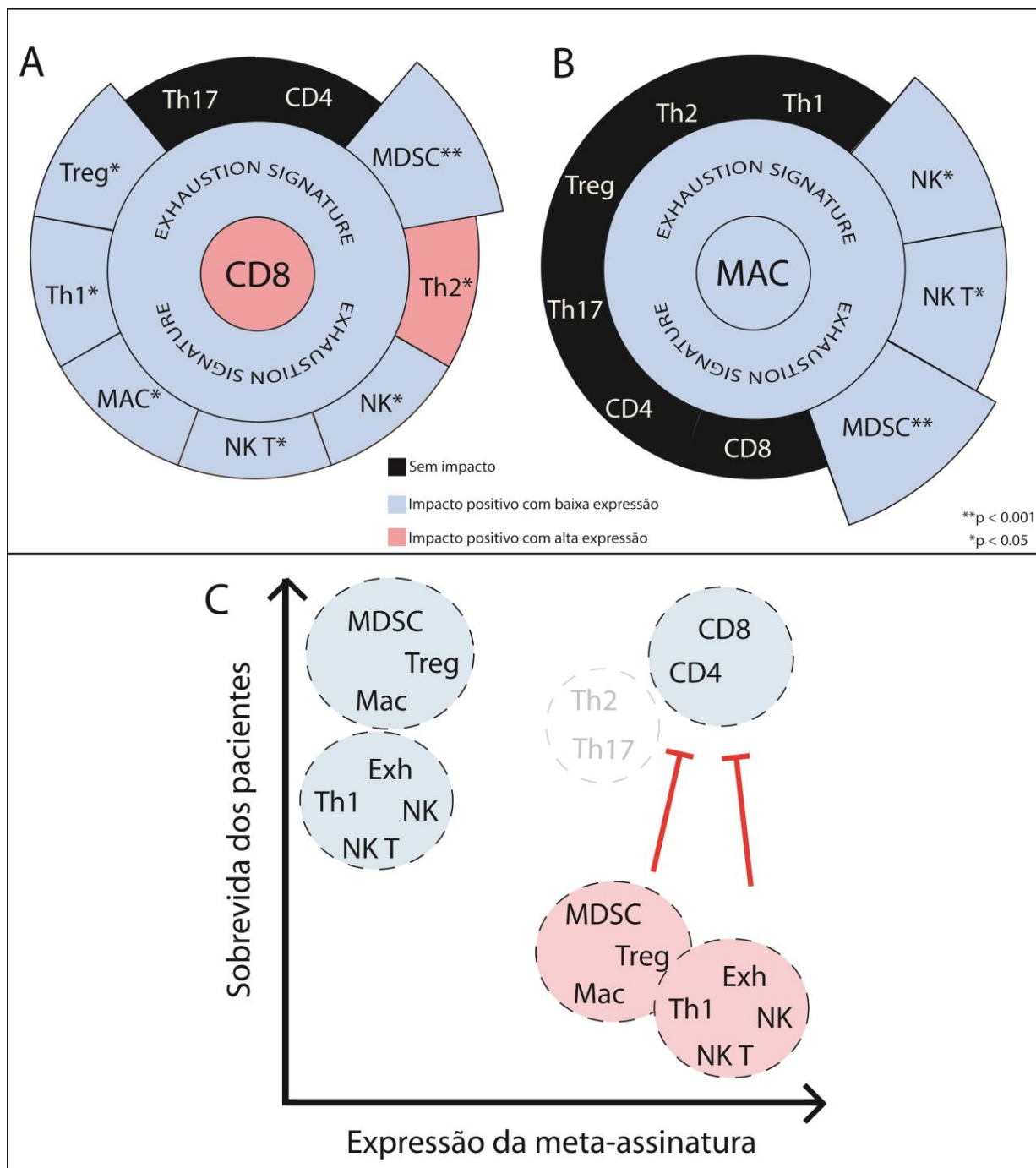


Figura 16. Relação da expressão de diferentes meta-assinaturas e o desfecho clínico dos pacientes. A) Relação da combinação das meta-assinaturas relacionadas a CD8 e Exaustão com as demais meta-assinaturas avaliadas. Quando CD8 apresenta alta expressão e Exaustão baixa expressão, a baixa expressão de Treg, Th1, Mac, NK, NK T ou MDSC demonstram um desfecho positivo nos pacientes. Por outro lado, a alta expressão de Th2 como terceiro componente nessa análise apresentou um desfecho positivo na sobrevivência dos pacientes. B) Relação da combinação das meta-assinaturas relacionadas a MAC e Exaustão com as demais meta-assinaturas avaliadas. Quando mac e exaustão apresentam baixa expressão, a baixa expressão de NK, NK T ou MDSC demonstram um desfecho positivo nos pacientes. C) A alta expressão de meta-assinaturas que representam elementos antitumorais, como CD8 e CD4, combinada com a baixa expressão de meta-assinaturas que representam elementos imunossupressores, como MDSC, Treg e Mac, conferem uma melhor sobrevivência para os pacientes. No entanto, quando os elementos imunossupressores estão altamente expressos, eles parecem bloquear a expressão de CD8 e CD4, e os pacientes apresentam um pior prognóstico.

Nosso estudo, apesar de ser muito abrangente no nível de meta-análise da expressão de diferentes componentes, tem certas limitações. A meta-análise foi realizada em conjuntos de dados públicos que não descrevem claramente os níveis de heterogeneidade tumoral. Embora o número de pacientes com glioblastoma incluídos neste estudo possa compensar parcialmente a heterogeneidade tumoral de paciente a paciente, evidências emergentes sugerem que a heterogeneidade tumoral imunológica (por exemplo, o núcleo do tumor versus as margens invasivas) precisa ser levada em consideração para a análise prognóstica (GALON et al., 2014). Nesse sentido, também seria importante diferenciar os perfis de expressão de células tumorais versus células do sistema imunológico - um ponto que não pôde ser alcançado no presente estudo. Ainda mais importante, a expressão diferencial de certos tipos celulares pode não ser representativa do seu contexto de sinalização. Por exemplo, várias modificações epigenéticas, pós-transcricionais ou pós-traducionais desempenham um papel importante na regulação do resultado da sinalização imunológica (MOWEN; DAVID, 2014). Dessa forma, os níveis de expressão gênica diferencial nem sempre refletem à presença de células ou de atividade celular. Por outro lado, assinaturas validadas em diferentes estudos refletem a capacidade de recrutamento de genes que podem não ser significativos em um estudo devido à limitação do tamanho da amostra ou artefatos das experiências. Nesse sentido, a meta-assinatura será mais estável e menos subjetiva para variações em subconjuntos das amostras em comparação ao uso de marcadores únicos. Como resultado, os genes preditivos em uma meta-assinatura podem levar informações mais confiáveis sobre a progressão do tumor e sobrevida do paciente.

Outro fator importante a ser considerado gira em torno da correlação de componentes isolados com o desfecho clínico dos pacientes. O método ideal para avaliar como uma condição influencia outra é através de experimentos onde todas as possíveis causas para essa variação são eliminadas. Infelizmente, as causas de variações geralmente não são controladas. Assim, avaliamos um grupo de características ou condições que são correlacionadas dentro de um complexo de interações incontáveis e, muitas vezes, obscuras. Dessa forma, as diferentes meta-assinaturas podem correlacionar com o desfecho da doença por diferentes

motivos. Nesse sentido, a meta-assinatura pode fornecer uma informação biológica com importância na biologia tumoral, como atividades antitumorais ou de suporte ao tumor. Por outro lado, tumores mais avançados podem ser altamente infiltrados por determinadas células (representadas pelas meta-assinaturas) por ter uma quebra na BBB e, assim, permitir o acesso de maior quantidade de células do sistema imunológico periférico. No entanto, esses fatores não são isolados. Por exemplo, a quebra da BBB pode permitir a entrada de uma quantidade maior de macrófagos e estes podem contribuir para o crescimento do tumor. Sendo assim, os macrófagos estariam presentes devido ao estágio do tumor e, ao mesmo tempo, estariam contribuindo para o crescimento tumoral.

No entanto, a compreensão acerca dos diversos fatores reguladores e estimuladores do sistema imunológico no paciente, bem como no microambiente tumoral, é essencial para delinear uma estratégia eficaz com o objetivo de aumentar a resposta imunológica anti-tumoral e gerar benefícios clínicos reais. Diferentes interações entre células do sistema imunológico inatas e adaptativas podem levar a condições inflamatórias que podem favorecer ou inibir a progressão tumoral. Portanto, à medida que a imunoterapia evolui, biomarcadores prognósticos e preditivos são de extrema importância para determinar quais pacientes serão os melhores candidatos para diferentes estratégias de imunoterapia.

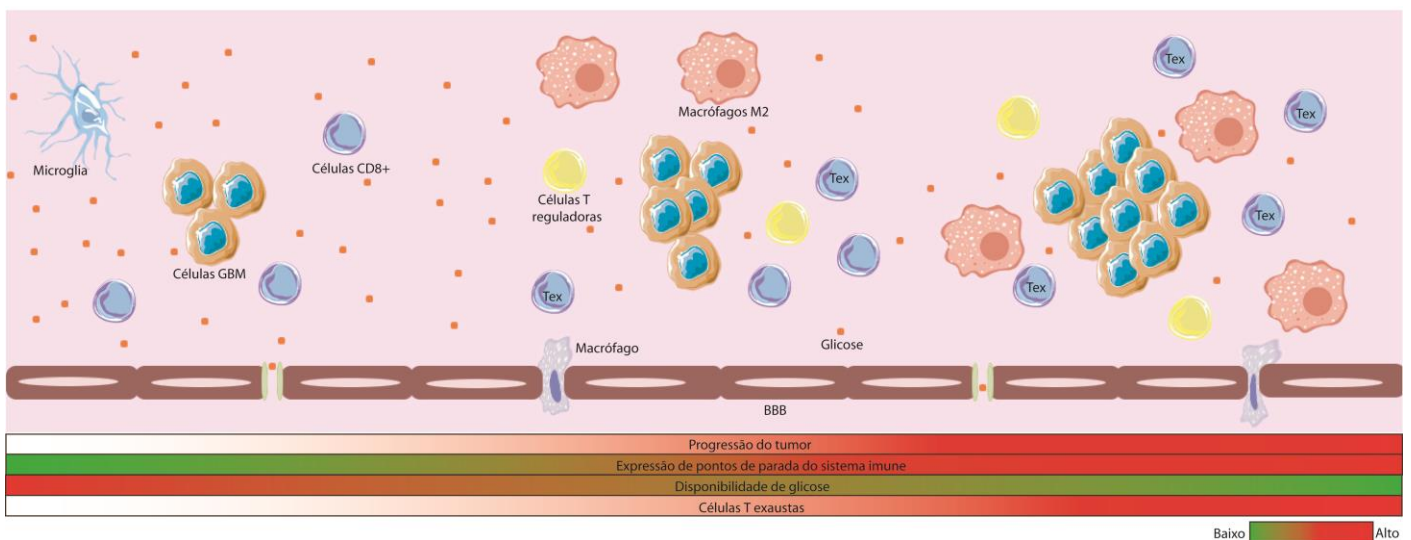


Figura 17. Infiltração diferencial do sistema imunológico ao longo da progressão tumoral. Ao longo da progressão tumoral, a disponibilidade de glicose é limitada por consequência do alto consumo por parte das células tumorais, diminuindo a disponibilidade para as células T CD8+. As células tumorais atraem macrófagos e células T reguladoras para o microambiente tumoral. Os macrófagos associados ao tumor (TAM) são induzidos à polarização M2, dando suporte ao

crescimento tumoral e contribuindo para um ambiente imunossupressor e para a exaustão de células T CD8+. Essa imunossupressão é ainda maior pela presença de células T reguladoras e pela escassez de glicose no microambiente. (Adaptado de Mirzaei et al., 2016)

7 Conclusões

- Interações entre células do sistema imunológico inatas e adaptativas podem levar a condições inflamatórias que podem favorecer ou inibir a progressão tumoral de gliomas;
- Em glioblastoma, a alta expressão de meta-assinaturas referentes à células do sistema imunológico infiltrantes, tais como macrófagos, MDSCs e Tregs, correlacionam-se com piora no prognóstico dos pacientes;
- Uma grande quantidade de meta-assinaturas referentes à células NK infiltradas podem ser correlacionadas com pior prognóstico, provavelmente devido à imunossupressão dessas células causada pelo microambiente ou por sua ativação contínua;
- A alta expressão de meta-assinatura referente à linfócitos T CD8+ infiltrados se correlacionam com melhor prognóstico, na ausência de elementos imunossupressores;
- A ativação de respostas imunológicas adaptativas antitumorais pode suprimir o crescimento tumoral
- Gliomas de grau II e III possuem níveis e padrões diferentes de infiltração de células do sistema imunológico.
- O uso de indutores da resposta imunológica antitumoral poderia contribuir para a regressão tumoral.
- O bloqueio de células responsáveis pela imunossupressão e progressão tumoral poderia ampliar a resposta imunológica antitumoral (bloqueio de CSF1/CSF1R para reprogramar macrófagos e MDSCs).
- O bloqueio de bloqueadores do sistema imunológico antitumoral (como PD1 e CTLA-4) poderia ser utilizado em conjunto com as abordagens anteriores para evitar mecanismos de bloqueio de células T por compensação e, assim, aumentar a resposta antitumoral.

8 Referências

- AGARWALLA, P. et al. Sequential Immunotherapy by Vaccination with GM-CSF Expressing Glioma Cells and CTLA-4 Blockade Effectively Treats Established Murine Intracranial Tumors. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 35, n. 5, p. 385, 2012.
- AGOSTINI, M. et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. **Cell Death & Differentiation**, 2016.
- AKIYAMA, H.; MCGEER, P. L. Brain microglia constitutively express β -2 integrins. **Journal of neuroimmunology**, v. 30, n. 1, p. 81–93, 1990.
- ALIZADEH, D. et al. Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 13, p. 3399–3408, 2010.
- ALMAND, B. et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 678–689, 2001.
- ALVAREZ-BRECKENRIDGE, C. A. et al. NK cells impede glioblastoma virotherapy through NKp30 and NKp46 natural cytotoxicity receptors. **Nature medicine**, v. 18, n. 12, p. 1827–1834, 2012.
- AMARAL, A. I. et al. Characterization of glucose-related metabolic pathways in differentiated rat oligodendrocyte lineage cells. **Glia**, v. 64, n. 1, p. 21–34, 2016.
- APPIN, C. L.; BRAT, D. J. Molecular genetics of gliomas. **The Cancer Journal**, v. 20, n. 1, p. 66–72, 2014.
- ARDOLINO, M. et al. Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 11, p. 4781–4794, 2014.
- ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 6, p. 420–430, 2002.
- AUF, G. et al. Implication of macrophages in tumor rejection induced by CpG-oligodeoxynucleotides without antigen. **Clinical cancer research**, v. 7, n. 11, p. 3540–3543, 2001.
- BADIE, B.; SCHARTNER, J. Role of microglia in glioma biology. **Microscopy research and technique**, v. 54, n. 2, p. 106–113, 2001.
- BAO, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **nature**, v. 444, n. 7120, p. 756–760, 2006.
- BECHER, B.; ANTEL, J. P. Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. **Glia**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 1996.
- BECKNER, M. E. et al. Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. **Laboratory investigation**, v. 85, n. 12, p. 1457–1470, 2005.

- BENCHETRIT, F. et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell–dependent mechanism. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 2114–2121, 2002.
- BENGSCHE, B. et al. Bioenergetic insufficiencies due to metabolic alterations regulated by the inhibitory receptor PD-1 are an early driver of CD8+ T cell exhaustion. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 358–373, 2016.
- BENNETT, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nature genetics**, v. 27, n. 1, p. 20, 2001.
- BENVENISTE, E. N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of molecular medicine**, v. 75, n. 3, p. 165–173, 1997.
- BERGHOFF, A. S. et al. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. **Neuro-oncology**, v. 17, n. 8, p. 1064–1075, 2015.
- BLEAU, A.-M. et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. **Cell stem cell**, v. 4, n. 3, p. 226–235, 2009.
- BLOCH, O. et al. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. **Clinical cancer research**, v. 19, n. 12, p. 3165–3175, 2013.
- BORREGO, F. et al. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence–derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell–mediated lysis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 5, p. 813–818, 1998.
- BOS, R. et al. Functional differences between low- and high-affinity CD8+ T cells in the tumor environment. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 8, p. 1239–1247, 2012.
- BOWLES JR, A. P.; PERKINS, E. Long-term remission of malignant brain tumors after intracranial infection: a report of four cases. **Neurosurgery**, v. 44, n. 3, p. 636–642, 1999.
- BRAHMER, J. R. et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2455–2465, 2012.
- BRENNER, A. V et al. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. **International journal of cancer**, v. 99, n. 2, p. 252–259, 2002.
- BRISENO, C. G. et al. Distinct transcriptional programs control cross-priming in classical and monocyte-derived dendritic cells. **Cell reports**, v. 15, n. 11, p. 2462–2474, 2016.
- BROKER, M. Potential protective immunogenicity of tetanus toxoid, diphtheria toxoid and Cross Reacting Material 197 (CRM197) when used as carrier proteins in glycoconjugates. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 664–667, 2016.
- BROMLEY, S. K.; MEMPEL, T. R.; LUSTER, A. D. Orchestrating the

- orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. **Nature immunology**, v. 9, n. 9, p. 970–980, 2008.
- BRONTE, V. et al. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. **Journal of Immunotherapy**, v. 24, n. 6, p. 431–446, 2001.
- BROOKS, W. H. et al. Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors Characterization of a humoral immunosuppressive factor. **The Journal of experimental medicine**, v. 136, n. 6, p. 1631–1647, 1972.
- BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L.; ROGERS, A. S. Impairment of rosette-forming T lymphocytes in patients with primary intracranial tumors. **Cancer**, v. 37, n. 4, p. 1869–1873, 1976.
- BRUNET, J.-F. et al. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. 1987.
- BRUTTGER, J. et al. Genetic cell ablation reveals clusters of local self-renewing microglia in the mammalian central nervous system. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 92–106, 2015.
- BSIBSI, M. et al. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 61, n. 11, p. 1013–1021, 2002.
- BUCCI, M. K. et al. Near complete surgical resection predicts a favorable outcome in pediatric patients with nonbrainstem, malignant gliomas. **Cancer**, v. 101, n. 4, p. 817–824, 2004.
- BUCKNER, J. C. **Factors influencing survival in high-grade gliomas**. Seminars in oncology. **Anais...Elsevier**, 2003
- CANDOLFI, M. et al. B Cells Are Critical to T-cell—Mediated Antitumor Immunity Induced by a Combined Immune-Stimulatory/Conditionally Cytotoxic Therapy for Glioblastoma. **Neoplasia**, v. 13, n. 10, p. 947IN19-960IN23, 2011.
- CARPENTIER, A. F. et al. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 2469–2473, 2000.
- CARPENTIER, A. F.; AUF, G.; DELATTRE, J.-Y. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy: review of the literature and potential applications in malignant glioma. **Front Biosci**, v. 8, n. January, p. e115–e127, 2003.
- CARRASCO, Y. R.; BATISTA, F. D. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 160–171, 2007.
- CASTRICONI, R. et al. NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 6, p. 3530–3539, 2009.
- CECCARELLI, M. et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 550–563, 2016.
- CHAMPIAT, S. et al. Exomics and immunogenics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. **Oncoimmunology**, v. 3, n. 1, p. e27817, 2014.

- CHANG, C.-H. et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1229–1241, 2015.
- CHEN, J. G. et al. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 1, p. 53–60, 2011.
- CHEN, X. et al. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. **Lung cancer**, v. 69, n. 3, p. 348–354, 2010.
- CLARK, M. R. et al. B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 3, p. 382–387, 2004.
- COBBS, C. S. et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. **Cancer research**, v. 62, n. 12, p. 3347–3350, 2002.
- COSTELLO, R. T. et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3661–3667, 2002.
- CRAWFORD, A. et al. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3498–3506, 2006.
- CURIEL, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature medicine**, v. 10, n. 9, p. 942–949, 2004.
- CURRAN, M. A. et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 9, p. 4275–4280, 2010.
- D'ANDREA, A. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med**, v. 178, p. 1041–1048, 1993.
- DA SILVA, I. P. et al. Reversal of NK cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. **Cancer immunology research**, p. canimm-0171, 2014.
- DE KRUIJF, E. M. et al. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 24, 2012.
- DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209–1220, 1991.
- DHODAPKAR, K. M. et al. Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit antitumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion. **International journal of cancer**, v. 109, n. 6, p. 893–899, 2004.
- DICK, A. D. et al. Flow cytometric identification of a minority population of MHC class II positive cells in the normal rat retina distinct from CD45^{low}CD11b/c⁺CD4^{low} parenchymal microglia. **British Journal of Ophthalmology**, v. 79, n. 9, p. 834–840, 1995.

DORWARD, I. G. et al. Postoperative imaging surveillance in pediatric pilocytic astrocytomas: Clinical article. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 6, n. 4, p. 346–352, 2010.

DOUCETTE, T. et al. Immune heterogeneity of glioblastoma subtypes: extrapolation from the cancer genome atlas. **Cancer immunology research**, 2013.

DU, R. et al. HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. **Cancer cell**, v. 13, n. 3, p. 206–220, 2008.

DUBINSKI, D. et al. CD4+ T effector memory cell dysfunction is associated with the accumulation of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in glioblastoma patients. **Neuro-oncology**, v. 18, n. 6, p. 807–818, 2016.

DUDLEY, M. E. et al. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. **Journal of immunotherapy**, v. 24, n. 4, p. 363–373, 2001.

DULUC, D. et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4319–4330, 2007.

DUNN, G. P.; DUNN, I. F.; CURRY, W. T. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. **Cancer Immunity Archive**, v. 7, n. 1, p. 12, 2007.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 329–360, 2004.

EL ANDALOUSSI, A.; LESNIAK, M. S. An increase in CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. **Neuro-oncology**, v. 8, n. 3, p. 234–243, 2006.

EL ANDALOUSSI, A.; LESNIAK, M. S. CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 83, n. 2, p. 145–152, 2007.

ELLIOTT, L. H.; BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L. Cytokinetic basis for the impaired activation of lymphocytes from patients with primary intracranial tumors. **The Journal of Immunology**, v. 132, n. 3, p. 1208–1215, 1984.

EVANS, D. E. et al. Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 2, p. 688–697, 2000.

FADUL, C. E. et al. Immune response in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 34, n. 4, p. 382, 2011.

FARMER, J.-P. et al. Characterization of lymphoid cells isolated from human gliomas. **Journal of neurosurgery**, v. 71, n. 4, p. 528–533, 1989.

FECCHI, P. E. et al. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma.

- Cancer research**, v. 66, n. 6, p. 3294–3302, 2006.
- FECCI, P. E. et al. Systemic CTLA-4 blockade ameliorates glioma-induced changes to the CD4+ T cell compartment without affecting regulatory T-cell function. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 7, p. 2158–2167, 2007.
- FELDMEYER, L.; GAIDE, O.; SPEISER, D. E. Clinical Implications of CD8+ T-cell infiltration in frequent and rare cancers. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 8, p. 1929–1932, 2013.
- FISCHBACH, A. J. et al. Long-Term Survival in Treated Anaplastic Astrocytomas: A Report of Combined RTOG/ECOG Studies. **American journal of clinical oncology**, v. 14, n. 5, p. 365–370, 1991.
- FISCHER, H.-G.; REICHMANN, G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 4, p. 2717–2726, 2001.
- FISHER, J. L. et al. Epidemiology of brain tumors. **Neurologic clinics**, v. 25, n. 4, p. 867–890, 2007.
- FLAVAHAN, W. A. et al. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 1373–1382, 2013.
- FOSSATI, G. et al. Neutrophil infiltration into human gliomas. **Acta neuropathologica**, v. 98, n. 4, p. 349–354, 1999.
- FRANCISCO, L. M. et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 3015–3029, 2009.
- FRAUWIRTH, K. A. et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 769–777, 2002.
- FRIESE, M. A. et al. RNA interference targeting transforming growth factor- β enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. **Cancer research**, v. 64, n. 20, p. 7596–7603, 2004.
- GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 3, p. 162–174, 2009.
- GABRUSIEWICZ, K. et al. Macrophage ablation reduces M2-like populations and jeopardizes tumor growth in a MAFIA-based glioma model. **Neoplasia**, v. 17, n. 4, p. 374–384, 2015.
- GABRUSIEWICZ, K. et al. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. **JCI insight**, v. 1, n. 2, 2016.
- GALON, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, v. 313, n. 5795, p. 1960–1964, 2006.
- GALON, J. et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. **The Journal of pathology**, v. 232, n. 2, p. 199–209, 2014.

- GAO, J. et al. Advances in the development of cancer immunotherapies. **Trends in immunology**, v. 34, n. 2, p. 90–98, 2013.
- GATSON, N. T.; WEATHERS, S. P.; DE GROOT, J. F. ReACT Phase II trial: a critical evaluation of the use of rindopepimut plus bevacizumab to treat EGFRvIII-positive recurrent glioblastoma. **CNS oncology**, v. 5, n. 1, p. 11–26, 2015.
- GAUTIER, E. L. et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nature immunology**, v. 13, n. 11, p. 1118–1128, 2012.
- GERVASONI, C. et al. Cerebral astrocytoma in HIV-infected patients. **Aids**, v. 9, n. 4, p. 403–404, 1995.
- GIELEN, P. R. et al. Increase in both CD14-positive and CD15-positive myeloid-derived suppressor cell subpopulations in the blood of patients with glioma but predominance of CD15-positive myeloid-derived suppressor cells in glioma tissue. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 74, n. 5, p. 390–400, 2015.
- GILBERT, M. R. et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. **Journal of clinical oncology**, v. 31, n. 32, p. 4085–4091, 2013.
- GILL, S. et al. Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. **Blood**, v. 119, n. 24, p. 5758–5768, 2012.
- GOBERT, M. et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. **Cancer research**, v. 69, n. 5, p. 2000–2009, 2009.
- GORBACH, A. M. et al. Intraoperative infrared imaging of brain tumors. **Journal of neurosurgery**, v. 101, n. 6, p. 960–969, 2004.
- GRAUER, O. M. et al. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. **International journal of cancer**, v. 121, n. 1, p. 95–105, 2007.
- GRIEB, P. 5-Aminolevulinic acid (ALA) and its applications in neurosurgery. **Neurologia i neurochirurgia polska**, v. 38, n. 3, p. 201–207, 2003.
- GROSSMAN, S. A.; BATARA, J. F. **Current management of glioblastoma multiforme**. Seminars in oncology. **Anais...Elsevier**, 2004
- GU-TRANTIEN, C.; WILLARD-GALLO, K. Tumor-infiltrating follicular helper T cells: the new kids on the block. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 10, p. e26066, 2013.
- GUTMANN, D. H. et al. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. **Genome research**, v. 23, n. 3, p. 431–439, 2013.
- HAMBARDZUMYAN, D.; SQUARTRO, M.; HOLLAND, E. C. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. **Cancer cell**, v. 10, n. 6, p. 454–456, 2006.
- HAN, S. et al. Tumour-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. **British journal of cancer**, v. 110, n. 10, p. 2560–2568,

2014.

HAO, C. et al. Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation. **Acta neuropathologica**, v. 103, n. 2, p. 171–178, 2002.

HEIMBERGER, A. B. et al. Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 16, p. 5166–5172, 2008.

HESS, D. C. et al. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. **Experimental neurology**, v. 186, n. 2, p. 134–144, 2004.

HINDLEY, J. P. et al. Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. **Cancer research**, v. 71, n. 3, p. 736–746, 2011.

HITCHCOCK, E. R.; MORRIS, C. S. Mononuclear cell infiltration in central portions of human astrocytomas. **Journal of neurosurgery**, v. 68, n. 3, p. 432–437, 1988.

HO, I.-C.; GLIMCHER, L. H. Transcription: tantalizing times for T cells. **Cell**, v. 109, n. 2, p. S109–S120, 2002.

HO, P.-C. et al. Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1217–1228, 2015.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, v. 2010, n. 363, p. 711–723, 2010.

HOFT, D. F. et al. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic Trypanosoma cruzi immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 10, p. 6889–6900, 2007.

HON, H. et al. B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p. 5233–5242, 2005.

HOU, X. et al. PERK silence inhibits glioma cell growth under low glucose stress by blockage of p-AKT and subsequent HK2's mitochondria translocation. **Scientific reports**, v. 5, p. 9065, 2015.

HOWARTH, C.; GLEESON, P.; ATTWELL, D. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1222–1232, 2012.

HSIA, J. et al. Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. **Chang Gung medical journal**, v. 28, n. 5, p. 335, 2005.

HUSE, J. T. et al. Where are we now? And where are we going? A report from the Accelerate Brain Cancer Cure (ABC2) Low-grade Glioma Research Workshop. **Neuro-oncology**, p. not229, 2013.

HUSSAIN, S. F. et al. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. **Neuro-oncology**, v. 8, n. 3, p. 261–279, 2006.

ISHIGAMI, S. et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. **Cancer**, v. 88, n. 3, p. 577–583, 2000.

ISHIKAWA, E. et al. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. **Anticancer research**, v. 24, n. 3B, p. 1861–1871, 2004.

JACOBS, J. F. M. et al. Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. **Neuro-oncology**, v. 11, n. 4, p. 394–402, 2009.

JACOBS, S. R. et al. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4476–4486, 2008.

JEREMIC, B. et al. Clinical prognostic factors in patients with malignant glioma treated with combined modality approach. **American journal of clinical oncology**, v. 27, n. 2, p. 195–204, 2004.

JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell death & disease**, v. 6, n. 6, p. e1792, 2015.

JOHANNESSEN, T. B.; LANGMARK, F.; LOTE, K. Progress in long-term survival in adult patients with supratentorial low-grade gliomas: a population-based study of 993 patients in whom tumors were diagnosed between 1970 and 1993. **Journal of neurosurgery**, v. 99, n. 5, p. 854–862, 2003.

JOHN, S. Y. et al. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. **Cancer research**, v. 64, n. 14, p. 4973–4979, 2004.

JORDAN, J. T. et al. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 57, n. 1, p. 123–131, 2008.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 677–704, 2008.

KELLY, P. J. et al. Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms. **Journal of neurosurgery**, v. 66, n. 6, p. 865–874, 1987.

KIDA, S. et al. Anatomical pathways for lymphatic drainage of the brain and their pathological significance. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 21, n. 3, p. 181–184, 1995.

KIDA, S.; PANTAZIS, A.; WELLER, R. O. CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 19, n. 6, p. 480–488, 1993.

KIM, C. H. et al. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 9, p. 1331–1339, 2001.

KIVISÄKK, P. et al. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8389–8394, 2003.

- KMIECIK, J. et al. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. **Journal of neuroimmunology**, v. 264, n. 1, p. 71–83, 2013.
- KNUTSON, K. L. et al. Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369–377, results in short-lived peptide-specific immunity. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 1014–1018, 2002.
- KO, J. S. et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 2148–2157, 2009.
- KOMOHARA, Y. et al. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **The Journal of pathology**, v. 216, n. 1, p. 15–24, 2008.
- KONDO, E. et al. Preoperative natural killer cell activity as a prognostic factor for distant metastasis following surgery for colon cancer. **Digestive surgery**, v. 20, n. 5, p. 445–451, 2003.
- LAFUENTE, J. V et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β) in human gliomas. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 177–185, 1999.
- LANIER, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. **Nature immunology**, v. 9, n. 5, p. 495–502, 2008.
- LARKIN, J. et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. **N Engl J Med**, v. 2015, n. 373, p. 23–34, 2015.
- LAVIN, Y. et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312–1326, 2014.
- LAWS, E. R. et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. **Journal of neurosurgery**, v. 99, n. 3, p. 467–473, 2003.
- LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, 1990.
- LAWSON, L. J.; PERRY, V. H.; GORDON, S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 48, n. 2, p. 405–415, 1992.
- LIAU, L. M. et al. Treatment of a glioblastoma patient by vaccination with autologous dendritic cells pulsed with allogeneic major histocompatibility complex class I–matched tumor peptides: case report. **Neurosurgical focus**, v. 9, n. 6, p. 1–5, 2000.
- LING, E.; WONG, W. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. **Glia**, v. 7, n. 1, p. 9–18, 1993.
- LIU, J. et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 407, n. 2, p. 348–354, 2011.
- LIU, V. C. et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+ CD25–

- T cells into CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- β . **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 2883–2892, 2007.
- LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1701–1711, 2006.
- LIU, Y. et al. PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 35, p. 14231–14245, 2013.
- LOPEZ-VERGÈS, S. et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56^{dim}CD16⁺ NK-cell subset. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3865–3874, 2010.
- LOUIS, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 1, p. 97–117, 2006.
- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.
- LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 337–341, 2015.
- LV, L. et al. The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e18219, 2011.
- MACINTYRE, A. N. et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. **Cell metabolism**, v. 20, n. 1, p. 61–72, 2014.
- MAES, W. et al. Depletion of regulatory T cells in a mouse experimental glioma model through anti-CD25 treatment results in the infiltration of non-immunosuppressive myeloid cells in the brain. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.
- MAMELAK, A. N.; JACOBY, D. B. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). **Expert opinion on drug delivery**, v. 4, n. 2, p. 175–186, 2007.
- MAMESSIER, E. et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 9, p. 3609–3622, 2011.
- MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.
- MARTIN-OROZCO, N. et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 787–798, 2009.
- MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 453–461, 2007.
- MASS, E. et al. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. **Science**, v. 353, n. 6304, p. aaf4238, 2016.

- MASUI, K. et al. mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. **Cell metabolism**, v. 18, n. 5, p. 726–739, 2013.
- MATTES, J. et al. Immunotherapy of Cytotoxic T Cell-resistant Tumors by T Helper 2 Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 3, p. 387–393, 2003.
- MCCOY, K. D.; LE GROS, G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. **Immunology and cell biology**, v. 77, n. 1, p. 1–10, 1999.
- MCNAMARA, M. G. et al. Factors impacting survival following second surgery in patients with glioblastoma in the temozolomide treatment era, incorporating neutrophil/lymphocyte ratio and time to first progression. **Journal of neuro-oncology**, v. 117, n. 1, p. 147–152, 2014.
- MERGENTHALER, P. et al. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 10, p. 587–597, 2013.
- MILDNER, A. et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 1544–1553, 2007.
- MITCHELL, D. A. et al. Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. **Nature**, v. 519, n. 7543, p. 366–369, 2015.
- MORANTZ, R. A. et al. Macrophages in experimental and human brain tumors: part 2: studies of the macrophage content of human brain tumors. **Journal of neurosurgery**, v. 50, n. 3, p. 305–311, 1979.
- MORFORD, L. A. et al. T cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 9, p. 4415–4425, 1997.
- MORGELLO, S. et al. The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. **Glia**, v. 14, n. 1, p. 43–54, 1995.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.
- MOULIGNIER, A. et al. Cerebral glial tumors and human immunodeficiency virus-1 infection: More than a coincidental association. **Cancer**, v. 74, n. 2, p. 686–692, 1994.
- MOULIN, V. et al. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 4, p. 475–482, 2000.
- MOWEN, K. A.; DAVID, M. Unconventional post-translational modifications in immunological signaling. **Nature immunology**, v. 15, n. 6, p. 512–520, 2014.
- MURPHY, K. et al. **Janeway immunologie**. [s.l.] Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- NAGARAJ, S.; GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells. In: **Immune-Mediated Diseases**. [s.l.] Springer, 2007. p. 213–223.
- NAGARAJ, S.; GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in human

- cancer. **The Cancer Journal**, v. 16, n. 4, p. 348–353, 2010.
- NAIR, S. K. et al. Recognition and killing of autologous, primary glioblastoma tumor cells by human cytomegalovirus pp65-specific cytotoxic T cells. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 10, p. 2684–2694, 2014.
- NDUOM, E. K. et al. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. **Neuro-oncology**, p. nov172, 2015.
- NEAL, J. W. et al. A malignant astrocytoma in a patient with AIDS: a possible association between astrocytomas and HIV infection. **Journal of Infection**, v. 33, n. 3, p. 159–162, 1996.
- NISHIE, A. et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 1107–1113, 1999.
- NISHIKAWA, H. et al. CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10902–10906, 2003.
- NISHIMURA, T. et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 5, p. 617–628, 1999.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta neuropathologica**, v. 109, n. 1, p. 93–108, 2005.
- OKABE, Y.; MEDZHITOV, R. Tissue biology perspective on macrophages. **Nature immunology**, v. 17, n. 1, p. 9–17, 2016.
- OKADA, H. et al. Induction of robust type-I CD8+ T-cell responses in WHO grade 2 low-grade glioma patients receiving peptide-based vaccines in combination with poly-ICLC. **Clinical cancer research**, v. 21, n. 2, p. 286–294, 2015.
- OKADA, T. et al. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. **PLoS Biol**, v. 3, n. 6, p. e150, 2005.
- OLSON, J. K.; MILLER, S. D. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 6, p. 3916–3924, 2004.
- ONIZUKA, S. et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor α) monoclonal antibody. **Cancer research**, v. 59, n. 13, p. 3128–3133, 1999.
- OZAO-CHOY, J. et al. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. **Cancer research**, v. 69, n. 6, p. 2514–2522, 2009.
- PARKER, K. H.; BEURY, D. W.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Chapter Three-Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. **Advances in cancer research**, v. 128, p. 95–139, 2015.
- PARRY, R. V et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 21, p. 9543–9553, 2005.

PARSA, A. T. et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. **Nature medicine**, v. 13, n. 1, p. 84–88, 2007.

PATEL, A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, v. 344, n. 6190, p. 1396–1401, 2014.

PATSOUKIS, N. et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. **Nature communications**, v. 6, 2015.

PAUKEN, K. E.; WHERRY, E. J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. **Trends in immunology**, v. 36, n. 4, p. 265–276, 2015.

PERANZONI, E. et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 2, p. 238–244, 2010.

PERDIGUERO, E. G. et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 547–551, 2015.

PHUPHANICH, S. et al. Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 62, n. 1, p. 125–135, 2013.

POLI, A. et al. Targeting glioblastoma with NK cells and mAb against NG2/CSPG4 prolongs animal survival. **Oncotarget**, v. 4, n. 9, p. 1527–1546, 2013.

POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 71–78, 2004.

POSTOW, M. A. et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. **N Engl J Med**, v. 2015, n. 372, p. 2006–2017, 2015.

PRINS, R. M.; LIAU, L. M. Immunology and immunotherapy in neurosurgical disease. **Neurosurgery**, v. 53, n. 1, p. 144–153, 2003.

PROSNIAK, M. et al. Glioma grade is associated with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 14, p. 3776–3786, 2013.

PURDY, A. K.; CAMPBELL, K. S. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). **Cancer biology & therapy**, v. 8, n. 23, p. 2209–2218, 2009.

PYONTECK, S. M. et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. **Nature medicine**, v. 19, n. 10, p. 1264–1272, 2013.

RANSOHOFF, R. M.; KIVISÄKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 569–581, 2003.

RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 7, p. 489–501, 2003.

RAYCHAUDHURI, B. et al. Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. **Neuro-oncology**, v. 13, n. 6, p. 591–599, 2011.

RAYCHAUDHURI, B. et al. Myeloid derived suppressor cell infiltration of murine

and human gliomas is associated with reduction of tumor infiltrating lymphocytes. **Journal of neuro-oncology**, v. 122, n. 2, p. 293–301, 2015.

RICARD, D. et al. Primary brain tumours in adults. **The Lancet**, v. 379, n. 9830, p. 1984–1996, 2012.

RIDLEY, A.; CAVANAGH, J. B. Lymphocytic infiltration in gliomas: evidence of possible host resistance. **Brain**, v. 94, n. 1, p. 117–124, 1971.

RODRÍGUEZ-PINTO, D. B cells as antigen presenting cells. **Cellular immunology**, v. 238, n. 2, p. 67–75, 2005.

RODRIGUEZ-MANZANET, R. et al. The costimulatory role of TIM molecules. **Immunological reviews**, v. 229, n. 1, p. 259–270, 2009.

RODRÍGUEZ, P. C.; OCHOA, A. C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. **Immunological reviews**, v. 222, n. 1, p. 180–191, 2008.

ROSENBERG, S. A. et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4550–4557, 2011.

ROSSI, M. L. et al. Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. **Acta neuropathologica**, v. 74, n. 3, p. 269–277, 1987.

RUDD, C. E.; SCHNEIDER, H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 544–556, 2003.

SAKUIISHI, K. et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. **Journal of Experimental Medicine**, p. jem-20100643, 2010.

SAMPSON, J. H. et al. A pilot study of IL-2R α blockade during lymphopenia depletes regulatory T-cells and correlates with enhanced immunity in patients with glioblastoma. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31046, 2012.

SANGRO, B. et al. A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. **Journal of hepatology**, v. 59, n. 1, p. 81–88, 2013.

SASAKI, K. et al. IL-4 suppresses very late antigen-4 expression which is required for therapeutic Th1 T cell trafficking into tumors. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 32, n. 8, p. 793, 2009.

SAVAGE, P. A.; MALCHOW, S.; LEVENTHAL, D. S. Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology. **Trends in immunology**, v. 34, n. 1, p. 33–40, 2013.

SAWAMURA, Y. et al. Antitumor activity and surface phenotypes of human glioma-infiltrating lymphocytes after in vitro expansion in the presence of interleukin 2. **Cancer research**, v. 49, n. 7, p. 1843–1849, 1989.

SAWAYA, R. Extent of resection in malignant gliomas: a critical summary. **Journal of neuro-oncology**, v. 42, n. 3, p. 303–305, 1999.

SCHIFF, D. et al. Gliomas arising in organ transplant recipients: an unrecognized complication of transplantation? **Neurology**, v. 57, n. 8, p. 1486–1488, 2001.

- SCHMIDT, H. et al. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. **British journal of cancer**, v. 93, n. 3, p. 273–278, 2005.
- SCHRECK, S. et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. **Hematological oncology**, v. 27, n. 1, p. 31–39, 2009.
- SCHUESSLER, A. et al. Autologous T-cell therapy for cytomegalovirus as a consolidative treatment for recurrent glioblastoma. **Cancer research**, v. 74, n. 13, p. 3466–3476, 2014.
- SEIDEL, U. J. E.; SCHLEGEL, P.; LANG, P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. **How to improve immune reconstitution in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation?**, p. 52, 2015.
- SHAPIRO, W. R.; SHAPIRO, J. R. Biology and treatment of malignant glioma. **Oncology (Williston Park, NY)**, v. 12, n. 2, p. 233–240, 1998.
- SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; SAKAGUCHI, S. Induction of tumor immunity by removing CD25+ CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 10, p. 5211–5218, 1999.
- SHORT, S. C. External beam and conformal radiotherapy in the management of gliomas. In: **Local Therapies for Glioma Present Status and Future Developments**. [s.l.] Springer, 2003. p. 37–43.
- SIBSON, N. R. et al. Functional Energy Metabolism: In vivo ¹³C-NMR Spectroscopy Evidence for Coupling of Cerebral Glucose Consumption and Glutamate Neuronal Activity. **Developmental neuroscience**, v. 20, n. 4–5, p. 321–330, 1998.
- SICA, A. et al. **Macrophage polarization in tumour progression**. Seminars in cancer biology. **Anais...Elsevier**, 2008
- SIMMONS, G. W. et al. Neurofibromatosis-1 heterozygosity increases microglia in a spatially and temporally restricted pattern relevant to mouse optic glioma formation and growth. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 70, n. 1, p. 51–62, 2011.
- SISKA, P. J. et al. Suppression of Glut1 and glucose metabolism by decreased Akt/mTORC1 signaling drives T cell Impairment in B cell leukemia. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 6, p. 2532–2540, 2016.
- SMYTH, M. J. et al. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 11, p. 850–861, 2002.
- SOLGA, A. C. et al. RNA sequencing of tumor-associated microglia reveals Ccl5 as a stromal chemokine critical for neurofibromatosis-1 glioma growth. **Neoplasia**, v. 17, n. 10, p. 776–788, 2015.
- SOLITO, S. et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1319, n. 1, p. 47–65, 2014.
- SPENCE, A. M. et al. 2-[¹⁸F] Fluoro-2-deoxyglucose and Glucose Uptake in

Malignant Gliomas before and after Radiotherapy. **Clinical cancer research**, v. 8, n. 4, p. 971–979, 2002.

STEVENS, A.; KLÖTER, I.; ROGGENDORF, W. Inflammatory infiltrates and natural killer cell presence in human brain tumors. **Cancer**, v. 61, n. 4, p. 738–743, 1988.

STRUSS, A. K. et al. PHF3-specific antibody responses in over 60% of patients with glioblastoma multiforme. **Oncogene**, v. 20, n. 31, p. 4107, 2001.

STUMMER, W. et al. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. **Journal of neurosurgery**, v. 93, n. 6, p. 1003–1013, 2000.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–996, 2005.

SWARTZ, A. M. et al. Peptide vaccines for the treatment of glioblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 123, n. 3, p. 433–440, 2015.

SYRBE, U.; SIVEKE, J.; HAMANN, A. **Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression?** Springer seminars in immunopathology. **Anais...Springer**, 1999

TAKEUCHI, J.; BARNARD, R. O. Perivascular lymphocytic cuffing in astrocytomas. **Acta neuropathologica**, v. 35, n. 3, p. 265, 1976.

TALMADGE, J. E. Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 18, p. 5243–5248, 2007.

TARTOUR, E. et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. **Cancer research**, v. 59, n. 15, p. 3698–3704, 1999.

TAUBE, J. M. et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. **Science translational medicine**, v. 4, n. 127, p. 127ra37-127ra37, 2012.

THAMEEM DHEEN, S.; KAUR, C.; LING, E.-A. Microglial activation and its implications in the brain diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1189–1197, 2007.

THIELENS, A.; VIVIER, E.; ROMAGNÉ, F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 2, p. 239–245, 2012.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2443–2454, 2012.

TOPHAM, N. J.; HEWITT, E. W. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 7–15, 2009.

TOSOLINI, M. et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. **Cancer**

- research**, v. 71, n. 4, p. 1263–1271, 2011.
- TSAI, J.-C.; GOLDMAN, C. K.; GILLESPIE, G. Y. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. **Journal of neurosurgery**, v. 82, n. 5, p. 864–873, 1995.
- TUMEH, P. C. et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 568–571, 2014.
- TURK, M. J. et al. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 6, p. 771–782, 2004.
- UGEL, S. et al. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 470–481, 2009.
- VALZASINA, B. et al. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+ CD25– lymphocytes is thymus and proliferation independent. **Cancer research**, v. 66, n. 8, p. 4488–4495, 2006.
- VANNUCCI, S. J.; MAHER, F.; SIMPSON, I. A. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. **Glia**, v. 21, n. 1, p. 2–21, 1997.
- VAQUERO, J. et al. Presence and significance of NK cells in glioblastomas. **Journal of neurosurgery**, v. 70, n. 5, p. 728–731, 1989.
- VAUGHN, A. E.; DESHMUKH, M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. **Nature cell biology**, v. 10, n. 12, p. 1477–1483, 2008.
- VELCHETI, V. et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. **Laboratory investigation**, v. 94, n. 1, p. 107–116, 2014.
- VERHAAK, R. G. W. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer cell**, v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.
- VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523–532, 2008.
- VILLEGAS, F. R. et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. **Lung cancer**, v. 35, n. 1, p. 23–28, 2002.
- VITUCCI, M.; HAYES, D. N.; MILLER, C. R. Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. **British journal of cancer**, v. 104, n. 4, p. 545–553, 2011.
- VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44–49, 2011.
- VIVIER, E.; NUNÈS, J. A.; VÉLY, F. Natural killer cell signaling pathways. **Science**, v. 306, n. 5701, p. 1517–1519, 2004.
- VOEHRINGER, D.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY, R. M. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 267–277, 2004.
- VOM BERG, J. et al. Intratumoral IL-12 combined with CTLA-4 blockade elicits T

cell-mediated glioma rejection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 13, p. 2803–2811, 2013.

VON HANWEHR, R. I. et al. Mononuclear lymphoid populations infiltrating the microenvironment of primary CNS tumors: Characterization of cell subsets with monoclonal antibodies. **Journal of neurosurgery**, v. 60, n. 6, p. 1138–1147, 1984.

WAINWRIGHT, D. A. et al. Thymus-derived rather than tumor-induced regulatory T cells predominate in brain tumors. **Neuro-oncology**, v. 13, n. 12, p. 1308–1323, 2011.

WAINWRIGHT, D. A. et al. Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in mice with brain tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 20, p. 5290–5301, 2014.

WALDHAUER, I.; STEINLE, A. NK cells and cancer immunosurveillance. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5932–5943, 2008.

WANG, X. et al. Dendritic cell-based vaccine for the treatment of malignant glioma: a systematic review. **Cancer investigation**, v. 32, n. 9, p. 451–457, 2014.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956.

WAZIRI, A. et al. Preferential in situ CD4+ CD56+ T cell activation and expansion within human glioblastoma. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7673–7680, 2008.

WEBER, J. S. et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or-naive melanoma. **Journal of clinical oncology**, v. 31, n. 34, p. 4311–4318, 2013.

WEI, F. et al. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. E2480–E2489, 2013.

WELLER, R. O.; KIDA, S.; ZHANG, E. Pathways of Fluid Drainage from the Brain-Morphological Aspects and Immunological Significance in Rat and Man. **Brain pathology**, v. 2, n. 4, p. 277–284, 1992.

WHERRY, E. J. T cell exhaustion. **Nature immunology**, v. 12, n. 6, p. 492–499, 2011.

WIEMELS, J. L. et al. History of allergies among adults with glioma and controls. **International journal of cancer**, v. 98, n. 4, p. 609–615, 2002.

WILKE, C. M. et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? **Carcinogenesis**, v. 32, n. 5, p. 643–649, 2011.

WING, K. et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 271–275, 2008.

WINTTERLE, S. et al. Expression of the B7-Related Molecule B7-H1 by Glioma Cells. **Cancer research**, v. 63, n. 21, p. 7462–7467, 2003.

WOO, S.-R. et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. **Cancer research**, v.

72, n. 4, p. 917–927, 2012.

WU, A. et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 11, p. 1113–1125, 2010.

WYKES, M. et al. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 3, p. 1313–1319, 1998.

XUE, J. et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 274–288, 2014.

YAN, W. et al. Molecular classification of gliomas based on whole genome gene expression: a systematic report of 225 samples from the Chinese Glioma Cooperative Group. **Neuro-oncology**, v. 14, n. 12, p. 1432–1440, 2012.

YANG, I. et al. Modulation of major histocompatibility complex Class I molecules and major histocompatibility complex—bound immunogenic peptides induced by interferon- α and interferon- γ treatment of human glioblastoma multiforme. **Journal of neurosurgery**, v. 100, n. 2, p. 310–319, 2004.

YANG, I. et al. CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 11, p. 1381–1385, 2010.

YANG, I. et al. Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: evidence of distinct immunological microenvironments that reflect tumor biology: laboratory investigation. **Journal of neurosurgery**, v. 115, n. 3, p. 505–511, 2011.

YAO, Y. et al. B7-H1 is correlated with malignancy-grade gliomas but is not expressed exclusively on tumor stem-like cells. **Neuro-oncology**, v. 11, n. 6, p. 757–766, 2009.

YE, X. et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 1, p. 444–453, 2012.

YI, L. et al. Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. **Journal of neuroimmunology**, v. 232, n. 1, p. 75–82, 2011.

YOON, N. K. et al. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. **Human pathology**, v. 41, n. 12, p. 1794–1801, 2010.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 5, p. 651–658, 2011.

ZENG, J. et al. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 86, n. 2, p. 343–349, 2013.

ZHANG, J.-P. et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. **Journal of hepatology**, v. 50, n. 5, p. 980–989, 2009.

ZHANG, Z. et al. Identification and functional analysis of ligands for natural killer cell activating receptors in colon carcinoma. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 226, n. 1, p. 59–68, 2012.

- ZHOU, P. et al. In vivo discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment. **Nature**, v. 506, n. 7486, p. 52–57, 2014.
- ZHU, C. et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. **Nature immunology**, v. 6, n. 12, p. 1245–1252, 2005.
- ZHU, J.; EMERSON, S. G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. **Oncogene**, v. 21, n. 21, p. 3295, 2002.
- ZHU, Y. et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. **Cancer research**, v. 74, n. 18, p. 5057–5069, 2014.
- ZITVOGEL, L. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. **Nature medicine**, v. 4, n. 5, p. 594–600, 1998.
- ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. CD103+ dendritic cells producing interleukin-12 in anticancer immunosurveillance. **Cancer cell**, v. 26, n. 5, p. 591–593, 2014.
- ZUSSMAN, B. M.; ENGH, J. A. Outcomes of the ACT III study: rindopepimut (CDX-110) therapy for glioblastoma. **Neurosurgery**, v. 76, n. 6, p. N17, 2015.

CURRÍCULO

Pereira, M. B.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Mariana Brutschin Pereira

Local e data de nascimento: 22/01/1992 – Igrejinha, RS, Brasil

Endereço profissional: Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular

Centro de Biotecnologia, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43431, sala 119

Bairro Agronomia – Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone profissional: (51) 3308-6092

Telefone pessoal: (51) 99822-2378

E-mail: mbrutschin@gmail.com

2. FORMAÇÃO:

2010 – 2014 Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

Título: Análise in silico da expressão de genes ligados a autofagia e a pluripotência em banco de dados de microarranjos de iPSCs, ESCs e células somáticas

Orientador: Dra. Daiane Hatwig ; Dr. Guido Lenz

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

2015 – 2017: Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Título: Caracterização transcricional de infiltrados imunológicos e sua relação com a sobrevida de pacientes com glioblastoma

Orientador: Dr. Guido Lenz

Bolsista: Comissão de Amparo a Pesquisa (CAPES)

3. ESTÁGIOS:

2010 – 2011: Estágio Voluntário

Orientação: Dr. Luciano Pinto

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia Vegetal

Foram desenvolvidas atividades relacionadas à produção e caracterização de lectinas

2011 – 2013: Estágio Curricular – Iniciação Científica

Orientação: Dr. Odir Dellagostion

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Vacinologia

Bolsista: Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Foram desenvolvidas atividades relacionadas ao desenvolvimento de vacinas contra Leptospirose.

2011 – 2013: Estágio Voluntário

Orientação: Dr. Odir Dellagostin

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Bioinformática

Bolsista: Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Foram desenvolvidas atividades relacionadas a montagem e anotação de genomas bacterianos

2012 – 2012: Estágio Extra-Curricular

Orientação: Dra. Ana Lúcia Tabet Oller Nascimento

Universidade de São Paulo, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Laboratório de Biotecnologia IV

Foram desenvolvidas atividades relacionadas à caracterização de proteínas de membrana de *Leptospira spp.*

2013 – 2013: Estágio Curricular de Final de Curso

Orientação: Dr. Guido Lenz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular

Foram desenvolvidas atividades relacionadas a análise da expressão gênica de genes relacionados a autofagia e pluripotência em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC)

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2012 - DESTAQUE NAS ÁREAS DE BIOTECNOLOGIA/IMUNOLOGIA - VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA E II ENCONTRO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA APLICADA

2011 - PRÊMIO DE DESTAQUE NA ÁREA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL -

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

VILLORE, E.S.; KIPPER, F.S.; PEREIRA, M.B.; LENZ, G. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *CANCER TREATMENT REVIEWS*, v. 51, p. 1–9, 2016.

ISER, I.C.; PEREIRA, M.B. ; LENZ, G. ; WINK, M.R. . The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. *MEDICINAL RESEARCH REVIEWS*, v. -, p. 1-43 , 2016.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

PEREIRA, M.B.; LENZ, G. Immunogenic cell death associated signatures based on gene impact on overall survival of patients in several cancer types. 2015. Pôster

PEREIRA, M.B. ; BACELO, K.L. ; OLIVEIRA, P. D. ; OLIVEIRA, T. L. ; FORSTER, K. ; Seixas, F. ; AMARAL, M. ; DELLAGOSTIN, O. A. ; HARTWIG, D.D. . Leptospira immunoglobulin-like protein A (LigA) produced in *Pichia pastoris* in a mannosylated form protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. 2012. Pôster

PEREIRA, M.B. ; KREMER, F.S. ; PLAÇA, J.R. ; ESLABAO, M. R. ; DELLAGOSTIN, O. A. . Sequencing and annotation of *leptospira borgpetersenii* 4E strain genome: improving the understand of the pathogen. 2012. Pôster

OLIVEIRA, T. L. ; PEREIRA, M.B. ; GRASSMANN, A. A. ; VALIATI, F. E. ; HARTWIG, D.D. ; DELLAGOSTIN, O. A. . Bacteria-Leptospirosis: Production of the recombinant protein OmpL37 of Leptospira interrogans for use as subunit vaccine against Leptospirosis. 2012. Apresentação oral

PEREIRA, M.B. ; OLIVEIRA, T. L. ; SCHUCH, R. ; BACELO, K.L. ; Seixas, F. ; DELLAGOSTIN, O. A. ; HARTWIG, D.D. . Vacinas contra leptospirose: uso de nanotubos como veículos potencializa a resposta imune humoral de vacinas de subunidade recombinante. 2012. Apresentação oral

PEREIRA, M.B. ; OLIVEIRA, T. L. ; MCBRIDE, A. ; DELLAGOSTIN, O. A. ; HARTWIG, D.D. . PROTEÍNA LemA de Leptospira Interrogans UTILIZADA SOB DIFERENTES ESTRATÉGIAS VACINAIS PROTEGE HAMSTERS DE INFECÇÃO LETAL. 2012. Apresentação oral

SCHUCH, R. ; BACELO, K.L. ; HARTWIG, D.D. ; OLIVEIRA, T. L. ; PEREIRA, M.B. ; DELLAGOSTIN, O. A. . Polissacarídeo bacteriano: de espessante e estabilizante a adjuvante vacinal. 2012. Apresentação oral

PEREIRA, M.B. ; OLIVEIRA, T. L. ; SCHUCH, R. ; BACELO, K.L. ; OLIVEIRA, P. D. ; DELLAGOSTIN, O. A. ; CONCEICAO, F.R. ; HARTWIG, D.D. . BIOFÁBRICAS: Pichia pastoris COMO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS VACINAIS DE Leptospira interrogans. 2011. Apresentação oral

PEREIRA, M.B. ; OLIVEIRA, T. L. ; OLIVEIRA, P. D. ; DELLAGOSTIN, O. A. ; HARTWIG, D.D. . ENSAIO PILOTO NA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA LipL32 DE Leptospira Interrogans EM BIORREATOR DE BANCADA. 2011. Pôster